



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Estudi transcripcional de la Colitis Ulcerosa. Caracterització i cerca de biomarcadors

Núria Planell Picola



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- Compartigual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - Compartigual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Facultat de Medicina
Universitat de Barcelona

Estudi transcripcional de la Colitis Ulcerosa Caracterització i cerca de biomarcadors

Núria Planell Picola

Centro de Investigación Biomédica en Red - Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBER-EHD)

Tesi Doctoral supervisada per

Directors:

Azucena Salas Martínez, PhD

Juan José Lozano Salvatella, PhD

Tutor:

Julián Panés Díaz, MD, PhD

Tesi per obtenir el grau de Doctor en Medicina i Recerca Translacional
Universitat de Barcelona

2018

Al Josep, l'Anna
el Joan i la Caterina

Agraïments

La tesi que tens entre les mans és el resultat de l'esforç d'un gran equip del què he pogut formar part durant tots aquests anys. Sense aquest, aquesta tesi no hauria sigut possible. Gràcies a tots/es!

Però com va començar tot plegat? Doncs he d'agrair-li especialment al Juanjo que em brindés l'oportunitat d'entrar a formar part d'aquest gran equip. Ell va ser qui va confiar en mi, recent llicenciada, per començar a jugar en el món de la bioinformàtica. Des dels inicis ha sigut i és un referent amb el que puc comptar sempre, i que m'ha donat la confiança i el temps per aprendre d'una disciplina tan solitària com és la bioinformàtica. Gràcies Juanjo per ser-hi sempre que t'he necessitat!

Però jo no em conformava amb tocar només una tecla, sinó que al mateix temps navegava pel laboratori de malaltia inflamatòria intestinal (MII) sota l'atenta mirada de l'Azucena. I és que a ella i al Julià, entre moltes altres coses, els he d'agrair que em permetessin jugar a dues bandes, en la bioinformàtica i trastejant al laboratori. Per mi ha sigut un aprenentatge enorme poder tenir els meus propis projectes i participar en molts d'altres a través de l'anàlisi bioinformàtic. Gràcies Azu per guiar-me, treure'm del forat negre cada cop que em posava a llegir literatura i acabava com perduda al mig de l'oceà, i per ajudar-me a formar una visió crítica de les coses. I Julià, des de la més total admiració i respecte, gràcies per la teva proximitat i energia. Em fascina la teva devoció pel que fas i t'agraeixo molt la confiança que m'has transmès sempre.

Però que hauria sigut de la meva tesi sense la Maica i la Míriam? Elles han estat els dos puntals d'aquesta tesi. Gràcies Míriam per la teva predisposició, per la feina ben feta i per ser les meves mans sempre que ho he necessitat, sense

tu no ho hauria pogut fer. I Maica, gràcies per aguantar totes les meves anades d'olla, pel teu coneixement infinit sobre la malaltia i del que fes falta, i per mirar i re-mirar històries clíniques amb mi (visca el manu), gràcies! Aquesta tesi és tan meva com vostra!!

Agrair també a tot l'equip clínic, especialment al Julià, l'Elena, l'Ingrid, l'Ignacio, l'Anna, l'Àngel, l'Àlex, la Rebeca, la Susana, la Marta, i l'Alicia pel seu suport i professionalitat durant aquests anys. Gràcies per la vostra proximitat, el bon tracte i per ser un punt fonamental en els estudis que realitzem al laboratori. Sense el vostre esforç i tenacitat tot això no tindria sentit. Mil gràcies!

I per suposat, gràcies a tots els pacients que han participat voluntàriament en aquests projectes.

Gràcies a totes les companyes del laboratori, cada una de vosaltres heu contribuït d'una forma o altra en aquesta tesi! Voldria agrair especialment a la Marisol, la mà que em va guiar als inicis, gràcies per tots els moments compartits a la campanya del laboratori antic. Dani, gràcies per la teva sinceritat, visió crítica de les coses i el teu escepticisme amb els resultats dels microarrays. Eli, gràcies per donar-me suport i consell sempre que ho he necessitat, fins i tot quan se'm va posar al cap aïllar cèl·lules epitelials. I gràcies per ser la promotora de la matabi-ci! Rut, gràcies per la teva espontaneïtat, les classes de català i per ensenyar-me tot el que sabies de les immunos. Raquel, Carol i Gina, gràcies per donar un cop de mà quan ha fet falta. Isa, gracias por todos los conocimientos compartidos conmigo, las inmunos y por la danza!! Helena, Elena, Alba i Aida, sou increïbles i ompliu el laboratori d'energia! Només puc dir-vos que gràcies per ser-hi!!! Ana i Lluís, gràcies per prendre el relleu en la bioinformàtica, i Montse, gracias por organizar todo tan bien! Estoy segura que los estudios que dejo abiertos estaran bajo control estando tu en el labo.

Agrair també als companys de l'Hospital de Bellvitge (Lorena i Jordi), a la Universitat de Campinas (Ciru), a la plataforma de genòmica de l'IDIBAPS (Magda, Helena, Laura i Montse), al Biobanc (Raquel, Laura i Mònica), al servei d'anatomia patològica de l'Hospital Clínic (Mireya i Míriam), al grup del Pau Sancho (Dani i Cris) i al grup de la Sofia per la seva contribució en la tesi i el bon tracte. I a la Pepa, per tenir-nos a tots/es sota control.

Agrair a tota aquella gent amb la que he compartit sobre-taules, caminades, viatges o instants comentant els projectes, compartint així la il·lusió del fet, sovint desdibuixat per les dificultats del camí. I a la meva família, per estar sempre al meu costat i donar-me la confiança i el suport per lluitar per allò que em fa feliç.

Finalment, agrair molt sincerament a l'Aida el suport amb els tràmits burocràtics de la tesi, a la Maica les revisions ortogràfiques i a l'Eli el disseny de la portada i contraportada.

Això ja està! Un llarg camí comença amb la primera passa, i d'això ja fa molts dies, però ha valgut la pena! Gràcies a tots/es els que m'hi heu acompanyat!

Índex

Introducció	17
Capítol I. Colitis Ulcerosa	17
1. Epidemiologia	17
2. Simptomatologia i caracterització	18
3. Diagnòstic i curs clínic	20
4. Patogènesi	21
4.1. Factors genètics	21
4.2. Factors ambientals	21
4.3. Microbiota intestinal	22
4.4. Barrera intestinal i resposta immunològica	23
4.4.1. Barrera epitelial	23
4.4.2. Immunitat innata	25
4.4.3. Citocines de la immunitat innata	26
4.4.4. Immunitat adaptativa	28
4.4.5. Citocines de la immunitat adaptativa	29
5. Tractament	30
5.1. Inducció de la remissió	30
5.2. Manteniment de la remissió	32
5.3. Cirurgia	32
5.4. Noves opcions terapèutiques	32
5.5. Càncer colorectal	33
Capítol II. Monitoratge de la Colitis Ulcerosa	35
1. Índexs d'activitat	35
1.1. Índexs d'activitat clínica	35
1.1.1. <i>Patient-reported outcomes</i>	37
1.2. Índexs d'activitat endoscòpica	38
1.3. Índexs d'activitat histològica	39

2. Biomarcadors per al diagnòstic i monitoratge de la CU	41
2.1. Biomarcadors serològics i sanguinis	42
2.2. Biomarcadors fecals	43
2.3. Biomarcadors en orina	44
2.1. Futurs biomarcadors	44
Capítol III. Estudi transcripcional de la Colitis Ulcerosa	46
1. El transcriptoma	46
2. Inflamació i expressió gènica	48
3. Caracterització transcripcional de la mucosa intestinal inflamada	49
3.1. Alteracions estructural i de permeabilitat de la mucosa	
intestinal	50
3.2. Funcions immunoreguladores: reclutament cel·lular,	
activació i mediadors inflamatoris	50
3.3. Proliferació i creixement cel·lular	60
4. Inflamació i càncer	61
Hipòtesis i objectius	63
Estudi 1. <i>Transcriptional analysis of the intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis in remission reveals lasting epithelial cell alterations</i>	67
Estudi 2. <i>Usefulness of transcriptional blood biomarkers as a non-invasive surrogate marker of mucosal healing and endoscopic response in ulcerative colitis</i>	81
Discussió	97
Conclusions	101
Bibliografia	103

Índex de figures

1	Gravetat i extensió de la Colitis Ulcerosa	18
2	Característiques histopatològiques de la Colitis Ulcerosa	19
3	Patrons d'evolució de la Colitis Ulcerosa	20
4	Patogènesi de la Colitis Ulcerosa	24
5	Representació de l'estructura típica d'un gen eucariota	47
6	Resposta a LPS en macròfags	49
7	Estructura de la mucosa intestinal	51
8	Sensors de la immunitat innata	54
9	Resposta d'una cèl·lula dendrítica a la senyalització per PRRs . .	55
10	Representació dels mecanismes involucrats en la curació mucosa .	61

Índex de taules

1	Noves opcions terapèutiques	33
2	Índex de Mayo	37
3	Índex endoscòpic de Mayo modificat (MMES)	40
4	<i>Matts Score</i>	41
5	Gens associats amb l'estructura i permeabilitat de la mucosa . . .	52
6	<i>Pattern-recognition receptors</i> (PRRs)	53
7	Molècules d'adhesió	57
8	Gens associats amb la immunomodulació en la mucosa	59
9	Gens associats amb la regeneració tissular de la mucosa	62

Abreviacions

5-ASA	5-aminosalicílic
6-MP	6-mercaptopurina
ADN	Àcid desoxiribonucleic
ARN	Àcid ribonucleic
BCR	<i>B-cell receptor</i>
CCR	Càncer Colorectal
CU	Colitis Ulcerosa
DAMP	<i>Damage-Associated Molecular Pattern</i>
IL	Interleucina
IFN	Interferó
JAK	<i>Janus Kinase</i>
LPS	Lipopolisacàrid
MC	Malaltia de Crohn
MII	Malaltia Inflammatory Intestinal
MMP	<i>Matrix Metalloproteinase</i>
NOD	<i>Nucleotide-binding Oligomerization Ddomain</i>
p-ANCA	<i>Perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibody</i>
PCR	Proteïna C-reactiva
PRO	<i>Patient Reported Outcome</i>
PRR	<i>Pattern-Recognition Receptors</i>
SAA	Sèrum Amyloid A
TCR	<i>T-cell receptor</i>
TGF	<i>Tumor Growth Factor</i>
TLR	Receptors tipus Toll (<i>Toll-like receptors</i>)
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VSG	Velocitat de Sedimentacio Globular

Introducció

Capítol I

Colitis Ulcerosa

La Colitis Ulcerosa (CU), descrita l'any 1859 pel Dr. Samuel Wilks (Regne Unit, 1824-1911), és una malaltia inflamatòria intestinal (MII) crònica que afecta la mucosa del còlon i de la que se'n desconeix l'etiologia [1, 2].

1. Epidemiologia

La MII engloba dues entitats principals, la CU i la malaltia de Crohn (MC). Ambdues sorgeixen a mitjans del segle XIX a l'oest d'Europa, Amèrica del Nord, Austràlia i Nova Zelanda, en paral·lel amb la revolució industrial. Actualment, Amèrica del Nord i Europa són les regions amb major incidència, afectant uns 1,5 milions d'americans i 2,2 milions d'europaus, però la incidència i prevalença de la CU i la MC, tan a Europa, Amèrica, Àsia i altres regions en vies de desenvolupament, experimenten un increment progressiu i sostingut al llarg del temps [3, 4].

En el cas concret de la CU, la incidència es situa entre 0,97-57,9 (per 100.000 persones/any) a Europa i 8,8-23,1 a Amèrica del Nord; essent la major prevalença reportada a Europa de 505 (per 100.000 persones) i de 279 a Amèrica del Nord [5].

La CU afecta indistintament homes i dones des de la infantesa fins a edats avançades, existint un pic d'incidència entre els 20 i 29 anys d'edat. Es coneix també una major incidència en la població jueva i un augment en regions urbanes respecte regions rurals [6-8].

2. Simptomatologia i caracterització

La CU es caracteritza per la inflamació de la mucosa intestinal del còlon en forma d'eritema, disminució o pèrdua del patró vascular, friabilitat, erosions i presència d'úlceres (Figura 1A) [9]. La inflamació s'inicia al recte i es pot estendre de forma continua i en sentit proximal fins al cec (Figura 1B). Depenent de l'àrea intestinal afectada i d'acord amb la classificació de Montreal es parla de [10]:

- Proctitis (E1), inflamació confinada al recte (fins la unió recte-sigma).
- Colitis esquerra (E2), la inflamació s'estén des del recte fins al còlon esquerre (angle esplènic).
- Pancolitis o colitis extensa (E3), quan l'afectació s'estén més enllà de l'angle esplènic.

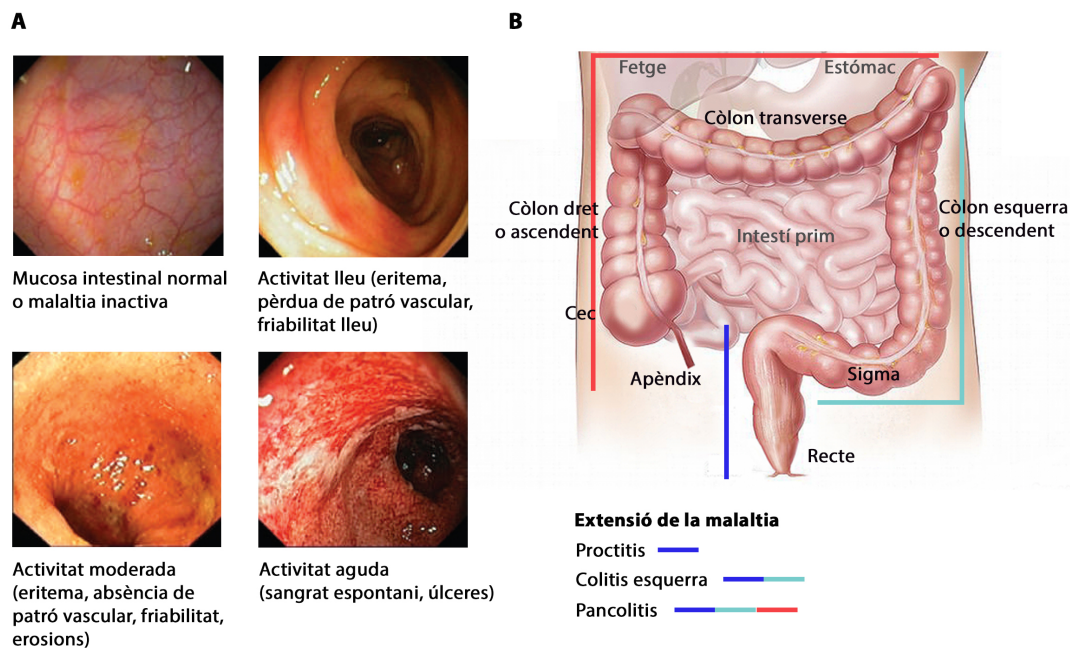


Figura 1: Gravetat i extensió de la Colitis Ulcerosa. (A) Imatges endoscòpiques representatives dels diferents graus d'activitat de la CU. (B) Esquema de l'extensió de la inflamació intestinal de la CU d'acord a la classificació de Montreal. Adaptat de [11].

A nivell histològic la mucosa intestinal inflamada pot presentar un augment d'infiltrat leucocitari (cèl·lules mononuclears i polimorfonuclears en la làmina pròpia i l'epiteli), alteracions estructurals de les criptes intestinals (disminució del nombre de cèl·lules calciformes, variabilitat en el diàmetre i la distància entre criptes, i fusió de criptes) i disrupció de la barrera epitelial (úlceres)(Figura 2) [12].

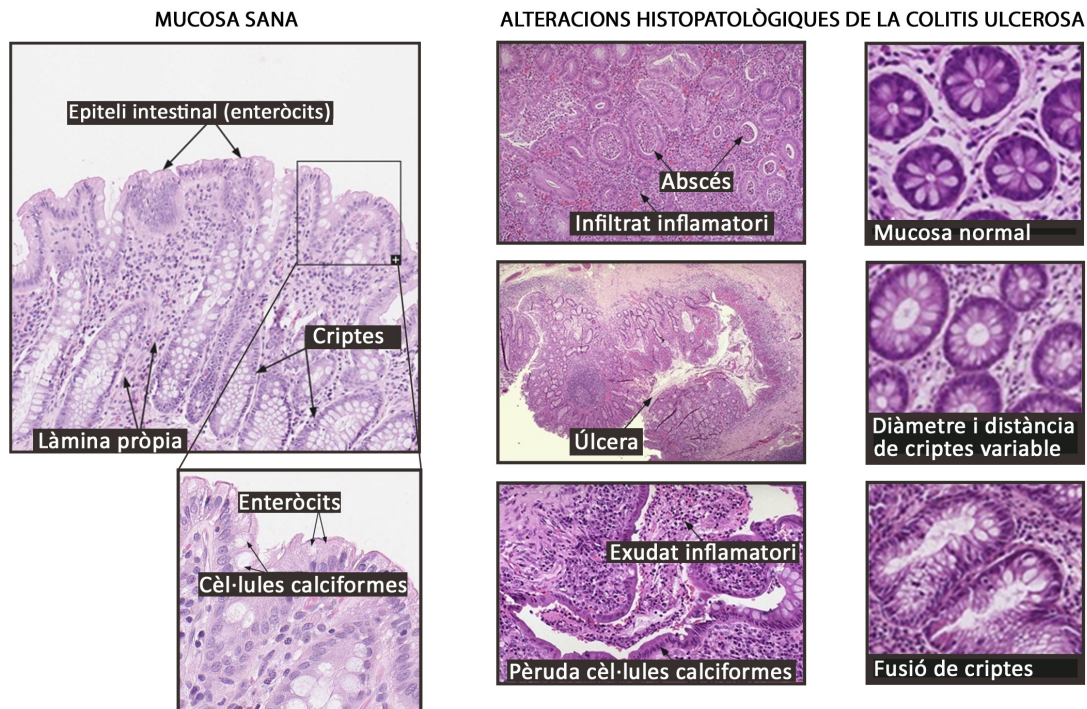


Figura 2: Característiques histopatològiques de la Colitis Ulcerosa.

Els símptomes associats a la CU inclouen: un augment del nombre de deposicions diàries, diarrea, presència de sang i moc en les deposicions, urgència, tenesme, dolor abdominal, febre, malestar, inapetència, pèrdua de pes i afectació de l'estat general. A més, entre un 10 i un 30% dels pacients presenten manifestacions extraintestinals que involucren diferents òrgans i sistemes com les articulacions, la pell, el fetge, els ulls, i la boca [13].

3. Diagnòstic i curs clínic

El diagnòstic de la CU, un cop excloses altres patologies amb simptomatologia similar com infeccions o isquèmia, es basa en criteris clínics, endoscòpics, histològics i radiològics.

El diagnòstic més comú és la colitis esquerra, donant-se en més del 50% dels casos [14]. Depenent de l'extensió de la malaltia la prognosi variarà; com menor sigui l'àrea afectada millor serà la prognosi. Així, pacients diagnosticats amb pancolitis presenten un major risc de requerir cirurgia, patir càncer colorectal (CCR) i altres complicacions importants com el sagnat agut i/o el megacòlon tòxic [15, 16].

El curs clínic de la CU pot presentar diferents patrons d'evolució. En general, es pot diferenciar entre quatre patrons (Figura 3)[17]. El patró més comú es caracteritza per un primer brot agut de la malaltia seguit de la remissió permanent o la presència d'inflamació lleu (Figura 3; Patró I). Per altra banda existeixen dos patrons que es caracteritzen per una perpetuació de l'activitat després del primer brot tot intercalant períodes d'activitat i remissió de forma més o menys continuada (Figura 3; Patró III-IV). Finalment, alguns casos presenten un brot inicial lleu seguit d'un augment constant de l'activitat de la malaltia sense aconseguir de nou la remissió de la zona afectada (Figura 3; Patró II).

Aquells casos que experimenten repetits brots d'activitat durant el curs de la malaltia poden evolucionar cap a una major extensió de l'àrea afectada, atribuint un caràcter dinàmic a la CU [18].

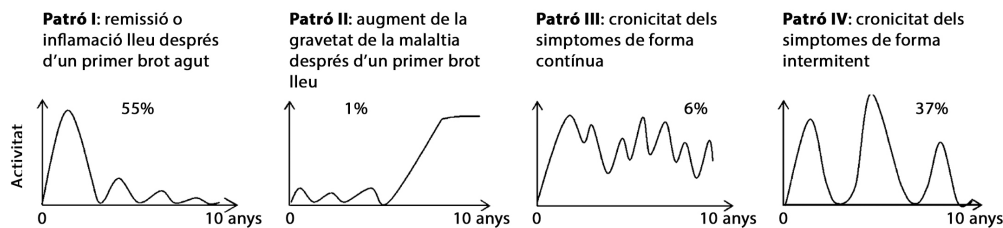


Figura 3: Patrons d'evolució de la CU. Representació gràfica de quatre corbes que il·lustren els diferents cursos clínics de la CU, des del diagnòstic fins als 10 anys de seguiment. Adaptat de [17].

4. Patogènesi

La CU, igual que la MC, és una malaltia idiopàtica. Tot i que encara no se n'ha determinat l'etiologia sí que es coneixen diversos factors associats a aquesta que posen en relleu la seva complexitat i li confereixen un caràcter multifactorial. Factors ambientals, genètics, alteracions de la microbiota intestinal, de la barrera intestinal i de la resposta immunològica, en són els principals (Figura 4).

4.1. Factors genètics

Un dels principals factors de risc de patir CU és tenir antecedents familiars de MII. Germans de pacients amb CU presenten un augment del risc de desenvolupar la malaltia d'entre 8 i 15 vegades [19]. Aquest fet podria fer pensar que la CU és una patologia de caràcter purament genètic. No obstant, estudis amb germans bessons mostren que la concordança entre bessons univitel·lins és del 16% i entre bessons bivitel·lins del 4%, allunyant-se molt de la concordança esperada si la CU fos sols un trastorn genètic ¹ [20].

Altrament, existeixen múltiples variants genètiques que s'associen amb la MII. La majoria d'aquestes són compartides entre la MC i la CU (110 variants), destacant-ne: *IL23R*, *STAT3*, *MST1*, *CARD9* i *IL10*, però se n'han identificat 23 d'específiques de la CU. Aquestes 23 es relacionen principalment amb la formació de la barrera epitelial i les unions intercel·lulars (p.e. *HNF4A*, *ECM1*, *CDH1*, *LAMB1*), l'autofàgia (p.e. *DAP*), i la resposta immunològica (p.e. *IL7R*, *IL8RA/RB*, *IRF5*) [21, 22].

També s'ha identificat l'al·lel *HLA-DRB1*01:03*, que s'ha associat a un fenotip agressiu de la malaltia i que podria ser rellevant a nivell pronòstic [23].

4.2. Factors ambientals

L'evolució demogràfica de la malaltia, caracteritzada per l'augment de la incidència en les zones industrialitzades, ha posat en relleu la importància de l'estil de vida en la patogènesi de la CU.

¹Els bessons dizigòtics comparteixen el 50% dels seus gens, pel que la concordança és del 50%, i els monozigòtics comparteixen el 100%, essent la concordança dels seus factors genètics del 100%.

La millora sanitària i higiènica, els canvis en l'estructura familiar (famílies més reduïdes), una dieta rica en greixos saturats i vitamina B6, un estil de vida sedentari, l'estrès, i alteracions en la son, es relacionen amb l'increment del risc de patir CU [24–31].

A més, entre els pacients amb CU, l'ús d'antiinflamatoris no esteroïdals (AINEs) s'associa amb el desencadenament de brots i, tot i que hi ha resultats contradictoris referent als antibiòtics, es creu que l'ús d'aquests pot augmentar el risc de patir una MII [32, 33].

Per altra banda, l'apendicectomia realitzada abans dels 20 anys i el fumar es consideren factors protectors [34, 35]. Tanmateix, entre els individus fumadors, el risc de desenvolupar CU augmenta al cap de 2-5 anys de deixar de fumar [36].

4.3. Microbiota intestinal

Molts dels factors genètics i ambientals associats a la CU estan relacionats amb la microbiota intestinal, fent que aquesta pugui esdevenir un dels factors clau de la malaltia.

La microbiota intestinal està formada per un conjunt complex de microorganismes que es localitzen a l'intestí i que juguen un paper fonamental en l'organisme. S'estima que el nostre còlon conté al voltant de 1.000 espècies bacterianes diferents que estan involucrades en el metabolisme, la fisiologia, la nutrició i diverses funcions immunològiques [37].

Els pacients amb MII presenten una microbiota intestinal alterada (disbiosis) que es caracteritza per una menor diversitat i una major densitat bacteriana [38, 39]. La disminució de microorganismes del fílum Firmicutes (com *Faecalibacterium prausnitzii*) i l'increment de Gammaproteobacteris (com *Escherichia coli* adherent i invasiva) són típics en la disbiosi d'aquests pacients [40].

Estudis en models murins demostren que models animals deficientes per la citocina anti-inflamatòria interleucina-10 (IL-10) desenvolupen colitis degut a una resposta immunològica descontrolada enfront als bacteris entèrics intestinals [41]. Quan aquests animals es crien en ambients lliures de microorganismes no desen-

volupen la colitis, mentre que quan són colonitzats per bacteris comensals sí que la desenvolupen, senyalant la rellevància de la microbiota en la CU [42–44].

Per altra banda, s’han detectat anticossos antibacterians en sèrum de pacients amb MII. La detecció d’aquests anticossos és menys freqüent en la CU que en la MC, essent l’anticòs perinuclear anti-citoplasma dels neutròfils (p-ANCA, *perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibody*) el més característic de la CU. p-ANCA reconeixen antígens nuclears de neutròfils però també s’han associat a una reacció creuada amb antígens bacterians [45, 46].

4.4. Barrera intestinal i resposta immunològica

La tolerància al gran nombre de microorganismes presents en el tracte digestiu es regeix per una resposta immunològica controlada que dóna lloc a l’homeòstasi intestinal. Per aconseguir aquest equilibri entren en joc múltiples factors: la barrera intestinal, la resposta immunològica innata i la resposta immunològica adaptativa. En pacients amb CU s’han descrit múltiples alteracions d’aquest procés que poden relacionar-se amb una resposta immunològica descontrolada responsable de la perpetuació de la inflamació de la mucosa intestinal [21].

4.4.1. Barrera epitelial

La barrera epitelial és la primera línia de defensa contra la invasió de patògens en l’organisme. Aquesta és una barrera física formada per diferents tipus cel·lulars (enteròcits, cèl·lules calciformes i cèl·lules enteroendocrines) que regula la permeabilitat de substàncies i microorganismes presents en la llum del còlon (Figura 2). A més, les cèl·lules epitelials expressen receptors de patògens com els receptors tipus Toll (TLRs, *Toll-like receptors*) i NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*) pel que estan involucrades en l’activació de la resposta immunitària.

La permeabilitat de la barrera epitelial està augmentada en pacients amb CU, relacionant-se amb la reducció de la capa de moc que es troba per sobre de les cèl·lules epitelials i defectes en les unions intercel·lulars. En models animals s’ha vist com la depleció del gen mucina 2 (*MUC2*), que codifica per una glicoproteïna que compon el moc intestinal, indueix colitis i CCR [47, 48].

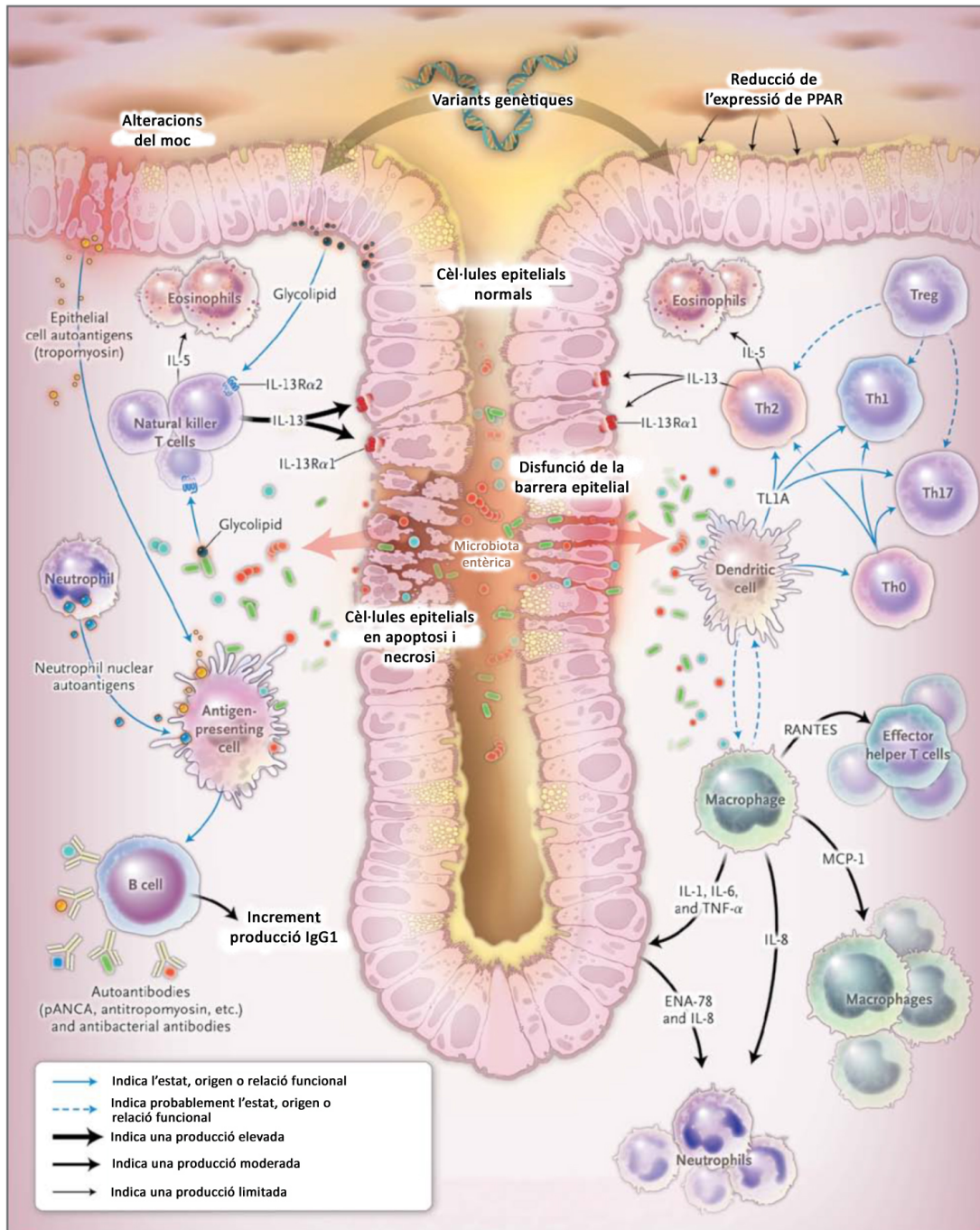


Figura 4: Patogènesi de la Colitis Ulcerosa. Adaptat de [13].

Per altra banda, l'expressió dels TLRs també està alterada. En condicions fisiològiques les cèl·lules epitelials expressen majoritàriament TLR3 i TLR5, mentre que l'expressió de TLR2, TLR4 i TLR9 està augmentada en pacients amb CU, relacionant-se amb l'activació d'una resposta immunològica pro-inflamatòria [49]. També s'ha detectat una reducció de l'expressió de PPAR- γ (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) en l'epiteli còlic. PPAR- γ és un receptor nuclear que regula gens inflamatoris. Concretament, té la capacitat de suprimir la producció de molècules pro-inflamatòries i, per tant, la seva menor expressió en la CU pot estar contribuint en la perpetuació de la inflamació [50].

Totes aquestes alteracions, juntament amb el fet que la inflamació en pacients amb CU està confinada al còlon, posa de manifest la implicació de la barrera epitelial en la patogènesi de la colitis.

4.4.2. Immunitat innata

La resposta immunitària innata es caracteritza pel reconeixement i la resposta a patògens de forma inespecífica. Les cèl·lules epitelials, endotelials i mesenquimals poden considerar-se part d'aquesta resposta immunitària innata pel paper que hi juguen. No obstant, i centrant-nos en les cèl·lules de llinatge hematopoètic, el sistema immunitari innat està mediat per diferents tipus cel·lulars: neutròfils, cèl·lules *natural killer* (NK), eosinòfils, basòfils, monòcits, macròfags i cèl·lules dendrítiques. Algunes d'aquestes cèl·lules (neutròfils, macròfags i cèl·lules dendrítiques) són cèl·lules fagocitàries, essent les encarregades d'iniciar la resposta contra agents patògens a través d'uns sensors capaços de reconèixer patrons moleculars específics, anomenats PRRs (*pattern-recognition receptors*). Secreten citocines i quimocines i mantenen l'homeòstasi eliminant restes cel·lulars, antígens, cèl·lules apoptòtiques i microorganismes. A més, els macròfags i les cèl·lules dendrítiques actuen com a cèl·lules presentadores d'antígens fent de pont entre el sistema immunitari innat i l'adaptatiu.

Un dels primers signes d'inflamació còlica és la infiltració de neutròfils a la mucosa intestinal, tant en la làmina pròpia com en les criptes epitelials (criptitis, Figura 2). L'elevada acumulació de neutròfils infiltrants en pacients amb CU pot alterar les funcions de la barrera epitelial, afavorir la destrucció tissular mitjançant dany oxidatiu i proteolític, i perpetuar la inflamació a través de la secreció de múltiples

mediadors inflamatoris [51].

Un increment de les cèl·lules dendrítiques madures i activades, amb major capacitat d'estimulació i l'expressió dels TLRs alterada s'ha detectat en la mucosa de pacients amb CU[52]. Estudis en models murins indiquen que el paper dels macròfags i les cèl·lules dendrítiques pot ser clau en la resposta inflamatòria intestinal. La majoria dels macròfags i cèl·lules dendrítiques residents a la làmina pròpia de ratolins, involucrats en la prevenció de la translocació de bacteris comensals als ganglis limfàtics mesentèrics i en regular la resposta Th17, expressen el receptor CX3CR1. La depleció d'aquest receptor s'associa a la reducció del nombre de macròfags presents en la lamina pròpia i, en conseqüència, a augmentar la translocació de bacteris comensals als ganglis limfàtics mesentèrics. Així, en models murins amb colitis induïda per DSS, la depleció de CX3CR1 incrementa la gravetat de la colitis [53].

4.4.3. Citocines de la immunitat innata

Les citocines juguen un paper crucial en la progressió i gravetat de la MII. Una de les citocines quimiotàctiques més abundants en la inflamació és la CXCL8 o IL-8, expressada principalment per macròfags, neutròfils i cèl·lules epitelials. En malalts amb CU l'expressió d'aquesta quimiocina es correlaciona amb el grau d'activitat endoscòpica i histològica de la CU [54–56]. De la mateixa manera, la producció d'altres quimiocines com CXCL1, CXCL2, CXCL9, CXCL10 i CCL20, també s'associa amb l'activitat clínica i endoscòpica de la malaltia [57–59].

En general, les cèl·lules presentadores d'antígens expressen grans quantitats de citocines pro-inflamatòries com IL-1 β , IL-6, IL-18 i Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α). La MII es caracteritza per un augment de l'activitat de la via de la IL-1 β [60]. Tanmateix, la manca de CASP1, un enzim encarregat d'activar IL-1 β i IL-18, evita que ratolins tractats amb DSS desenvolupin colitis, posant en relleu la importància d'aquestes en la patogènesi de la MII [61].

La IL-6 també està augmentada tan en humans amb MII com en models animals de colitis, mostrant una correlació positiva amb l'activitat endoscòpica de la malaltia [56, 62, 63]. Aquesta citocina està associada a diverses funcions pro-inflamatòries com l'activació de cèl·lules presentadores d'antigen i de cèl·lules T,

i l'apoptosi [64]. Els resultats obtinguts bloquejant aquesta molècula en models animals mostren una reducció de la inflamació; no obstant, en un primer cas clínic d'un pacient amb CU s'han reportat resultats negatius [65].

El TNF- α , secretat per macròfags CD14, adipòcits, fibroblasts i cèl·lules T, està augmentat en la sang, la femta i la mucosa intestinal dels pacients amb MII [66–70]. Aquest es pot trobar en membrana o soluble, i activa tota una cascada de senyals pro-inflamatòries a través del factor de transcripció NF- κ B (*nuclear factor of the κ light chain enhancer of B cells*) [71]. La neutralització del TNF- α de membrana indueix l'apoptosi de cèl·lules T i és efectiu en la supressió de la colitis en models murins [72, 73]. A més, l'eficàcia dels anticossos contra TNF- α en pacients amb CU i MC, una de les teràpies més utilitzades actualment, confirma la importància d'aquest en la patogènesi [74].

Per altra banda, les citocines de la família de la IL-12 (IL-12, IL-23, IL-27 i IL-35), produïdes per cèl·lules presentadores d'antigen, també augmenten durant el procés inflamatori [75]. La IL-35 regula la colitis en models murins dependents de cèl·lules T, i l'administració de IL-35 recombinant redueix l'activitat inflamatòria suprimint citocines pro-inflamatòries produïdes per les cèl·lules Th1 i Th17 [76].

Una altra de les famílies de citocines alterades degut a la invasió de la microbiota intestinal és l'interferó tipus I (IFN- α i IFN- β), que es veu activat per l'estimulació del TLR9, present en cèl·lules dendrítiques plasmacitoides i cèl·lules B [77]. Aquestes citocines poden estar implicades en la regeneració epitelial i en la inducció de cèl·lules T reguladores productores de IL-10. L'ús d'agonistes del TLR9 ajuda a suprimir la inflamació en ratolins deficients de RAG1, mentre que models deficients pel receptor de IFN tipus I (IFN- α , IFN- β i IFN- ω) mostren colitis experimental més greu [78]. En humans, l'ús terapèutic d'aquests antagonistes s'ha avaluat. L'administració de IFN- β -1a recombinat no mostra eficàcia en pacients refractaris a esteroides, per contra, l'administració de patrons d'oligonucleòtids bacterians CpG presenta resultats prometedors [79, 80].

Finalment, s'ha observat que les cèl·lules epitelials mostren un augment de la producció de IL-33 en malalts amb CU, i que en models animals el bloqueig de

la senyal IL-33/ST2 redueix la colitis [81, 82]. De la mateixa manera, també està augmentada l'expressió de IL-37b, que s'ha relacionat amb processos anti-inflamatoris com la disminució del reclutament de leucòcits i la inhibició de TNF- α i IL-1 β [83]. En models colítics animals, l'expressió de IL-37 humana redueix la gravetat de la colitis [84].

4.4.4. Immunitat adaptativa

La resposta immunitària adaptativa està dirigida per limfòcits (cèl·lules B i T) que, un cop activats, generen anticossos i citocines moduladores de la resposta immune, respectivament. A diferència de la resposta immunitària innata, aquesta és una resposta antígen específica i que genera memòria immunològica.

El paper de les cèl·lules B en la patologia de la CU no està gaire clar; tot i que augmenten les cèl·lules infiltrants en la mucosa de pacients amb CU activa, la depleció d'aquestes cèl·lules no mostra efectes beneficiosos en la CU [85, 86]. A més de la detecció d'anticossos pANCA, descrits anteriorment, la CU es caracteritza per un augment de IgA i IgG, destacant-ne la producció d'anticossos IgG1 contra autoantígens de la mucosa còlica [87, 88]. Es creu que aquest autoantigen podria ser la tropomiosina, que a part de localitzar-se a l'intestí, també està present en la pell, les articulacions, els ulls i l'epiteli biliar, llocs on solen presentar-se manifestacions extra-intestinals associades a la CU [89].

La resposta de les cèl·lules T efectores també s'ha vist alterat en la CU; aquesta es caracteritza per una resposta Th2 atípica amb nivells elevats de IL-13 i IL-5, però no de IL-4 (citocina clàssica Th2), regulada per cèl·lules T citotòxiques [90, 91]. La IL-13 actua sobre la barrera epitelial estimulants l'apoptosi i disminuint la velocitat de regeneració epitelial i la IL-5 està implicada en la migració i activació d'eosinòfils [92–94]. El bloqueig de IL-13 ha demostrat una reducció d'inflamació en models animals amb asma i colitis [91, 95, 96], però el seu ús terapèutic en pacients amb CU no ha mostrat eficàcia [97].

El paper de les cèl·lules Th17 també és rellevant en la patogènesi de la CU. S'ha observat un augment de cèl·lules IL17 en MII i també de la citocina IL-17 [98]. Aquestes cèl·lules i les seves citocines efectores estan implicades en la resposta a infeccions, especialment a bacteris, i s'han relacionat amb diferents malalties

autoimmunes [99]. En malalts amb CU la secreció de IL-17 es veu augmentada per la IL-23, a més, l'expressió transcripcional del receptor de la IL-23 (IL23R) en les cèl·lules T CD4 d'aquests pacients també està augmentada [100]. Mentre que el bloqueig de IL-17A (també coneguda com IL-17) en la MC no ha donat bons resultats [101], el bloqueig simultani de IL-17A i IL-17F (un altre membre de la família de la IL-17) en models animals sí que mostra una millora de la inflamació intestinal [102]. Seguint aquesta línia, la inhibició de la subunitat p40, que bloqueja la senyal de IL-12 i IL-23, mostra millora en pacients amb MC i en CU se n'està avaluant l'eficàcia (NCT02407236) [103, 104]. La IL-12 i la IL-23 promouen la resposta Th1 i Th17, respectivament, pel que el benefici terapèutic d'aquest anticòs pot ser degut a la modulació de la resposta Th1 a més de la de Th17.

Finalment, s'ha trobat un elevat nombre de cèl·lules T productores de IL-9 en la mucosa intestinal de pacients amb CU activa, posant en relleu una nova població en estudi que podria estar implicada en la patogènesi de la CU [105].

4.4.5. Citocines de la immunitat adaptativa

Les cèl·lules T de la làmina pròpia presenten una resposta exacerbada a l'estimulació del receptor de les cèl·lules T (TCR, *T cell receptor*), pel que dependran de factors co-estimuladors com IL-6 i TNF- α per prevenir l'apoptosi [66, 106]. Aquestes citocines poden estar generades per altres cèl·lules o per les pròpies cèl·lules T mitjançant l'activació de factors de transcripció com NFATc2 i IRF4 [107, 108].

Relacionat amb les cèl·lules Th17, s'ha determinat un augment de la producció de citocines com IL-17A, IL-17F, IL-22 i IL-26 en malalts amb MII [98]. IL-17 i IL-21 s'han associat a funcions pro-inflamatòries incloent la sobre-regulació de TNF- α , IL1 β , IL-6 i IL-8, el reclutament de neutròfils i la secreció de metal·loproteïnases de la matriu pels fibroblasts intestinals [109, 110]. La IL-22, per altra banda, es relaciona amb la funcionalitat de la barrera epitelial [111, 112].

Citocines anti-inflamatòries com IL-10 i *Tumor Growth Factor* (TGF) - β , que poden ser generades per cèl·lules T reguladores i altres cèl·lules no limfoides (macròfags, cèl·lules dendrítiques, fibroblasts i cèl·lules epitelials), són clau per

l'homeòstasi i la tolerància intestinal [113, 114]. En pacients amb MII es creu que la senyal de TGF- β pot estar inhibida degut a la sobre-expressió de SMAD7 (*Mothers Against Decaplegic homolog 7*) per les cèl·lules T efectores [115]. La inhibició de SMAD7 ha mostrat bons resultats en models animals i els estudis que s'estan cursant en pacients amb MC també assenyalen a resultats prometedors [116, 117].

5. Tractament

En el tractament de la CU l'objectiu primari és la inducció de la remissió clínica, deixant en segon pla la remissió endoscòpica, degut a la forta associació de la simptomatologia clínica (diarrea, augment del nombre de deposicions al dia, urgència, malestar, etc.) amb la qualitat de vida dels pacients [118]. No obstant, aconseguir la remissió endoscòpica o curació mucosa serà molt important per millorar la prognosi de la malaltia [11].

El tractament a administrar vindrà determinat per l'extensió i gravetat de la malaltia, el tractament en curs i els tractaments previs [118]. Altres factors a tenir en compte inclouran la freqüència de brots, les manifestacions extra-intestinals, l'edat al diagnòstic i el temps d'evolució de la malaltia [119].

5.1. Inducció de la remissió

La primera opció terapèutica en pacients amb malaltia lleu o moderada amb extensió confinada al recte és la mesalazina (5-ASA) tòpica, mostrant una taxa de remissió clínica superior al 50% a les 3 setmanes de tractament i millora endoscòpica i histològica [120, 121]. En pacients amb major extensió es recomana l'administració de mesalazina tòpica i oral simultàniament [122].

Els pacients no responedors o intolerants a la mesalazina o amb major gravetat es tractaran amb corticosteroides locals o sistèmics. Tot i que la resposta a corticosteroides és molt bona (remissió clínica en més del 50% dels casos), aquests presenten alguns inconvenients: no aconsegueixen mantenir la remissió (es perd al cap d'un any en la meitat dels casos), una proporció important de pacients presenten dependència, i comporten molts efectes adversos [123, 124].

Per tal de minimitzar els efectes adversos associats als corticosteroides, s'ha desenvolupat una nova forma galènica per alliberar el fàrmac localment i d'eliminació ràpida per efecte de primer pas hepàtic; essent una nova via d'administració més segura i eficaç [125, 126].

Si no s'aconsegueix induir la remissió amb la mesalazina i/o els corticosteroides, aleshores estarà indicat el tractament amb immunosupressors, fàrmacs biològics i, en darrer terme, la cirurgia.

Els immunosupressors més comuns són les tiopurines (azatioprina i 6-mercaptopurina (6-MP)), que mostren una resposta i remissió clínica superior al 50%, acompanyada de remissió endoscòpica i eficàcia en el manteniment de la remissió. A més, presenten major eficàcia que la mesalazina a l'hora d'induir remissió lliure de corticosteroides [127–129].

Els pacients refractaris a immunosupressors seran candidats al tractament amb fàrmacs biològics, en monoteràpia o teràpia combinada amb immunosupressors. La primera opció serà l'ús d'anticossos contra TNF- α (Infliximab, Adalimumab i Golimumab) que donen molt bons resultats a nivell d'inducció i manteniment de la remissió clínica i endoscòpica [130–132]. Una alternativa recent als anti-TNF- α és el Vedolizumab, anticòs dirigit contra la integrina $\alpha 4\beta 7$ que regula el reclutament de limfòcits a l'intestí [133].

Cal destacar que en pacients amb brot moderat o greu, la teràpia biològica o amb immunosupressors d'inici d'acció ràpida amb ciclosporina o tacrolimus són opcions terapèutiques que han mostrat eficàcia.

Els pacients amb CU greu presenten major risc de sotmetre's a una colectomia i tenen una taxa de mortalitat del 1% aproximadament [16, 134]. Tots aquells casos amb CU greu han d'hospitalitzar-se i tractar-se intensament. Els corticosteroides intravenosos són la primera opció davant d'un brot greu, essent eficaços en el 60% dels casos. Aquells casos refractaris als esteroides necessitaran un tractament de rescat, estant indicada l'administració d'infliximab, ciclosporina o tacrolimus, abans de plantejar la cirurgia [135–137].

5.2. Manteniment de la remissió

Un cop induïda la remissió, l'objectiu és evitar un nou brot. L'estratègia terapèutica a seguir dependrà de l'extensió i gravetat inicial de la malaltia, el tractament administrat per induir la remissió i la manca de resposta a tractaments previs. La majoria dels pacients solen mantenir-se en remissió amb mesalazina [138], essent recomanat un augment de la dosi en aquells casos que presentin un brot [139].

Els corticosteroides no estan contemplats com a teràpia de manteniment pels efectes secundaris que presenten. Per contra, el tractament amb immunosupressors o biològics estarà indicat en aquells pacients que amb 5-ASA presenten brots sovint o en aquells pacients tractats amb ciclosporina o tacrolimus per un episodi agut de la malaltia [140, 141].

Finalment, l'opció terapèutica en els pacients als que se'ls ha induït la remissió utilitzant un fàrmac biològic (anti-TNF- α o anti- $\alpha 4\beta 7$) consistirà en seguir amb el mateix fàrmac per al manteniment [119].

5.3. Cirurgia

Tot i que gran part dels pacients responen correctament a un tractament farmacològic, aproximadament un 15% dels pacients necessitarà sotmetre's a cirurgia al llarg de la seva vida [142, 143]. La refractarietat als tractaments és la causa més comuna que obliga a realitzar una colectomia, però també pot donar-se per colitis fulminants, megacòlon tòxic, perforació intestinal o displàsia, entre altres. El procediment més comú és la colectomia total o sub-total amb ileostomia. En aquells casos en que estigui indicat, es procedirà posteriorment a una segona intervenció per a realitzar una anastomosi ili-rectal amb reservori [144]. Poden existir complicacions post-cirurgia a llarg termini incloent l'obstrucció de l'intestí prim, estenosi de l'anastomosi, fístules, inflamació del reservori i disfunció sexual [145, 146].

5.4. Noves opcions terapèutiques

La caracterització a nivell cel·lular i molecular que s'ha fet de la malaltia en els darrers anys ha permès identificar nous mecanismes implicats en la seva patogènesi i, conseqüentment, noves dianes terapèutiques. Entre aquestes destaquen molècules implicades en el transport de leucòcits, inhibidors de IL-12 i IL-23,

inhibidors de *Janus Kinases* (JAKs), moduladors del receptor de *sphingosine-1-phosphate* (S1P), i moduladors de la composició microbiana (transplantament fecal) (Taula 1) [118].

Tractament	Mecanisme d'acció
Inhibidors de <i>Janus Kinase</i>	
Tofacitinib	Inhibidor JAK1, JAK3
Filgotinib	Inhibidor JAK1
Peficitinib	Inhibidor JAK3
Upadacitinib	Inhibidor JAK1
Receptor antagonista de S1P 1-5	
Ozanimod	Modula S1P-1
Etrasimod	Modula S1P-1
Reclutament de leucòcits	
Etrolizumab	Bloqueja integrina $\beta 7$
PF-547659	Bloqueja MadCAM-1
Transplantament fecal	
Producte de múltiples donants	Interacció microbioma-sistema immunitari

Taula 1: Noves opcions terapèutiques. Tractaments en desenvolupament per a la CU en estudis clínics en fase III [118].

5.5. Càncer colorectal

Els pacients amb afectació del còlon (CU o MC amb afectació > 30% de la superfície colònica) presenten un augment del risc de desenvolupar càncer colorectal que s'associa a la inflamació crònica del tracte intestinal. Aquesta és una de les complicacions principals en la MII, representant entre el 10 i 15% de les morts [147, 148]. Per tant, el control d'aquests pacients per a la detecció de displàsia és fonamental, sobretot en aquells amb més de 8 anys d'evolució de la malaltia. Les vies carcinogèniques que s'atribueixen al CCR, com la inestabilitat cromosòmica i de microsatèl·lits i la hipermetilació, també es donen en els pacients amb CU. No obstant, a diferència dels individus lliures de MII, la mucosa intestinal de pacients amb MII mostra alterades aquestes vies prèviament a qualsevol evidència histològica de displàsia o càncer. Tot i que es desconeixen els motius, l'estrès oxidatiu i factors pro-inflamatoris de la immunitat innata i adaptativa hi podrien estar implicats [149]. Biomarcadors genètics que permetin identificar

aquells pacients que progressaran cap a un estat maligne, com la longitud dels telòmers, podrien ser claus per la seva vigilància [150].

Capítol II.

Monitoratge de la Colitis Ulcerosa

El monitoratge de les malalties cròniques, a part de reportar l'evolució d'aquestes, busca identificar alteracions que permetin anticipar-se a futurs brots.

Actualment, l'avaluació clínica, endoscòpica i l'anàlisi de diversos biomarcadors serològics com la proteïna C-reactiva (PCR) o la velocitat de sedimentació globular (VSG), i biomarcadors fecals com la calprotectina, són els procediments més habituals en el seguiment de pacients amb CU. D'aquests, l'estàndard de referència per a determinar l'activitat de la malaltia és la colonoscòpia acompanyada de l'avaluació histològica del teixit [151].

1. Índexs d'activitat

L'activitat de la CU es pot definir mitjançant diferents índexs associats al tipus d'examen mèdic realitzat. Al llarg dels anys s'han desenvolupat diversos índexs d'activitat clínica, endoscòpica i histològica, alguns dels quals són emprats en la pràctica clínica però sobretot imprescindibles per la realització d'estudis clínics.

1.1. Índexs d'activitat clínica

El primer índex d'activitat clínica associat a la CU es va definir l'any 1955 durant la realització del primer estudi clínic pel tractament de la CU. Aquest va ser descrit per *Truelove* i *Witts*, pel que se'l coneix com índex de Truelove-Witts [152, 153]. L'índex categoritza els pacients en lleus, moderats o greus a partir de la valoració de 6 paràmetres: nombre de deposicions al dia, presència de sang en femta, temperatura, pols, concentració d'hemoglobina, i VSG. L'ús d'aquest va permetre mostrar l'eficàcia de la cortisona en el tractament de la CU. Al cap de vint-i-tres anys, i continuant amb l'estudi de l'efecte dels corticosteroïdes, es va descriure l'índex de Powell-Tuck (1978), el primer índex quantitatiu basat en la valoració de 10 paràmetres clínics i un endoscòpic: estat general, dolor abdominal, nombre de deposicions diàries, consistència de les deposicions, presència de sang en femta, anorèxia, nàusees o vòmits, presència de massa abdominal, complicacions extraintestinals, temperatura i signat determinat en la sigmoidoscòpia [154].

Al cap d'uns anys es defineix l'índex de Mayo (1987), un índex que també combina paràmetres clínics i endoscòpics però molt més simplificat que els descrits amb anterioritat. A nivell clínic avalua la freqüència de deposicions, la presència de sang en femta, i a nivell endoscòpic l'activitat observada en la sigmoidoscòpia (Taula 2) [9]. Tot i que no es un índex validat formalment, és un dels més utilitzats en la pràctica per la seva simplicitat, reproductibilitat i correlació amb la qualitat de vida dels pacients [155, 156].

Paral·lelament es defineix un altre índex anomenat DAI (*Disease Activity Index*) o UCDAI (*UC Disease Activity Index*), que també inclou, a més dels paràmetres clínics, el resultat de la valoració endoscòpica. Aquest és pràcticament idèntic a l'índex de Mayo ja que només difereix en l'avaluació endoscòpica, que es basa exclusivament en la valoració del sagnat [157]. Posteriorment es descriuen altres índexs, tots ells basats únicament en paràmetres clínics, sense tenir en compte l'endoscòpia.

El 1988 es descriu el CAI (*Clinical Activity Index*), compost per 7 paràmetres: nombre de deposicions, presència de sang en femta, valoració global del clínic, dolor abdominal o rampes, temperatura associada a la colitis, manifestacions extraintestinals i alteracions serològiques (VSG i hemoglobina) [158, 159].

El 1990 es defineix l'índex de Lichtiger o índex de Truelove-Witts modificat, que converteix l'índex descrit l'any 1955 en un índex quantitatiu [160].

Posteriorment, l'any 1992 es defineix l'índex conegut com Seo o índex d'activitat (AI, *Activity Index*) [161]. Aquest es defineix en base a les categories de l'índex de Truelove-Witts, generant un índex que incorpora 5 paràmetres: presència de sang en les deposicions, nombre de deposicions, VSG, concentració d'hemoglobina i albúmina.

Per últim, el 1998, es descriu el SCCAI (*Simple Clinical Colitis Activity Index*) o índex de Walmsley [162].

Tots aquests índexs s'han utilitzat en diversos estudis, però no s'ha determinat un índex òptim per a l'avaluació clínica de la malaltia. En general, les divergències entre ells són baixes, i tots incorporen l'avaluació del nombre de deposicions i la presència de sang en femta. La major diferència rau en els índexs exclusivament clínics i els índexs compostos (avaluació clínica + endoscòpica). No obstant, el pes de l'avaluació endoscòpica en els índexs compostos (índex de Mayo, índex de Powell-Tuck i DAI) és petit, fent que la contribució d'aquest paràmetre no sigui

molt significativa [163, 164].

Índex de Mayo
Freqüència de deposicions
0 = nombre normal de deposicions (normal per al pacient)
1 = 1-2 deposicions més que l'habitual
2 = 3-4 deposicions més que l'habitual
3 = 5 o més deposicions de l'habitual
Presència de sang en femta
0 = absència de sang
1 = algunes traces de sang (en menys de la meitat de les deposicions)
2 = sang evident en la majoria de les deposicions
3 = només sang
Sigmoidoscòpia
0 = normal o malaltia inactiva
1 = activitat lleu (eritema, disminució patró vascular, friabilitat lleu)
2 = activitat moderada (eritema, absència patró vascular, friabilitat, erosions)
3 = activitat greu (hemorràgia espontània, úlceres)
Avaluació global del metge
0 = normal
1 = lleu
2 = moderada
3 = greu
<hr/> Total; suma de tots els paràmetres. De 0 a 12 <hr/>

Taula 2: Índex de Mayo. Sistema de puntuació per a la valoració de l'activitat de la CU [9].

1.1.1. *Patient-reported outcomes*

Últimament s'ha començat a investigar l'ús dels *patient-reported outcomes* (PROs) per al monitoratge de la MII [165].

Un PRO és una mesura de qualsevol paràmetre referent a l'estat de salut del pacient que descriu el pacient directament, de forma subjectiva. Un PRO pot ser una característica purament simptomàtica (p.e. dolor abdominal), conceptes més complexos com la capacitat per dur a terme activitats quotidianes, o molt més complexos com la qualitat de vida, que vindria a ser un concepte multifactorial que inclouria l'estat físic, psicològic i social de l'individu [166].

Així, en els estudis clínics, els PROs poden utilitzar-se per mesurar l'impacte d'una intervenció terapèutica. En el cas de la CU, una de les propostes per a la valoració de l'activitat clínica basada en PROs consisteix en l'ús de la freqüència de deposicions i la presència de sang en femta [167]. Ambdós PROs estan inclosos en tots els índexs clínics (Truelove-Witts, Powell-Tuck, Mayo, DAI, CAI, etc.) i es correlacionen amb la categoria de símptomes intestinals del IBDQ (*Inflammatory Bowel Disease Questionnaire*) [168, 169]. A més, l'absència de sang en femta s'associa amb la remissió endoscòpica [170].

Darrerament, alguns estudis clínics ja han incorporat l'ús de PROs en l'avaluació de la CU evidenciant-ne la seva utilitat [169, 171].

1.2. Índexs d'activitat endoscòpica

En el mateix estudi en el que es va definir l'índex Truelove-Witts (1955), es van realitzar sigmoidoscòpies i en funció de l'aparença de la mucosa intestinal es classificaven com: normal o gairebé normal, millora, no canvi o empitjorament [153]. Aquesta valoració era totalment subjectiva ja que no s'havia formalitzat una definició corresponent a cada categoria. Posteriorment es va avaluar la concordança entre observadors per determinar alteracions en la mucosa intestinal. Es va veure que la concordança era molt bona quan es determinaven paràmetres binaris com la presència o absència d'úlceres, el sagnat, o la friabilitat, mentre que quan es valoraven variables amb més de dues categories la variabilitat entre observadors augmentava considerablement. Així, es va començar a formalitzar la definició de l'activitat endoscòpica com: normal (patró vascular visible), inactiu (absència de sagnat, granular), activitat moderada (friable), actiu (sagnat espontani); classificació coneguda com índex de Baron [172]. Més endavant, aquest índex es va modificar per incorporar una nova categoria, l'activitat greu (presència d'úlceres), donant-se a conèixer com índex de Baron modificat [173].

El 1988, en el mateix estudi clínic en el que es descriu el CAI (*Clinical Activity Index*), es descriu el primer índex quantitatiu per a valorar exclusivament l'activitat endoscòpica, conegut com índex de Rachmilewitz. Aquest consisteix en un índex que avalua 4 paràmetres: granularitat, patró vascular, sagnat i lesions ulceratives (erosions, úlceres) [158]. Posteriorment, i en la mateixa línia que l'índex de Rachmilewitz, es descriu l'índex Sigmoidoscòpic (1993), que avalua 5 paràmetres: eritema, friabilitat, granularitat/úlceres i pèrdua de patró vascular

[174]. Al cap d'uns anys Hanauer et al. defineixen un nou índex qualitatiu de 4 categories (molt similar a l'avaluació endoscòpica de l'índex de Mayo), on 0 indica mucosa normal, 1 edema i/o pèrdua de patró vascular, 2 friabilitat i petèquies, 3 sagnat espontani i úlceres [175].

En els últims anys i lligat a la importància que està prenent la curació mucosa en la pràctica clínica, s'ha posat en relleu la necessitat d'un índex endoscòpic que defineixi l'activitat de forma fiable i reproduïble [11]. Amb aquest objectiu, i buscant reduir la variabilitat inter- i intra-observadors, el 2011 es va desenvolupar el UCEIS (*Ulcerative colitis endoscopic index of severity*) [176]. Un índex quantitatiu molt similar a l'índex endoscòpic de Rachmilewitz, que inclou la valoració del patró vascular, el sagnat, les erosions i les úlceres. Aquest índex s'ha validat en una cohort independent mostrant bona reproductibilitat i presenta molt bona correlació amb els PROs [177, 178].

Tots aquests índexs solen basar-se en l'avaluació de la part distal del còlon, que es pot explorar per sigmoidoscòpia; no obstant, existeix una major correlació amb índex clínics i major associació amb futurs brots quan s'avalua tota l'extensió del còlon [179]. Conseqüentment, l'últim índex que s'ha definit, anomenat índex endoscòpic de Mayo modificat (MMES, *Modified Mayo Endoscopic Score*) (Taula 3), té en compte tan el grau d'inflamació de la mucosa com l'extensió de la malaltia [180]. Tot i que encara s'ha de validar i inspeccionar la concordança inter- i intra-observadors, l'índex mostra bona correlació amb l'activitat clínica, histològica i biològica de la CU.

1.3. Índexs d'activitat histològica

L'examen histològic en la CU és un procediment fonamental per al seu diagnòstic i per a determinar l'activitat i la resposta terapèutica [181–183]. Aquest sol fer-se a partir de biòpsies del rectesigma, ja que acostuma a presentar activitat en els diferents brots de la malaltia i, a més, és de fàcil accés. S'han descrit diversos índex d'activitat histològica que, en general, es basen en l'avaluació d'una secció histològica d'una biòpsia tenyida amb hematoxilina-eosina.

Segment	Recte	Sigma	Còlon esquerra	Còlon transvers	Còlon dret	Total
Avaluat 0=No avaluat 1=Avaluat total o parcialment						EM
Inflamació 0=índex de Mayo endoscòpic de 0 1=índex de Mayo endoscòpic > 0						NSI
Índex endoscòpic de Mayo (0-3)						MS

$$\text{Índex endoscòpic de Mayo modificat} = (\text{MS} \times \text{EM}) / \text{NSI}$$

Taula 3: Índex endoscòpic de Mayo modificat (MMES). Sistema de puntuació per a la valoració de l'activitat endoscòpica de la CU. EM; extensió màxima = suma dels segments corresponents a l'extensió màxima avaluada. NSI; nombre de segments inflamats = suma del nombre de segments inflamats. MS; índex modificat (*Modified Score*) = suma de l'índex endoscòpic de Mayo per cada segment. [180]

Les alteracions histològiques associades a la CU inclouen un augment de l'infiltrat leucocitari (cèl·lules mononuclears i polimorfonuclears en làmina pròpia i criptitis), alteracions estructurals de les criptes (disminució del nombre de cèl·lules calciformes, variabilitat en el diàmetre i la distància entre criptes, i fusió de criptes) i disrupció de la mucosa epitelial (úlceres) (Figura 2)[12].

El primer índex histològic es va descriure l'any 1956 i es va anomenar índex de Truelove and Richards, classificant la mostra histològica com a: no inflamada, inflamació lleu-moderada o inflamació aguda [182]. El 1961 es va definir el *Matts Score* (Taula 4), i el 1966 el *Watts Score*, que fan una valoració histològica en una escala de 5 i 4 punts, respectivament [184, 185]. De forma successiva, s'han arribat a descriure fins a 18 índexs diferents, amb petites variacions entre uns i altres, però sense assolir un índex consens per a l'activitat histològica de la CU [186]. No obstant, en els estudis de la CU actuals es fan servir índexs descrits recentment i validats, com: l'índex histològic de Robarts [187] o l'índex histològic de Nancy [188].

En general, existeix una bona correlació entre la valoració endoscòpica i histològica, sobretot quan hi ha presència d'inflamació [189, 190]. No obstant, alteracions microscòpiques persisteixen en mostres macroscòpicament inactives, i s'ha demostrat que pacients clínicament i endoscòpicament inactius que presenten evidències histològiques d'inflamació tenen un risc més elevat de tenir un brot durant el següent any [182, 190–193]. Tot i així, l'avaluació histològica no s'utilitza com a objectiu terapèutic degut a la manca d'estàndards, els costos associats a la tècnica i el desconeixement dels beneficis a nivell pràctic [11, 194].

Matts Score

1	=	normal
2	=	lleu infiltrat a la mucosa o làmina pròpia de cèl·lules inflamatòries
3	=	infiltrat considerable a la mucosa, làmina pròpia i submucosa
4	=	presència d'abscessos en les criptes i infiltrat inflamatori a totes les capes de la mucosa
5	=	úlceres, erosions o necrosi de la mucosa amb infiltrat inflamatori en les capes de la mucosa

Taula 4: *Matts Score*. Sistema de puntuació per a la valoració de l'activitat histològica de la CU [184].

2. Biomarcadors per al diagnòstic i monitoratge de la CU

Un biomarcador és una molècula indicadora de l'estat d'un procés biològic. Aquests són objectius i sensibles als canvis, pel que permeten diferenciar entre processos biològics normals i patològics. Es considera un bon biomarcador aquell que sigui precís, reproducible, estandarditzat, fàcil d'interpretar i amb alta sensibilitat i especificitat diagnòstica [195].

En la CU, la colonoscòpia és l'estàndard de referència per avaluar l'activitat de la malaltia, essent un procediment costós, invasiu, incòmode pel pacient i que pot comportar complicacions. L'avaluació clínica, realitzada de forma més contínua per al seguiment de la malaltia, dona una valoració aproximada de l'estat del pacient. No obstant, la simptomatologia clínica no sempre s'associa a l'activitat endoscòpica; pacients sense inflamació de la mucosa poden presentar simptomatologia clínica i viceversa [196, 197]. En conseqüència, l'ús de biomarcadors en el diagnòstic i monitoratge de la CU és fonamental.

2.1. Biomarcadors serològics i sanguinis

Durant un brot agut de CU es poden detectar en sang i sèrum diversos marcadors associats a la resposta inflamatòria. Els més característics són [198]:

- Augment de la producció de proteïnes involucrades en la coagulació i la fibrinòlisi, com: fibrinogen, plasminogen, factor VIII i protrombina.
- Detecció de components del sistema del complement: inhibidor C1, C1s, C2, C4, C5 i C9.
- Inhibidors de proteïnases: α 1-antitripsina, α 1-antichymotrypsin.
- Transportadors de proteïnes: haptoglobina i ceruloplasmina.
- Altres proteïnes de fase aguda: PCR, sèrum amiloide A (SAA), ferritina, fibronectina i orosomucoide.
- Augment de citocines: TNF- α , IFN- β , TGF- β , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17 i IL-23.

A més, els components cel·lulars de la sang també s'alteren amb l'activitat de la malaltia, mostrant un augment de leucòcits i del recompte de plaquetes, així com un augment de la velocitat de sedimentació globular (VSG). No obstant, pocs marcadors han sigut validats i només alguns s'utilitzen en la pràctica clínica habitual. La PCR, l'albúmina i la VSG són els més usats [151].

La detecció de determinats anticossos també pot ajudar en el diagnòstic d'una malaltia. En la CU, la presència de p-ANCA sol detectar-se en un 20-80% dels casos i, tot i que la sensibilitat no és molt alta, sí que presenta bona especificitat, podent contribuir en el diagnòstic de la malaltia, sobretot en la diferenciació entre CU i MC[199]. La resta d'anticossos estudiats fins ara es detecten en menys del 20% dels pacients, tractant-se de: ASCA (anticossos contra *Saccharomyces cerevisiae*, associat a la MC), Anti-OmpC (anticossos contra canals proteics de la membrana externa bacteriana), Anti-Cbir1 (anticosso contra flagelina), Anti-I2 (*pseudomonas fluorescence-associated sequence I-2*), ALCA (*antilaminaribioside carbohydrate IgG*), ACCA (*antichitobioside carbohydrate IgA*), ASMA (*antisynthetic mannoside antibodies*), anticossos pancreàtics i anticossos contra p53 [200].

2.2. Biomarcadors fecals

Els biomarcadors serològics o sanguinis, a excepció dels anticossos, són característics de qualsevol procés inflamatori, estigui o no vinculat amb la MII. Per contra, els biomarcadors fecals poden presentar una major especificitat per a processos patològics intestinals.

Trobem biomarcadors que ens indiquen la destrucció de la barrera epitelial, com α 1-antitrypsin i la sang oculta en femta. No obstant, aquests no són tan específics de la MII com els productes associats a la desgranulació leucocitària, com: lisozima, mieloperoxidasa, proteïna eosinofílica catiònica, proteïna eosinofílica X, lactoferrina, metaloproteïnasas de la matriu (MMP)-9, neopterina, la elastasa polimorfonuclear (*PMN-Elastase*) i la caplprotectina. Tots ells es troben elevats durant la fase activa de la malaltia en comparació amb individus sans i pacients inactius [201, 202].

A més, les proteïnes associades a la resposta inflamatòria no infecciosa, conegudes com DAMPs (damage-associated molecular pattern), són molècules estables en femta i que augmenten en la MII activa. Les més conegudes i emprades en l'àmbit hospitalari són S100A8/S100A9, complex conegut com calprotectina, i S100A12 [201].

Els nivells de piruvat quinasa M2 (M2-PK), enzim implicat en el procés metabòlic de la glucosa, i de *chitinase 3-like-1* (CHI3L1), una glicoproteïna soluble, també estan elevats en les deposicions de pacients amb MII [203].

Actualment, la calprotectina es considerada un bon biomarcador de l'activitat de la malaltia, i està esdevenint una prova assistencial més [204–206]. No obstant, els biomarcadors fecals tenen alguns inconvenients associats com l'acceptabilitat del pacient per a la recollida de la mostra i, tot i presentar major especificitat per alteracions intestinals, aquesta especificitat no és exclusiva de la MII [207]. La calprotectina fecal no augmenta únicament en pacients amb MII, sinó que pot estar augmentada en diferents patologies com CCR, gastroenteritis víriques o bacterianes, diverticulitis, intoleràncies alimentàries, enteropaties per AINES, i enteritis ràdica [208]. A més, s'ha determinat certa variabilitat entre mostres d'un mateix individu recollides en diferents moments del dia, i major sensibilitat i especificitat en població adulta que en infants [209–211].

2.3. Biomarcadors en orina

A dia d'avui no hi ha cap biomarcador en orina validat i que s'estigui utilitzant en la pràctica clínica per a la MII. No obstant, sí que se n'han investigat alguns com: *leukotriene E4* (LTE4), *prostaglandin E-Major Urinary Metabolite* (PGE-MUM), *neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (NGAL), i neopterina [212–215]. A excepció de NGAL, que no mostra associació amb la CU, la resta de biomarcadors sí que es relacionen amb l'activitat de la malaltia.

2.4. Futurs biomarcadors

Els avanços tecnològics dels últims anys han revolucionat la cerca de nous biomarcadors mitjançant l'estudi de diferents òmiques: transcriptòmica, proteòmica i metabolòmica.

L'anàlisi de l'expressió gènica en sang ja s'ha utilitzat i validat per a l'estratificació de pacients en alt i baix risc per al desenvolupament de CCR i per predir el risc individual de desenvolupar CCR [216, 217]. En el cas de la MII, l'estudi transcripcional en sang perifèrica mostra indicis del seu potencial. Tot i que són resultat preliminar que necessiten ser validats, s'han descrit perfils transcripcionals associats a l'activitat clínica de la MC i la CU i alguns panells de gens capaços de diferenciar entre pacients amb CU i MC [218–220].

Per altra banda, s'ha avaluat el poder predictiu del transcriptoma de sang perifèrica per determinar la resposta a infliximab en pacients amb MC, i en el cas de la CU, s'han descrit els canvis transcripcionals associats a la resposta a corticosteroides en infants [221, 222]. Alguns dels gens que s'associen a la resposta a corticosteroides en CU són *HP*, *CD177*, *OLFM4* i *MMP8*, tots ells relacionats amb la població de neutròfils circulants.

Tot i que són resultats molt preliminar, obren una nova àrea d'investigació per a determinar nous biomarcadors no invasius per al diagnòstic i monitoratge de la MII.

En teixit, l'anàlisi transcripcional de biòpsies ha resultat ser una mesura sensible i acurada de la inflamació intestinal. Tot i que s'han descrit variacions transcripcionals entre les diferents regions del tracte intestinals, s'han pogut determinar marcadors inflamatoris independentment de la localització de la biòpsia

[223, 224]. En concret, el 2014 es valida l'expressió de diferents biomarcadors d'inflamació en diferents regions del còlon tot correlacionant-los amb l'índex endoscòpic de Mayo [225]. S'identifiquen *IL1b*, *IL6*, *IL8*, *TNF α* , *IP10*, *CXCL13*, *MMP3* i *S100A8* com a bons biomarcadors d'activitat en els diferents segments del còlon (còlon dret, transvers, esquerre i recte). També s'han descrit biomarcadors implicats en el diagnòstic de la CU, com *CALM3* i *ARHGDI1A*, que estan augmentats en els pacients amb CU, tant en zones de mucosa inflamades com sana, respecte controls sans [226].

A nivell metabòlic s'ha vist que els nivells de L-arginina (L-Arg) estan augmentats en pacients amb CU, tant en sèrum com en teixit, mostrant una bona correlació amb el grau d'activitat [227, 228]. I a nivell proteòmic s'han detectat 4 proteïnes en sèrum que podrien tenir-se en compte com a possibles biomarcadors per al diagnòstic de la MII, tractant-se de PF4, MRP8, FIBA i Hp- α 2 [229].

Capítol III.

Estudi transcripcional de la Colitis Ulcerosa

La transcriptòmica, paraula composta que deriva del sufix grec “ome” (totalitat d’alguna cosa), estudia el conjunt de transcrits que existeixen en una cèl·lula, teixit o òrgan en un moment i condicions determinades.

Aquesta neix gràcies als avenços tecnològics a finals del segle XX, juntament amb moltes altres òmiques: genòmica, epigenòmica, transcriptòmica, proteòmica, metabolòmica, glicòmica i lipidòmica [230]. L’ús d’aquestes tècniques per als estudis clínics és cada cop més extens i algunes ja s’han traslladat satisfactòriament a la pràctica clínica. Un exemple n’és un test pronòstic per al càncer de mama que analitza l’àcid ribonucleic missatger (ARNm) d’un panell de 21 gens (OncotypeDx) i que actualment ja està recomanat en la guia de pràctica clínica [231].

En el cas de la MII, les òmiques han pres un paper molt important en la recerca bàsica però encara no han fet el salt a la clínica. No obstant, aquestes poden ser primordials per a determinar noves dianes terapèutiques i biomarcadors d’activitat, i una eina clau en la identificació de nous biomarcadors capaços de predir respostes terapèutiques, detectar pacients amb major predisposició a patir un nou brot o identificar aquells que després d’una intervenció quirúrgica són més susceptibles a recidivar [198].

1. El transcriptoma

En l’individu humà trobem més de 20.000 gens [232, 233]. Un gen pot definir-se com una regió del genoma que conté informació per a generar una seqüència d’ARN (o transcrit) que codificarà una proteïna. Aquesta regió del genoma, a part de la seqüència que es transcriurà en una molècula d’ARN, també conté seqüències reguladores (promotors i potenciadors) (Figura 5), que controlaran quan, on, i en quina quantitat es transcriu un determinat gen.

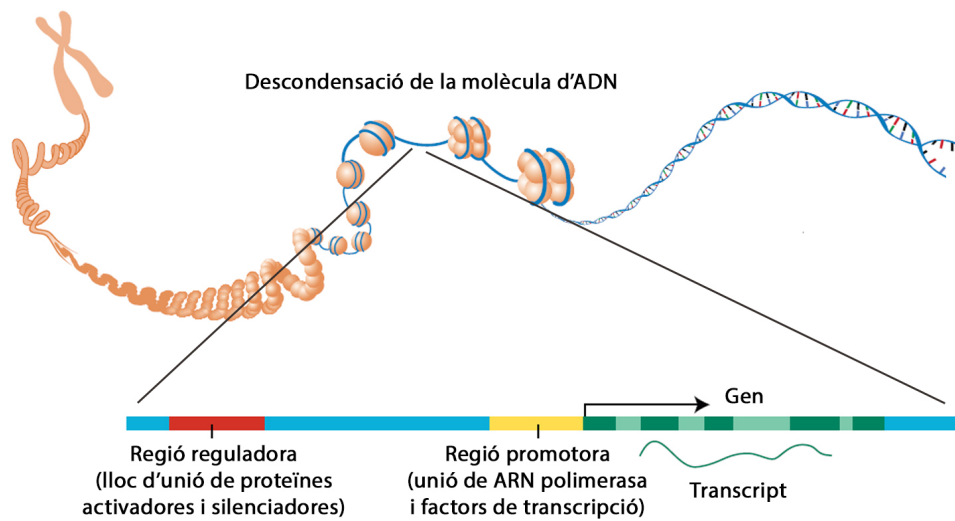


Figura 5: Representació de l'estructura típica d'un gen eucariota. Aquesta inclou una regió promotora i reguladora, i una unitat transcripcional. Adaptat de [234].

El pas de la seqüència d'àcid desoxiribonucleic (ADN) d'un gen a una molècula d'ARN es coneix com a transcripció; un procés complex i que està regulat per diferents factors. Alguns dels principals factors implicats en la transcripció són les modificacions de les histones, que controlaran la compactació de la cromatina permetent o no la transcripció d'un gen; els factors de transcripció, que s'acoblen a la seqüència promotora del gen per poder iniciar la transcripció; i les proteïnes activadores i repressores, implicades en el control de la velocitat de transcripció.

L'estudi de l'expressió dels diferents transcrits va iniciar-se amb el desenvolupament de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) i el descobriment de la transcriptasa inversa, permetent sintetitzar ADN a partir d'una seqüència d'ARN i amplificar-lo [235, 236]. Posteriorment, es va desenvolupar la PCR a temps real, tècnica que continua sent molt utilitzada a dia d'avui per a la quantificació de l'expressió gènica de determinats gens d'interès [237].

Entrant a l'era de les òmiques, a finals dels anys 90 van arribar al mercat els microarrays, tecnologia que permet analitzar el transcriptoma cel·lular, tissular o d'un òrgan (més de 47.000 transcrits per mostra) mitjançant anàlisis d'expressió diferencial [238]. En els darrers anys, la seqüenciació d'ARN (RNA-Seq o *next-generation sequencing* (NGS)) ha revolucionat el món de la transcriptòmica. Aquesta és una tècnica més precisa i versàtil que, a part de determinar alteracions en l'expressió gènica, permet detectar transcrits resultants de l'empalament alternatiu, modificacions post-transcripcionals, fusions genètiques i polimorfismes. A més, a part d'informació relacionada amb l'ARNm també pot determinar l'expressió de ARN de mida petita (miARN), ARN ribosomal (ARNr) i ARN de transferència (ARNt), entre altres [239]. Tot i els avantatges d'aquesta tecnologia respecte les anteriors, aquesta està limitada per l'elevat cost computacional i de processament, i el cost econòmic.

2. Control transcripcional de la resposta inflamatòria

La inflamació és una resposta multifactorial lligada a l'estrès tissular, el dany i la infecció. Un dels punts claus en el control d'aquesta resposta es troba a nivell transcripcional [240]. La resposta inflamatòria requereix l'activació d'un complex programa transcripcional que és específic tan del tipus cel·lular com de l'estímul, i que inclou la regulació de centenars de gens [241]. La regulació d'aquests gens es dona, principalment, mitjançant l'activació de diferents factors de transcripció com: NF- κ B (*nuclear factor of the k light chain enhancer of B cells*), IRFs (*interferon regulatory factors*), STAT (*signal transducers and activators of transcription*), i AP-1 (*activator protein 1*) [242–245].

Si entrem en detall en la resposta transcripcional d'un tipus cel·lular concret, per exemple els macròfags, quan se'ls presenta un estímul bacterià com és un lipopolisacàrid (LPS; molècula característica de la membrana externa dels bacteris gramnegatius), veurem com aquesta resposta passa per diferents fases i s'associa a varis factors de transcripció (Figura 6) [240].

La resposta inflamatòria sol iniciar-se a través de diferents vies de senyalització que activaran factors de transcripció latents comuns en diferents tipus cel·lulars, com NF- κ B i IRF. Aquests factors de transcripció promouran l'expressió de citocines inflamatòries com TNF- α , IL-6 i IL-1 β , i de factors de transcripció com

CCAAT/enhancer-binding protein- δ (C/EBP- δ) i Activating transcription factor (ATF3), que s'encarregaran de regular la transcripció d'altres gens inflamatoris. Simultàniament, i vinculat al procés inflamatori, tindrà lloc la diferenciació dels macròfags cap a un determinat fenotip mitjançant l'activació d'altres factors de transcripció específics, com PU.1, RUNX1, IRF8 i C/EBP- β .

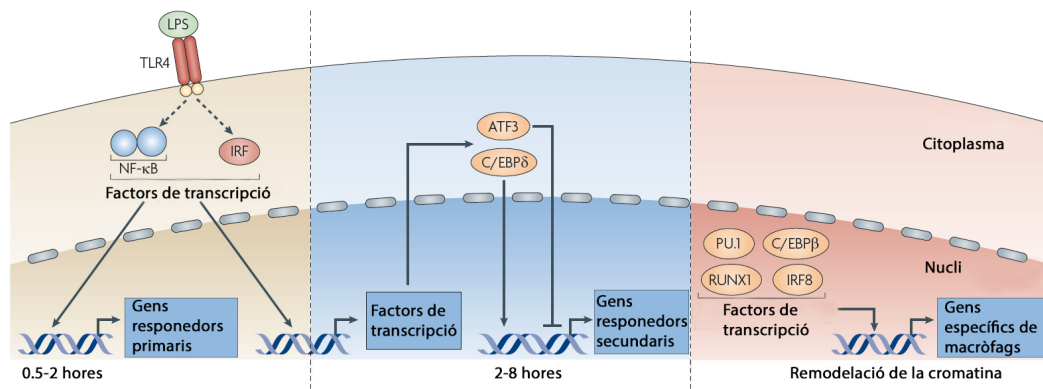


Figura 6: Esquema de la resposta induïda per lipopolisacàrids (LPS) en macròfags. La detecció del LPS activarà la senyalització via el receptor tipus Toll (TLR) induint l'activació i translocació nuclear de factors de transcripció com $\text{NF-}\kappa\text{B}$ i IRF. Aquests factors de transcripció controlen l'expressió de gens responedors primaris i d'altres factors de transcripció. ATF3 i C/EBP- δ són alguns dels factors de transcripció activats en la resposta primària i que s'encarregaran de controlar l'expressió de gens responedors secundaris. Indirectament, els senyals pro-inflamatoris promouen la diferenciació dels macròfags activant l'expressió de factors de transcripció com PU.1, C/EBP- β , RUNX1 i IRF8 que en determinaran el fenotip. Adaptat de [240].

D'aquesta manera, a partir de l'anàlisi transcripcional d'una cèl·lula, teixit o òrgan, podem caracteritzar l'estat d'aquella mostra i determinar-ne els processos i mecanismes alterats respecte un estat de referència.

3. Caracterització transcripcional de la mucosa intestinal inflamada

En el context d'un teixit inflammat, alteracions transcripcionals tenen lloc tan en les cèl·lules parenquimàtiques com en les cèl·lules infiltrants del sistema immunitari [241].

Al voltant de l'any 2000 es comencen a fer els primers estudis del transcripciona de la mucosa intestinal de pacients amb CU. L'anàlisi comparatiu entre

mostres inflamades i mostres no inflamades o controls sans posa en relleu un elevat nombre de gens diferencialment expressats en la mucosa intestinal d'aquests pacients. Els gens identificats s'associen amb l'activitat de la malaltia i estan implicats en diferents funcions immunoreguladores, estructurals i de metabolisme, i creixement cel·lular; esdevenint una mesura sensible i acurada de la inflamació intestinal [246–250].

3.1. Alteracions estructural i de permeabilitat de la mucosa intestinal

La mucosa intestinal està formada per una capa de cèl·lules epitelials que es renova de forma constant cada 4-5 dies format criptes al llarg de tota la superfície còlica. La majoria de les cèl·lules que formen la capa epitelial són enteròcits, però també es troben cèl·lules calciformes i neuroendocrines (Figura 2). Subja-cent a aquesta capa trobem la làmina pròpia, que consisteix en un teixit connectiu lax molt compressible i elàstic. Aquesta capa és rica en xarxes vasculars, vasos limfàtics, terminacions nervioses i diferents tipus de fibres com el col·lagen. A més, també s'hi localitzen diferents cèl·lules immunitàries. Per sobre de la capa epitelial trobem una capa de moc que és produïda per les cèl·lules calciformes i composta principalment per mucines (Figura 7) [251].

Els pacients amb CU activa presenten alteracions transcripcionals de diversos components relacionats amb la matriu extracel·lular, com una sobre-expressió de col·làgens i metal·loproteïnases, alteracions en les unions inter-cel·lulars i un canvi en la composició del moc [252]. Al mateix temps, l'anàlisi transcripcional mostra una disminució de marcadors epitelials (p.e. EPCAM), indicant la disrupció de l'epiteli que pot tenir lloc durant el procés inflamatori (Taula 5).

3.2. Funcions immunoreguladores: reclutament cel·lular, activació i mediadors inflamatoris

El sistema immunitari és el responsable de protegir l'organisme d'agents externs mitjançant el reconeixement i l'eliminació de patògens. Aquest procés està regulat tan per la resposta immunològica innata com l'adaptativa.

La resposta immunològica innata presenta dues funcions principals: la detecció dels agents patògens i la consegüent activació de mecanismes per a la seva eliminació.

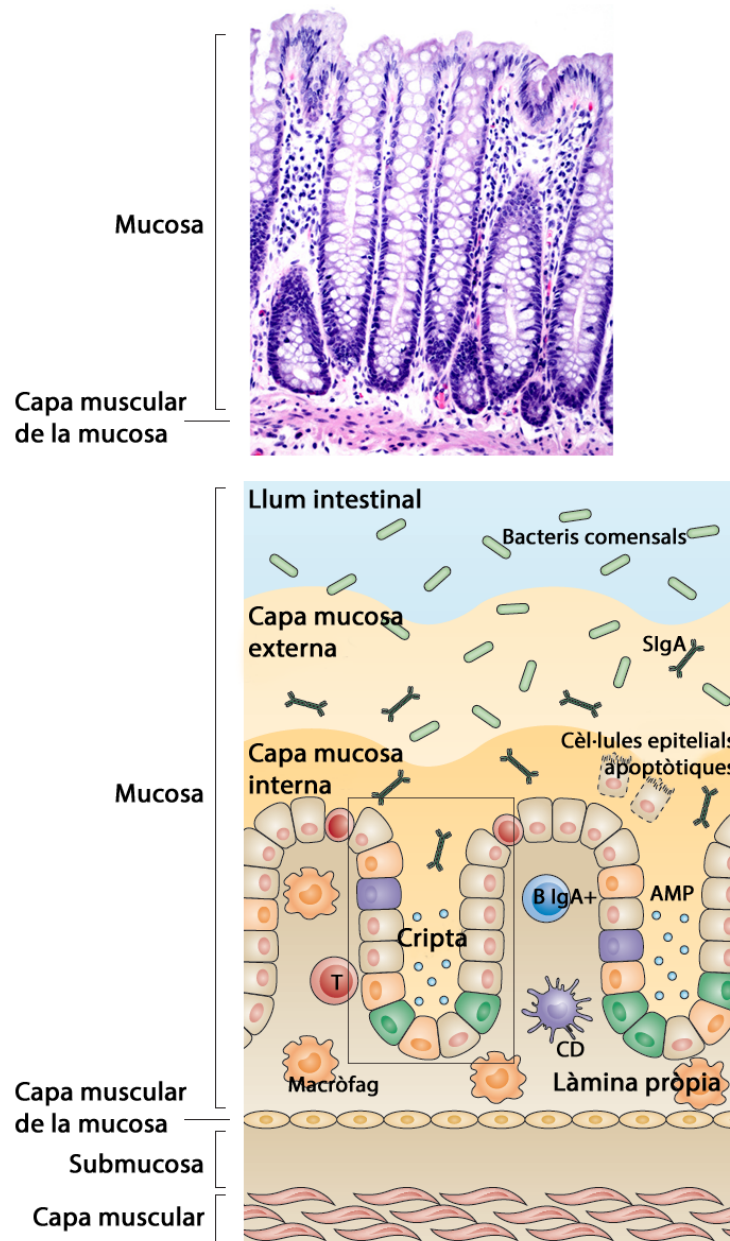


Figura 7: Estructura de la mucosa intestinal. Secció histològica d'una biòpsia del còlon tenyida amb hematoxilina-eosina. En la secció es mostra la capa mucosa i la muscular de la mucosa. A sota hi ha una representació de totes les capes i components de la mucosa intestinal, de la llum intestinal fins a la capa muscular de la mucosa. Començant per la llum intestinal trobem una capa de moc externa i una d'interna, amb presència de bacteris comensals i immunoglobulines A (SIgA, *secretory immunoglobulin A*), i també cèl·lules epitelials apoptòtiques, conseqüència de la constant renovació epitelial. Per sota del moc hi trobem les cèl·lules epitelials (enteròcits, cèl·lules calciformes, neuroendocrines i cèl·lules mare) que es distribueixen de forma contínua formant criptes. Contigu a la barrera epitelial hi ha la làmina pròpia, on s'hi localitzen cèl·lules leucocitàries encarregades de controlar la resposta immunològica. AMP, pèptids antimicrobians; CD, cèl·lula dendrítica; T, cèl·lula T; B IgA+, cèl·lula B que expressa immunoglobulina A. Adaptada de [251].

Gen	Nom del gen	Funció
<i>COL1A1</i>	<i>collagen type I, alpha 1</i>	Col·lagen de la matriu extracel·lular
<i>COL6A2</i>	<i>collagen type 6, alpha 2</i>	Col·lagen de la matriu extracel·lular
<i>MMP1</i>	<i>Matrix Metalloproteinase 1</i>	Col·lagenasa intestinal
<i>MMP2</i>	<i>Matrix Metalloproteinase 2</i>	Col·lagenasa intestinal
<i>MMP3</i>	<i>Matrix Metalloproteinase 3</i>	Degradació de la matriu extracel·lular
<i>MMP12</i>	<i>Matrix Metalloproteinase 12</i>	Metaloelastasa
<i>MUC1</i>	<i>Mucin 1</i>	Barrera mucosa
<i>MUC13</i>	<i>Mucin 13</i>	Barrera mucosa
<i>SPARC</i>	<i>Secreted Protein Acidic And Cysteine Rich</i>	Síntesis matriu extracel·lular
<i>TIMP1</i>	<i>TIMP Metalloproteinase Inhibitor 1</i>	Inhibidor de metaloproteïnases
<i>CDH11</i>	<i>Cadherin 11</i>	Unions inter-cel·lulars
<i>TFF1</i>	<i>Trefoil factor 1</i>	Barrera mucosa
<i>ADAM15</i>	<i>ADAM Metalloproteinase Domain 15</i>	Adhesió cel·lular
<i>MMP9</i>	<i>Matrix Metalloproteinase 9</i>	Col·lagenasa intestinal
<i>MMP10</i>	<i>Matrix Metalloproteinase 10</i>	Degradació de la matriu extracel·lular
<i>ADAM9</i>	<i>ADAM Metalloproteinase Domain 9</i>	Adhesió cel·lular
<i>EPCAM</i>	<i>Epithelial Cell Adhesion Molecule</i>	Marcador cèl·lula epitelial
<i>VIL1</i>	<i>Villin 1</i>	Marcador cèl·lula epitelial

Taula 5: Estructura i permeabilitat. Gens associats amb l'estructura i permeabilitat de la mucosa intestinal que es veuen alterats en la mucosa intestinal de pacients amb CU activa.

La detecció dels agents forans es realitza a través d'uns sensors capaços de reconèixer patrons moleculars específics, anomenats PRRs (*pattern-recognition receptors*). Els PRRs són capaços de reconèixer patrons moleculars específics de patògens (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*) i patrons moleculars associats al dany (DAMPs, *damage-associated molecular patterns*). S'han descrit diferents tipus de PRRs: els TLRs, els *retinoid acid inducible gene (RIG)-I-like receptors* (RLRs; com RIG-I, MDA5 i DAI) i els *nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)-like receptors* (NLRs; com NOD1, NOD2, NLRP3 and AIM2)(Taula 6) [253].

Receptor	Localització	Comp. microbians	Origen
TLRs			
TLR1/2	Superfície cel·lular	Triacyl lipopeptids	Bacterià
TLR2/6	Superfície cel·lular	Diacyl lipopeptids	Micoplasma Lipo-teichoic
		Lipoteichoic acid	Bactèries gram positiva
TLR2	Superfície cel·lular	Lipoproteins	Patògens diversos
		Peptidoglycan	Bactèries gram-positiva i -negativa
		Lipoarabinomannan	Micobacteri
		Porines	<i>Neisseria</i>
		Glicoproteines de l'embolcall	Virus
		GPI-mucin	Protozous
		Phospholipomannan	<i>Càndida</i>
		Zymosan	Fongs
		b-Glycan	Fongs
TLR3	Superfície cel·lular/endosomes	ARNds	Virus
TLR4	Superfície cel·lular	LPS	Bactèries gramnegatives
		Glicoproteines de l'embolcall	Virus
		<i>Glycoinositolphospholipids</i>	Protozous
		Mannan	<i>Càndida</i>
		HSP70	Organisme
TLR5	Superfície cel·lular	Flagel	Bactèries flagel·lades
TLR7/8	Endosome	ARNss	ARN de virus
TLR9	Endosome	ADN CpG	Virus, bacteries, protozous
NLRs			
NOD1	Citoplasma	<i>Diaminopimelic acid</i>	Bactèries gramnegatives
NOD2	Citoplasma	MDP	Bactèries gram-positiva i -negativa
NALP1	Citoplasma	MDP	Bactèries gram-positiva i -negativa
NALP3	Citoplasma	ATP, uric acid crystals, ARN, ADN, MDP	Virus, bacteris i hoste

Taula 6: *Pattern-recognition receptors* (PRRs). Tipus de PRRs per al reconeixement de components microbians [253].

La senyalització a través d'aquests receptors promou tan l'activació com la translocació nuclear de factors de transcripció (IRFs, NF κ B i AP-1) associats a l'expressió de citocines pro-inflamatòries (IFN- α/β , TNF- α i pro-IL1 β) o la formació de l'inflammasoma (Figura 8) [254].

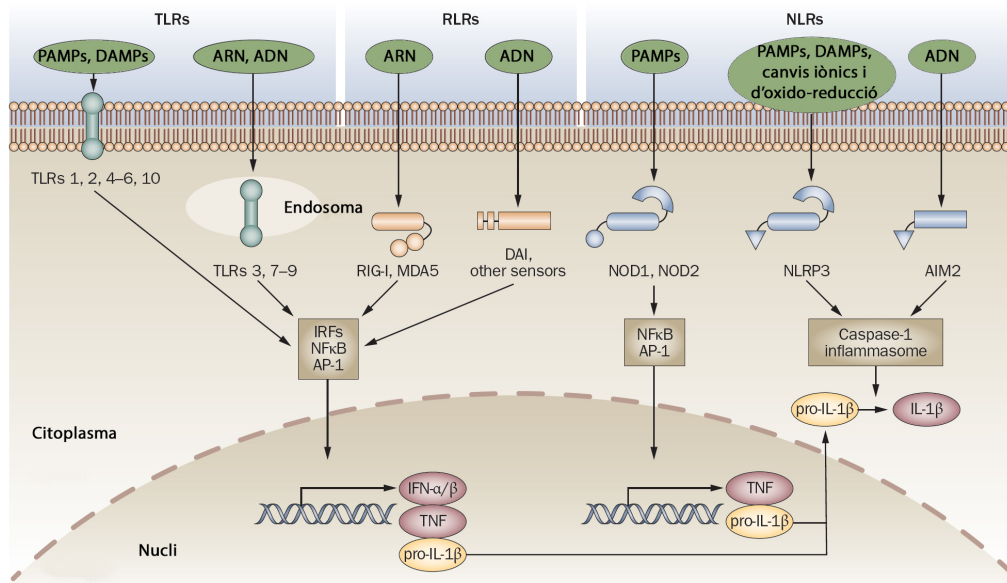


Figura 8: Sensors de la immunitat innata. Els TLRs, RLRs i NLRs són sensor de la immunitat innata que reconeixen DAMPs, PAMPs o àcids nucleics que es troben a la superfície cel·lular, en endosomes o al citoplasma cel·lular. La senyalització per aquests sensors promou l'activació i translocació de factors de transcripció responsables de la producció de citocines inflammatòries. Adaptat de [254].

Les cèl·lules epitelials, a part de formar una barrera física indispensable per a la defensa de l'organisme contra l'entrada d'agents externs, també presenten funcions immunoreguladores mitjançant l'expressió de PRRs. En aquest tipus cel·lular, la senyalització per PRRs i altres receptors de citocines i quimiocines (com CCR5, CCR6 i CXCR4) desencadena la producció de factors inflamatoris relacionats amb la producció de mucines (MUC1, MUC13), agents antimicrobians (DEFA5, DEFA6, LYZ, REG3A) i quimiotaxis de leucòcits (IL8, CXCL1, CXCL3, CCL20 i CXCL9) [255, 256].

L'expressió de PRRs en les cèl·lules leucocitàries del sistema immunitari innat és característica de neutròfils, macròfags i cèl·lules dendrítiques. La senyalització per aquests sensors induïx l'expressió de diverses molècules efectores. A més, en macròfags i cèl·lules dendrítiques (cèl·lules presentadores d'antígens, APCs)

indueix l'activació del complex d'histocompatibilitat principal (MHC; *major histocompatibility complex*) i de molècules co-estimuladores, esdevenint un vincle clau entre el sistema immunitari innat i adaptatiu.

El MHC interacciona amb els receptors de les cèl·lules T naïve (TCRs, *T-cell receptors*) induint la maduració i diferenciació de les cèl·lules T (Figura 9).

La senyalització per TLRs (un tipus de PRRs) també és capaç d'induir l'expressió de diferents citocines, incloent IL-12, que estimularà la diferenciació de les cèl·lules T cap a un fenotip Th1 independentment de la presentació antigènica [257].

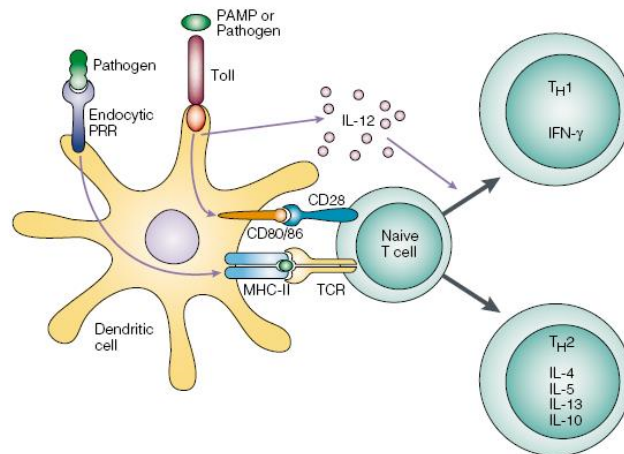


Figura 9: Resposta d'una cèl·lula dendrítica a la senyalització per PRRs. La cèl·lula presentadora d'antigen reconeixerà el patògen mitjançant els PRRs i conseqüentment tindrà lloc la migració i presentació de l'antigen a les cèl·lules T naïve per induir la resposta immunològica adaptativa. Adaptat de [257].

Les cèl·lules B, tot i considerar-se part del sistema immunitari adaptatiu, mostren funcions associades a una resposta immunològica innata. Aquestes presenten PRRs per a PAMPs capaços d'activar el MHC i presentar antígens a les cèl·lules T. No obstant, les cèl·lules B es caracteritzen per presentar una resposta antigen específica que és regulada per la senyalització a través del receptor de les cèl·lules B (BCR, *B-cell receptor*) i la interacció amb les cèl·lules T cooperadores. L'activació de les cèl·lules B per BCR induïx la maduració i diferenciació de les cèl·lules B a cèl·lules plasmàtiques (secretores d'anticossos) o cèl·lules B memòria.

Els anticossos secretats per les cèl·lules plasmàtiques col·laboren en l'eliminació d'agents patògens a través de diferents mecanismes: neutralitzant directament els agents patògens, activant de la cascada del complement o interactuant amb altres cèl·lules del sistema immunitari [258].

El sistema del complement, consisteix en un conjunt de proteïnes produïdes principalment pel fetge que es localitzen en el plasma o en les superfícies cel·lulars com a precursors inactius (zimogens). L'activació del complement pot donar-se per la unió a anticossos (principalment anticossos IgG i IgM) o la unió a proteïnes de fase aguda (com la PCR, el fibrinogen, l'haptoglobina i la MBL (mannose-binding lectin)). El complement regula la resposta a senyals inflamatòries mitjançant una cascada enzimàtica que induirà la lisis cel·lular, l'opsonització o la depuració d'immunocomplexos [259].

Les citocines inflamatòries secretades durant la resposta immunològica (p.e. TNF- α i IL1 β) també afecten a les cèl·lules endotelials, promovent l'expressió de molècules d'adhesió, com VCAM-1, ICAM-1 i MadCAM-1. Aquestes molècules d'adhesió i els seus lligands són clau en la resposta inflamatòria, permetent la migració dels leucòcits al focus inflamatori (Taula 7) [260, 261].

Tots aquests canvis associats a la resposta inflamatòria de la mucosa intestinal es reflecteixen clarament quan s'estudia la mucosa intestinal de pacients amb CU a nivell transcripcional. Al analitzar les alteracions transcripcionals en biòpsies de pacients amb CU activa comparades amb mucosa sana o teixit no inflammat d'un pacient s'observa un augment de quimiocines, citocines, pèptids antimicrobians i factors d'adhesió; senyalant l'activitat inflamatòria i la migració leucocitària que està tenint lloc en el teixit [262, 263]. També es detecten augmentats agents antimicrobians i del complement, i determinats receptors i molècules involucrades en la presentació d'antígens (MHC). La Taula 8 recull alguns dels gens alterats durant la resposta inflamatòria en la mucosa intestinal de pacients amb CU.

Molècula d'adhesió	Localització	Exp. constitutiva	Exp. induïble	Lligand	Funció
Família d'integrines					
CD11a/CD18	Leucòcits	Sí	No	ICAM-1, ICAM-2	Adhesió i migració
CD11b/CD18	Granulòcits i monòcits	Sí	Sí	ICAM-1	Adhesió i migració
CD11c/CD18	Granulòcits i monòcits	Sí	Sí	Fibrinogen, C3b	Activació i adhesió?
$\alpha 4\beta 1$	Limfòcits, monòcits, granulòcits activats	Sí	Sí	VCAM-1, fibronectina	Adhesió
$\alpha 4\beta 7$	Limfòcits	Sí	No	MadCAM-1, VCAM-1, fibronectina	Rodament i adhesió
$\alpha E\beta 7$	Limfòcits i un subgrup de cèl·lules dendrítiques	Sí	Sí	E-caderina	Retenció de cèl·lules a la mucosa
Superfamília d'immunoglobulines					
ICAM-1	Endoteli i monòcits	Sí	Sí	CD11a/CD18, CD11b/CD18	Adhesió i migració
ICAM-2	Endoteli	Sí	No	CD11a/CD18	Adhesió i migració
VCAM-1	Endoteli	Sí	Sí	$\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$	Adhesió i migració
MAdCAM-1	Endoteli intestinal	Sí	Sí	$\alpha 4\beta 7$, L-selectina	Adhesió i migració
PECAM-1	Endoteli, leucòcits i plaquetes	Sí	No	PECAM-1, $\alpha V\beta 3$?	Adhesió i migració
VAP-1	endoteli	Sí	Sí	?	Adhesió

Taula 7: Molècules d'adhesió involucrades en l'adhesió entre leucòcits i cèl·lules endotelials. Adaptat de [260, 261].

Funcions immunomoduladores	
Quimiocines	
<i>CXCL1</i>	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 1</i>
<i>CXCL2</i>	<i>(MIP-2) C-X-C Motif Chemokine Ligand 2</i>
<i>CXCL5</i>	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 5</i>
<i>CCL7</i>	<i>C-C Motif Chemokine Ligand 7</i>
<i>CCL3</i>	<i>(MIP-1A) C-C Motif Chemokine Ligand 3</i>
<i>CCL20</i>	<i>C-C Motif Chemokine Ligand 20</i>
<i>CCL18</i>	<i>C-C Motif Chemokine Ligand 18</i>
<i>CCL24</i>	<i>C-C Motif Chemokine Ligand 24</i>
<i>CXCL9</i>	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 9</i>
<i>CXCL10</i>	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 10</i>
Citocines	
<i>IL-23, alpha (subunit 19)</i>	<i>Interleukin 23 Subunit Alpha</i>
<i>IL17A</i>	<i>Interleukin 17A</i>
<i>IL8</i>	<i>Interleukin 8</i>
<i>IL1A</i>	<i>Interleukin 1 Alpha</i>
<i>IL1B</i>	<i>Interleukin 1 Beta</i>
<i>IL13</i>	<i>Interleukin 13</i>
<i>IL12A (p35)</i>	<i>Interleukin 12A</i>
<i>IL12b (p40)</i>	<i>Interleukin 12B</i>
<i>PLAU</i>	<i>Plasminogen activator, urokinase</i>
<i>IL18</i>	<i>Interleukin 18</i>
Proteïnes antimicrobianes	
<i>DEFA5</i>	<i>Defensin A5</i>
<i>DEFA6</i>	<i>Defensin A6</i>
<i>DEFB4</i>	<i>Defensin B4</i>
<i>LYZ</i>	<i>Lysozyme</i>
<i>REG3A</i>	<i>Regenerationg Family Member 3 Alpha</i>
<i>PLA2GA2</i>	<i>Secretory phospholipase A2</i>
<i>LCN2</i>	<i>Lipocalin 2</i>
<i>NOS2A</i>	<i>Nitric Oxide Synthase 2</i>
Receptors de citocines	
<i>TNFRSF6b</i>	<i>TNF Receptor Superfamily Member 6b</i>
<i>IL1R2</i>	<i>Interleukin 1 receptor, type II</i>

Continua.

Taula 8 – Funcions immunomoduladores. Continuació	
<i>IL2RA</i>	<i>Interleukin 2 receptor, alpha</i>
<i>IL23R</i>	<i>Interleukin 23 receptor</i>
<i>CXCR2</i>	<i>C-X-C Motif Chemokine Receptor 2</i>
<i>IL1RN</i>	<i>Interleukin 1 Receptor Antagonist</i>
<i>TNFRSF17</i>	<i>TNF Receptor Superfamily Member 17</i>
Complex major d'histocompatibilitat, classe II / Presentació d'antigen	
<i>HLA-DRB1</i>	<i>Major Histocompatibility Complex, Class II, DR Beta 1</i>
<i>HLA-DQB1</i>	<i>Major Histocompatibility Complex, Class II, DQ Beta 1</i>
Complex major d'histocompatibilitat, classe I / Presentació d'antigen	
<i>HLA-C</i>	<i>Major Histocompatibility Complex, Class I, C</i>
<i>HLA-B</i>	<i>Major Histocompatibility Complex, Class I, B</i>
<i>CD1d</i>	<i>CD1d Molecules</i>
<i>CD86</i>	<i>CD86 Molecule</i>
Complement	
<i>C4A, C4B</i>	<i>Complement C4A (Rodgers Blood Group) / B (Chido Blood Group)</i>
<i>C4BPB</i>	<i>Complement Component 4 Binding Protein Beta</i>
<i>SAA2</i>	<i>Serum Amiloid A2</i>
Molècules d'adhesió cel·lular	
<i>ITGB2</i>	<i>Integrin beta 2</i>
<i>ITGAM</i>	<i>Integrin, alpha M</i>
<i>VCAM-1</i>	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i>
<i>ICAM-1</i>	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
<i>CEACAM-1</i>	<i>Carcinoembryonic Antigen Related Cell Adhesion Molecule 1</i>
<i>ITGA4</i>	<i>Integrin, alpha 4</i>
<i>ITGB6</i>	<i>Integrin, beta6</i>
<i>MAdCAM-1</i>	<i>Mucosal Vascular Addressin Cell Adhesion Molecule 1</i>
Relacionades amb PAF (Factor activador de plaquetes)	
<i>PTAFR</i>	<i>Platelet Activating Factor Receptor</i>
<i>PLA2G7</i>	<i>Phospholipase A2 Group VII</i>
<i>LPCAT1</i>	<i>Lysophosphatidylcholineacetyltransferase</i>

Taula 8: Immunomodulació. Gens associats amb la immunomodulació (reclutament cel·lular, activació i mediadors inflamatoris) que es veuen alterats en la mucosa intestinal de pacients amb CU activa.

3.3. Proliferació i creixement cel·lular

Una resposta inflamatòria aguda pot conduir a un dany tissular (p.e. úlceres). Un cop controlada la inflamació, existeixen mecanismes de reparació que s'encarreguen de regenerar i curar les lesions tissular.

La reparació cel·lular consisteix principalment en dues fases, una primera fase de restitució i una segona fase de proliferació cel·lular i formació de criptes (Figura 10) [264]. La fase de restitució consisteix en la redistribució de cèl·lules existents per cobrir la capa ulcerada i restablir la integritat de la barrera epitelial. Alguns dels factors clau d'aquest procés són el TGF- α i TGF- β , els pèptids *trefoil* i les galectines (galectina-2 i galectina-4), que indueixen canvis en el citoesquelet permetent la migració cel·lular [265–267]. Posteriorment, diversos factors de creixement, com el *epidermal growth factor* (EGF), *hepatocyte growth factor* (HGF), *fibroblast growth factor* (FGF) i *keratinocyte growth factor* (KGF) (produïts per l'estroma), citocines pro-inflamatòries com IL-1 β , IL-6, IL-2 o IL-8, o productes bacterians, promouran la proliferació cel·lular activant els factors de transcripció STAT-3, STAT-5 i NF- κ B [268–273].

Un potent inductor de STAT3 és la IL-22, una citocina de la família de la IL-10 capaç d'estimular la proliferació cel·lular i la secreció de factors com REGIIIb, REGIIIg, S100A9, S100A8 o MUC1 [274].

L'última etapa del procés de regeneració i curació de la mucosa consisteix en la reconstrucció de les criptes intestinals. Les cèl·lules de la cripta es diferencien principalment en cèl·lules absortives (enteròcits) i cèl·lules secretores (cèl·lules calciformes). En aquest procés de diferenciació hi juga un paper molt important el teixit mesenquimal adjacent a la capa epitelial mitjançant la secreció de WNT5a i prostaglandina E2 [275, 276]. Les citocines inflamatòries, com la IL-6, activaran més vies vinculades al procés de diferenciació com la via Notch i Hippo-YAP [277–279]. L'activació de Notch indueix l'expressió del factor de transcripció Hes-1 que inhibeix la diferenciació de cèl·lules calciformes. En el cas de YAP, la funció fisiològica encara no està clara.

Durant un brot de CU es solen trobar múltiples úlceres en la mucosa intestinal degut al dany tissular provocat per la resposta inflamatòria. Com esperaríem, molts dels gens relacionats amb la regeneració cel·lular tenen una expressió ele-

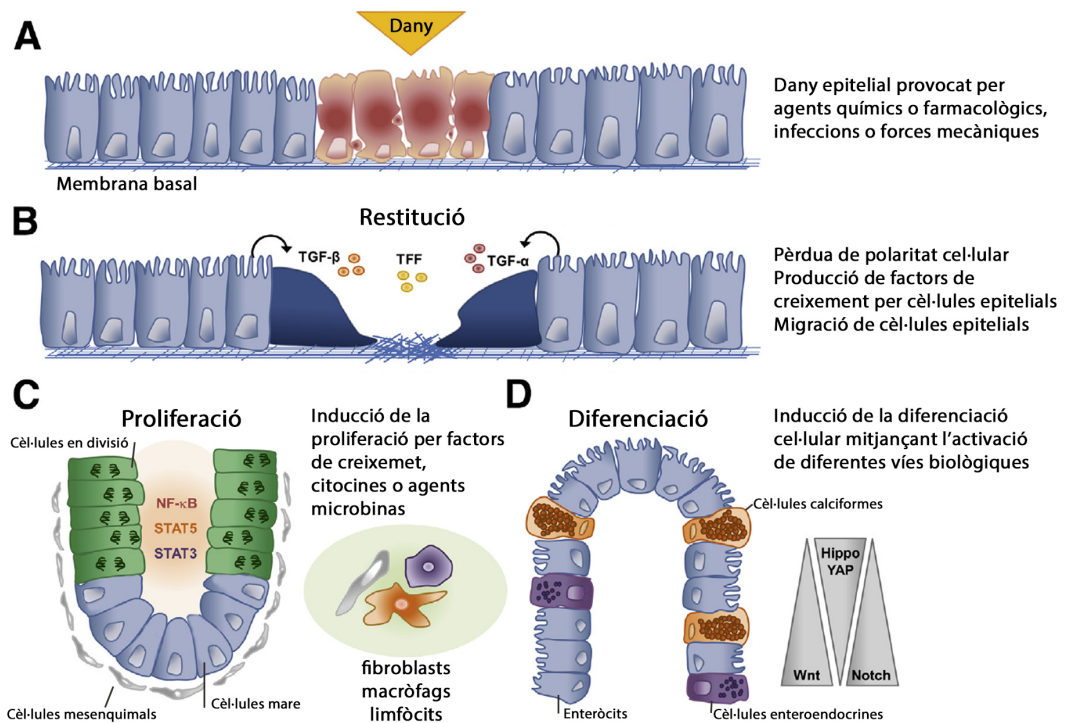


Figura 10: Representació dels mecanismes involucrats en la curació mucosa. A) Hores després del dany comença el procés de reparació i regeneració tissular. B) Les cèl·lules epitelials perden la polaritat mitjançant la secreció de factors com TGF- α , TGF- β o TFF, permetent la migració cel·lular a la zona danyada. C) A continuació, els factors de creixement, les citocines o els agents microbins induïen la proliferació de cèl·lules epitelials des de la base de la cripta. D) Finalment, les cèl·lules es diferencien en cèl·lules especialitzades localitzades a la part apical de la cripta. Adaptada de [280].

vada en el teixit d'aquests pacients, indicant que aquesta ha estat danyada i que les vies de restitució, proliferació i diferenciació estan actives. Alguns d'aquests gens es recullen a la Taula 9.

4. Inflamació i càncer

Molts d'aquests mecanismes de creixement cel·lular associats a la CU també contribueixen en el desenvolupament i progressió del CCR. Com s'ha descrit anteriorment (Secció I), els pacients amb CU presenten un risc de desenvolupar CCR superior al de la població en general, sobretot en aquells casos amb més de 8 anys d'evolució de la malaltia. Es creu que la regeneració constant del teixit danyat a conseqüència de la inflamació pot ser clau en el desenvolupament tumoral, con-

Proliferació i creixement cel·lular	
<i>S100P</i>	<i>S100 calcium binding protein P</i>
<i>S100A11</i>	<i>S100 calcium binding protein A11</i>
<i>S100A8</i>	<i>S100 calcium binding protein A8</i>
<i>S100A9</i>	<i>S100 calcium binding protein A9</i>
<i>CTSC</i>	<i>Cathepsin C</i>
<i>REG4</i>	<i>Regenerating Family Member 4</i>
<i>REG1A</i>	<i>Regenerating Family Member 1 Alpha</i>
<i>REG3A</i>	<i>Regenerating Family Member 3 Alpha</i>
<i>TFF1</i>	<i>Trefoil factor 1</i>
<i>WNT5A</i>	<i>Wnt Family Member 5A</i>
<i>STAT3</i>	<i>Signal Transducer And Activator Of Transcription 3</i>

Taula 9: Proliferació i creixement cel·lular. Gens associats amb la regeneració tissular (restitució, proliferació i diferenciació) que s'alteren en la mucosa intestinal de pacients amb CU activa.

tribuïnt en la inducció de gens antiapoptòtics, estimulant la proliferació cel·lular i la angiogènesi [281, 282].

Diverses de les citocines pro-inflamatòries (com TNF- α , IL-1 β i IL-6) codificades per gens associats a la via NF- κ B que contribueixen al dany tissular, es relacionen amb el desenvolupament i la progressió de tumors. A més, l'activació de NF- κ B promou l'expressió de factors antiapoptòtics com *grow arrest and DNA-damage-inducible 45b* (GADD45b), *B-cell lymphoma 2-related protein* (BFL1) i *B-cell lymphoma XL* (BCL-XL), que promouen la supervivència i proliferació de cèl·lules tumorals. Aquesta via també pot estimular la progressió i invasió del tumor directa o indirectament mitjançant l'augment de l'expressió de VEGF, COX-2, i IL-8, que afavorirà l'angiogènesis. Finalment, la producció de metal·loproteinases (com MMP1, MMP3 i MMP9) i algunes proteïnases serines que són regulades per NF- κ B s'han descrit com a factors que contribueixen en la metàstasi tumoral [283].

També es creu que la IL-6 té un paper especialment rellevant en el CCR. Els nivells de IL-6 estan elevats en el sèrum de pacients amb CCR i es correlacionen amb la mida i l'estat del tumor [284]. A més, la via IL6/STAT3 pot estimular la supervivència i proliferació de cèl·lules intestinal pre-malignes [285].

Hipòtesis i objectius

En el tractament de la CU, un cop aconseguida la remissió clínica, l'objectiu principal es centra en la curació mucosa i la prevenció d'un nou brot. Actualment, el 50% dels pacients amb CU presenten més d'un brot al llarg del temps i un 15% haurà de sotmetre's a cirurgia [17, 142, 143].

Assolir la curació mucosa o remissió s'associa a un millor prognosi de la CU a llarg termini [17, 286], pel que el curs clínic podria variar si aquest fós l'objectiu principal en el seu tractament. No obstant, tot i l'absència de senyals inflamatoris a nivell macro- i microscòpic, el segment intestinal en remissió mostra alteracions histològiques [287]. Algunes de les alteracions permanents descrites inclouen la deformitat de les criptes o glàndules, la ramificació de criptes, una disminució de la muscular de la mucosa i la metaplàsia de cèl·lules de Paneth, entre altres.

Amb l'arribada de les òmiques, la caracterització de la mucosa intestinal inflamada de pacients amb CU ha mostrat algunes de les vies alterades en aquests pacients i està sent clau per a la cerca de noves dianes terapèutiques. Tanmateix, nosaltres volem centrar-nos en la mucosa intestinal en remissió.

Durant la inflamació intestinal s'activen un conjunt de mecanismes reguladors com la producció de citocines anti-inflamatòries (IL-10, INF- α i IFN- β , TGF- β , IL-22, IL-35 i IL-37) [288], inhibidors inflamatoris endògens (IL-1Ra, sTNFR, IL-18BP) i mediadors per la resolució de la inflamació (lipoxins, resolvins i protectins) [250], per tal de limitar el dany i recuperar l'homeòstasi intestinal. No obstant, es desconeix si alguns d'aquests mecanismes romanen alterats quan s'assoleix la remissió de la malaltia. Podríem pensar que alguns dels mecanismes anti-inflamatoris resten actius per tal d'evitar un nou brot. Per altra banda, i tenint present les alteracions histològiques persistents en la mucosa en remissió

dels pacients amb CU i que aquests mostren un major risc de desenvolupar CCR [289, 290], hom podria pensar en l'existència d'alteracions permanents en mecanismes de proliferació i creixement de l'epiteli intestinal.

Davant d'aquest escenari, i partint de la hipòtesis que la mucosa intestinal dels pacients amb CU en remissió presenta alteracions moleculars responsables de la cronicitat de la malaltia, un dels objectius d'aquesta tesi és **investigar si la mucosa intestinal dels pacients amb CU en remissió retorna a la normalitat o presenta alteracions transcripcionals permanents.**

Per tal de testar la hipòtesis, s'han definit els següents objectius concrets:

- Identificar el patró transcripcional associat a la mucosa de pacients amb CU en remissió mitjançant microarrays.
- Identificar les principals vies biològiques alterades en la mucosa de pacients amb CU en remissió.
- Validar els resultats obtinguts mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) a temps real.
- Validar els resultats obtinguts a nivell de proteïnes.

Per altra banda, i continuant amb la rellevància de la remissió mucosa i el monitoratge dels pacients amb CU, la tesi es planteja un segon objectiu centrat en la cerca de biomarcadors d'activitat de la malaltia.

Actualment disposem d'un gran ventall d'índex d'activitat clínica i endoscòpica per a monitorar l'activitat de la malaltia, essent l'endoscòpia el procediment de referència. No obstant, la realització d'una prova endoscòpica comporta elevats costos econòmics, dificultats en l'acceptibilitat dels pacients i, en els casos més greus, el risc de complicacions durant el procediment. Així, tot i que els pacients solen sotmetre's a varies endoscòpies al llarg de la seva vida, aquesta no és la prova que es realitza de forma rutinària per monitorar els pacients amb CU, essent la valoració clínica i d'altres biomarcadors serològics i fecals, els procediments indicats. Tanmateix, aquests no són sempre un reflex real de l'activitat endoscòpica. Existeixen discrepàncies entre la simptomatologia clínica i les lesions

endoscòpiques [291], i la sensibilitat i especificitat dels biomarcadors serològics i fecals és baixa en casos amb malaltia activa lleu o moderada [190, 292, 293].

Per tant, sota la hipòtesis que a nivell transcripcional podem detectar alteracions en sang perifèrica que s'associïn amb les lesions endoscòpiques, el segon objectiu d'aquesta tesi és la **detecció de biomarcadors transcripcionals per a la predicció de lesions endoscòpiques**.

Per tal de testar la hipòtesis, s'han definit els següents objectius concrets:

- Determinar el perfil transcripcional en sang perifèrica de pacients amb lesions endoscòpiques actives respecte controls sans i pacients en remissió.
- Correlacionar els nivells transcripcionals amb els diferents graus d'activitat endoscòpica.
- Validar aquelles molècules candidates a biomarcadors d'activitat endoscòpica.
- Definir un model predictiu de l'activitat endoscòpica.
- Determinar la sensibilitat dels biomarcadors per avaluar la resposta terapèutica.

Estudi 1.

Transcriptional analysis of the intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis in remission reveals lasting epithelial cell alterations

Núria Planell^{1,2}, Juan J. Lozano², Rut Mora-Buch¹, M. Carme Masamunt¹, Mireya Jimeno³, Ingrid Ordás¹, Miriam Esteller¹, Elena Ricart¹, Josep M. Piqué¹, Julián Panés¹, Azucena Salas¹

¹Department of Gastroenterology. IDIBAPS, Hospital Clínic. CIBER-EHD. Barcelona, Spain. ²Bioinformatics Platform. CIBERehd. Barcelona, Spain.

³Department of Pathology, Hospital Clínic. Barcelona, Spain.

Gut 62.7 (2013): 967-976

Resum

Objectius. La Colitis Ulcerosa (CU) és una malaltia crònica caracteritzada per diferents brots d'activitat tot i la prèvia curació endoscòpica i histològica de la mucosa. L'objectiu d'aquest estudi es centra en la identificació de la signatura molecular associada a la CU en remissió.

Metodologia. Es realitza un anàlisi transcripcional del genoma complet de biòpsies de còlon de pacients amb CU histològicament activa, inactiva, i controls sans. Els resultats obtinguts es validen en una cohort independent de pacients mitjançant PCR a temps real i tècniques de tinció histològica (immunohistoquímica i immunofluorescència).

Resultats. L'anàlisi de microarrays (n=43) mostra que la mucosa intestinal de pacients amb CU en remissió presenta un perfil transcripcional significativament diferent dels pacients amb CU activa i dels controls sans. Cinquanta quatre gens van ser seleccionats per validar-se en una cohort independent de pacients (n=30). Vint-i-nou dels gens seleccionats mostren alteracions transcripcionals significatives en la CU en remissió en comparació als controls sans, incloent majoritàriament gens relacionats amb les cèl·lules epitelials, com *REG4*, *S100P*, *SERPINB5*, *SLC16A1*, *DEFB1*, *AQP3* i *AQP8*; associats amb el creixement cel·lular, l'apoptosis i la resposta immunològica. L'expressió de gens inflamatoris com *REG1A* i *IL8* retorna a nivells d'expressió similars als controls durant la remissió de la malaltia. Les alteracions en l'expressió dels gens *REG4*, *S100P*, *SERPINB5* i *REG1A* es va confirmar a nivell de proteïnes mitjançant immunohistoquímica (n=23).

Conclusions. L'anàlisi transcripcional de la mucosa de pacients amb CU ens ha permès descobrir vies permanentment alterades en la CU tot i la curació histològica de la mucosa intestinal. Donada la forta relació entre la regulació d'alguns d'aquests gens i el creixement i difusió de determinats càncers gastrointestinals, creiem que l'expressió aberrant d'aquests gens en la CU pot proporcionar mecanismes per a la hiperproliferació epitelial i, en el context de transformacions malignes, per a un creixement tumoral.



Editor's choice
Scan to access more
free content

ORIGINAL ARTICLE

Transcriptional analysis of the intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis in remission reveals lasting epithelial cell alterations

Núria Planell,^{1,2} Juan J Lozano,² Rut Mora-Buch,¹ M Carme Masamunt,¹ Mireya Jimeno,³ Ingrid Ordás,¹ Miriam Esteller,¹ Elena Ricart,¹ Josep M Piqué,¹ Julián Panés,¹ Azucena Salas¹

► Additional data are published online only. To view these files please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303333>).

¹Department of Gastroenterology, IDIBAPS, Hospital Clínic, CIBER-EHD, Barcelona, Spain

²Department of Bioinformatics Platform, CIBERehd, Barcelona, Spain

³Department of Pathology, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

Correspondence to

Dr Azucena Salas, Center Esther Koplowitz, Rosselló 149-153, 3rd Floor, Barcelona 08036, Spain; asalas1@clinic.ub.es

Revised 29 August 2012

Accepted 15 September 2012

Published Online First

7 November 2012

ABSTRACT

Objective Ulcerative colitis (UC) is a chronic condition characterised by the relapsing inflammation despite previous endoscopic and histological healing. Our objective was to identify the molecular signature associated with UC remission.

Design We performed whole-genome transcriptional analysis of colonic biopsies from patients with histologically active and inactive UC, and non-inflammatory bowel disease (non-IBD) controls. Real-time reverse transcriptase-PCR and immunostaining were used for validating selected genes in independent cohorts of patients.

Results Microarray analysis (n=43) demonstrates that UC patients in remission present an intestinal transcriptional signature that significantly differs from that of non-IBD controls and active patients. Fifty-four selected genes were validated in an independent cohort of patients (n=30). Twenty-nine of these genes were significantly regulated in UC-in-remission subjects compared with non-IBD controls, including a large number of epithelial cell-expressed genes such as REG4, S100P, SERPINB5, SLC16A1, DEFB1, AQP3 and AQP8, which modulate epithelial cell growth, sensitivity to apoptosis and immune function. Expression of inflammation-related genes such as REG1A and IL8 returned to control levels during remission. REG4, S100P, SERPINB5 and REG1A protein expression was confirmed by immunohistochemistry (n=23).

Conclusions Analysis of the gene signature associated with remission allowed us to unravel pathways permanently deregulated in UC despite histological recovery. Given the strong link between the regulation of some of these genes and the growth and dissemination of gastrointestinal cancers, we believe their aberrant expression in UC may provide a mechanism for epithelial hyper-proliferation and, in the context of malignant transformation, for tumour growth.

INTRODUCTION

Ulcerative colitis (UC) is an idiopathic chronic disease of the colon characterised by periods of active disease followed by periods of remission. Epidemiological studies in UC have reported that over 90% of patients have active disease during the first year following diagnosis and in subsequent years, approximately 50% will have active disease or will have undergone colectomy.¹

Summary box

What is already known about this subject?

- In ulcerative colitis (UC), periods of active disease are followed by endoscopic remission and healing of the involved mucosa.
- The involved intestinal mucosa of UC patients in remission shows persistent histological changes suggesting that the composition and architecture of the recovered intestine is permanently altered even after inflammation has resolved.
- Patients with UC have an increased risk of developing complications such as colorectal cancer (CRC), fibrosis and loss of intestinal function, and this risk increases over time.

What are the new findings?

- We identify a new transcriptional signature associated with the involved mucosa of UC patients in remission that is significantly different from that of uninvolved or non-inflammatory bowel disease mucosa.
- About half of the genes that are significantly regulated in UC active mucosa remain altered during remission despite endoscopic and histological healing. These genes participate in biological functions such as cellular growth, movement, assembly and organisation, as well as in fatty acid and protein metabolism.
- Among the genes that remain deregulated during remission, we identify several that are expressed by epithelial cells and are involved in epithelial cell proliferation, resistance to apoptosis and response to stress. These genes have been previously shown to be deregulated in the neoplastic epithelium, suggesting a potential contribution to CRC development in the context of UC.



► <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303333>

Preventing disease relapse, achieving mucosal healing and avoiding complications are the major goals in the management of patients with UC. Mucosal healing or endoscopic remission is associated with better long-term clinical outcomes in UC.² However, even in the absence of endoscopic or microscopic signs of active inflammation, the involved intestinal mucosa of UC patients in remission shows histological changes. These include

Summary box

How might it impact on clinical practice in the foreseeable future?

- ▶ By comparing active UC patients with UC patients in remission, we can distinguish between genes whose expression pattern depends on disease activity, and those that remain altered in spite of remission. The former could serve as potential targets and be used as objective biomarkers of mucosal inflammation.
- ▶ The signature associated with the remitting intestine may include early biomarkers of malignant transformation in UC patients, and potential targets for halting the progression to CRC.

glandular deformity, branching of crypts, thickened muscularis mucosa, Paneth cell metaplasia, neuroendocrine cell hyperplasia and/or fat in the lamina propria, suggesting that the composition and architecture of the recovered intestine is permanently altered even after inflammation has resolved.³

UC is associated with a higher risk of developing dysplasia and colorectal cancer (CRC),^{4,5} with disease duration being the strongest risk factor. The histological severity of inflammation has been linked to increased cancer risk, but patients with long-standing remission also have an increased risk of developing neoplastic lesions.⁶

While several studies have used genome-wide gene expression approaches to understand the mechanisms of active inflammation,^{7–12} fewer studies, typically relying on a small number of patients, have explored the molecular events that occur during remission.^{9, 13, 14}

The primary objective of our investigation was to reveal the molecular events that take place during disease quiescence. To this end, we studied the transcriptional signature of the involved intestinal mucosa of UC patients in clinical, endoscopic and histological remission, and compared it with that of the actively inflamed or healthy non-inflammatory bowel disease (non-IBD) mucosa. Studying the molecular alterations in the intestinal mucosa that persist during disease remission may help identify relevant biomarkers of remission and provide a better understanding of the mechanisms leading to long-term disease complications such as dysplasia and CRC.

MATERIALS AND METHODS

More detailed information is described in the online supplementary methods.

Patient population

Patients with an established diagnosis of UC and non-IBD controls were included in the study after obtaining written informed consent. Non-IBD controls were those subjects undergoing colonoscopy for mild gastrointestinal symptoms or a screening for CRC, and who presented no lesions during examination. Inclusion criteria for UC patients were: age between 18 and 65 years, and diagnosis of UC at least 6 months before inclusion according to the established criteria.¹⁵ Patients with concomitant infections were excluded.

A total of 89 subjects, divided into three independent cohorts, were included in the study. Clinical and demographic characteristics of the subjects are shown in table 1.

Table 1 Clinical and demographic characteristics of patients included in the study

	UC active	UC remission	Non-IBD controls
COHORT 1 (microarray analysis)			
Number	15	8	13
Gender (M/F)	4/11	3/5	5/8
Age (years)	42.4±9.1	49.4±11.7	41.6±12.4
Duration of disease (years)	6.6±5.2	12.4±8.8	–
Extension of disease*	0/8/7	1/5/2	–
Medication†	4/8/1/2	5/3/0/0	–
COHORT 2 (Real-time RT-PCR)			
Number	8	12	10
Gender (M/F)	5/3	6/6	3/7
Age (years)	49.5±17.3	40.5±11.2	42.7±9.9
Duration of disease (years)	3.6±3.9	10.3±6.3	–
Extension of disease*	2/5/1	1/7/4	–
Medication†	3/1/1/3	2/5/0/5	–
COHORT 3 (immunohistochemistry analysis)			
Number	7	9	7
Gender (M/F)	5/2	7/2	2/5
Age (years)	48±17.9	58.6±14.3	45.6±19.5
Duration of disease (years)	6.3±6.6	11.4±5.4	–
Extension of disease*	0/4/3	2/3/4	–
Medication†	1/5/1/0	4/4/0/1	–

*Proctitis/Left-sided colitis/Pancolitis.

†5ASA/Azathioprine/Steroids/no treatment.

IBD, inflammatory bowel disease; UC, ulcerative colitis.

Assessment of disease activity

Clinical and histological disease activity was assessed using the total Mayo score,¹⁶ and the Matts score,¹⁷ respectively. A total Mayo score greater than or equal to 4 with at least one point in the bleeding sub-score and two points in the endoscopic sub-score, together with a histological score greater than or equal to 3 in any colonic segment, was defined as active disease. Inactive disease was defined as a Mayo score less than 4, an endoscopic sub-score of 0 and a histological score less than or equal to 2. All inactive patients had been in remission for at least 5 months before and after biopsy collection. Uninvolved mucosa of UC patients was defined as a colonic segment with a completely normal endoscopic appearance, normal histology and the absence of any evidence of previous disease activity.

Biopsy collection

Intestinal biopsies were collected from the sigmoid colon or rectum of non-IBD controls, UC patients with quiescent disease (involved mucosa segments; UC remission) and UC patients with active disease (UC active involved). In patients with active disease, additional samples were obtained from uninvolved proximal segments whenever possible (UC active uninvolved). Biopsies were taken during routine colonoscopies, placed in RNA later RNA Stabilisation Reagent (Qiagen) and stored at –80°C. None of the biopsies showed evidence of colitis-associated dysplasia or neoplasia.

RNA Isolation

Total RNA from biopsies in cohorts 1 and 2 was extracted using a Rneasy Kit (Qiagen, Spain) according to the manufacturer's instructions. Purity and integrity of the total RNA were assessed with the 2100 Bioanalyzer (Agilent, Germany) and then quantified by NanoDrop spectrophotometer (Nanodrop Technologies, USA); only samples with an RNA integrity number (RIN) greater than 7.0 were used.

Microarray

The derived cRNA from cohort 1 biopsies was hybridised to high-density oligonucleotide Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays (Affymetrix, USA) and raw data was analysed using Bioconductor tools in R (V2.15.0). Pathway analysis using Ingenuity Pathways Analysis (IPA; Ingenuity Systems) was performed for those genes found to be significantly deregulated.

Microarrays raw data (.cel files) and processed data have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus and are accessible through GEO Series accession number GSE38713 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE38713>).

Quantitative real-time reverse transcriptase PCR (RT-PCR)

To validate the microarray data, we performed real-time RT-PCR analysis for a selected set of 54 target genes and 9 endogenous controls (see online supplementary table S1) from an independent cohort of 30 individuals (cohort 2) using custom designed TaqMan Low Density Arrays (TLDA platform, Applied Biosystems by Life Technologies, USA).

Microarray and real-time RT-PCR data correlation was assessed in a subset of 15 biopsies specimens obtained for microarray analysis (cohort 1) that was also analysed by real-time RT-PCR (7 UC remission, 4 UC active involved and 4 UC active uninvolved). We used Pearson's product moment correlation to test for any associations between paired data.

Immunostaining of intestinal samples

Using commercially available antibodies and the immunoperoxidase detection system, we determined the expression of REG4, REG1A, S100P and SERPINB5 (MASPIN) in paraffin-embedded sections from mucosa colonic biopsies obtained during endoscopies (cohort 3). Two blinded observers (NP and RMB) quantified the intensity of staining for all proteins analysed using a qualitative score ranging from 0 to 2 (0=negative stain, 1=mild stain, 2=strong stain). Statistical significance between groups was determined using Fisher's exact test.

Immunofluorescence staining was performed to confirm epithelial localisation of REG4, REG1A, S100P and SERPINB5 (MASPIN) in a subset of representative patients that were included in cohort 3. Epithelial cells were stained with an anti-EpCAM antibody.

Ethical considerations

The study was approved by the Institutional Ethics Committee of the Hospital Clinic of Barcelona (Spain) on March 2006 and was performed in accordance with the principles stated in the Declaration of Helsinki (updated October 1996).

RESULTS

The intestinal mucosa of UC in histological remission is transcriptionally different from that of healthy or inflamed mucosa

Our first aim was to compare, using microarray analysis, the transcriptional profile of the involved intestinal mucosa of patients in remission, with that of healthy or inflamed mucosa (cohort 1; table 1). A clear differentiation of samples, based on their inflammatory status, was evident when applying principal component analysis (PCA) using the given log₂ microarray expression data (figure 1). Importantly, samples from involved areas of patients in remission (UC remission, shown in green in figure 1) clustered together and away from the other groups.

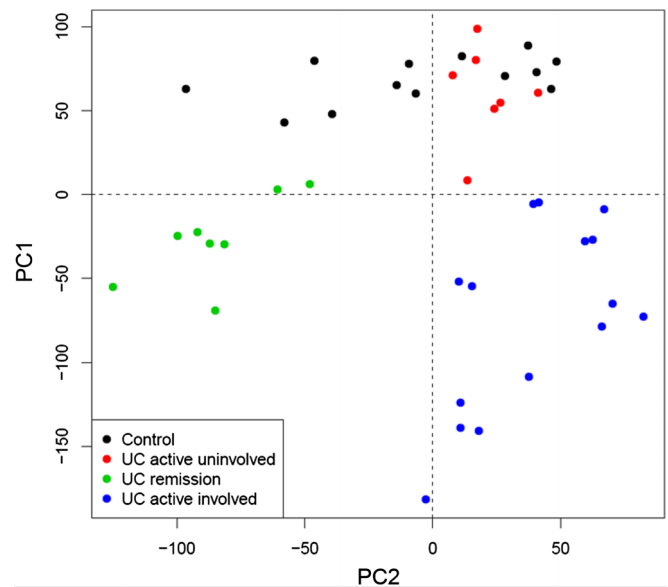


Figure 1 Principal Component Analysis (PCA) of microarray-based genome-wide gene expression profiles derived from intestinal biopsies. Mucosal biopsies were obtained from non-inflammatory bowel disease (non-IBD) controls (black, n=13), non-involved mucosa segments from patients with active ulcerative colitis (UC) (red, n=7), involved mucosa segments from patients with active UC (blue, n=15), and inactive UC (green, n=8). A two-principal component plot is shown with the first component along the Y-axis and the second component along the X-axis.

Using linear models for microarray data (LIMMA), we identified a set of 5469 genes whose expression was significantly up- or down-regulated in UC remission samples compared with non-IBD controls, thereby demonstrating that the UC mucosa in histological remission is distinguishable from that of non-IBD controls. By comparing inflamed samples from UC active patients with non-IBD controls, we identified 6365 genes that were significantly perturbed. It is worth noting that over half of those genes (3700) remained significantly deregulated in UC patients in remission despite complete endoscopic and histological healing. No significant differences in gene expression were detected in UC active uninvolved samples compared with non-IBD controls. Three different expression patterns could be identified by looking at the transcription of these 6,365 genes in UC remission samples relative to the other groups (figure 2). Pattern 1 included genes that showed equal expression in UC remission compared with non-IBD controls; pattern 2 contained genes whose expression in UC remission was intermediate and significantly different from that of controls and UC active; and pattern 3 included those genes that showed expression in UC remission comparable with that of UC active involved and was significantly different to non-IBD controls.

Analysis of the most significantly regulated pathways during UC remission based on transcriptomic data

Pathways analysis using IPA of the 3700 genes regulated in both active UC and UC in remission (patterns 2 and 3, figure 2) revealed several significantly perturbed biological functions (see online supplementary table S2A). The most noteworthy pathways identified included 945 of the 3700 genes (figure 3). A large share of these was related to fatty acid and protein metabolism. A decrease in biological functions linked to oxidation,

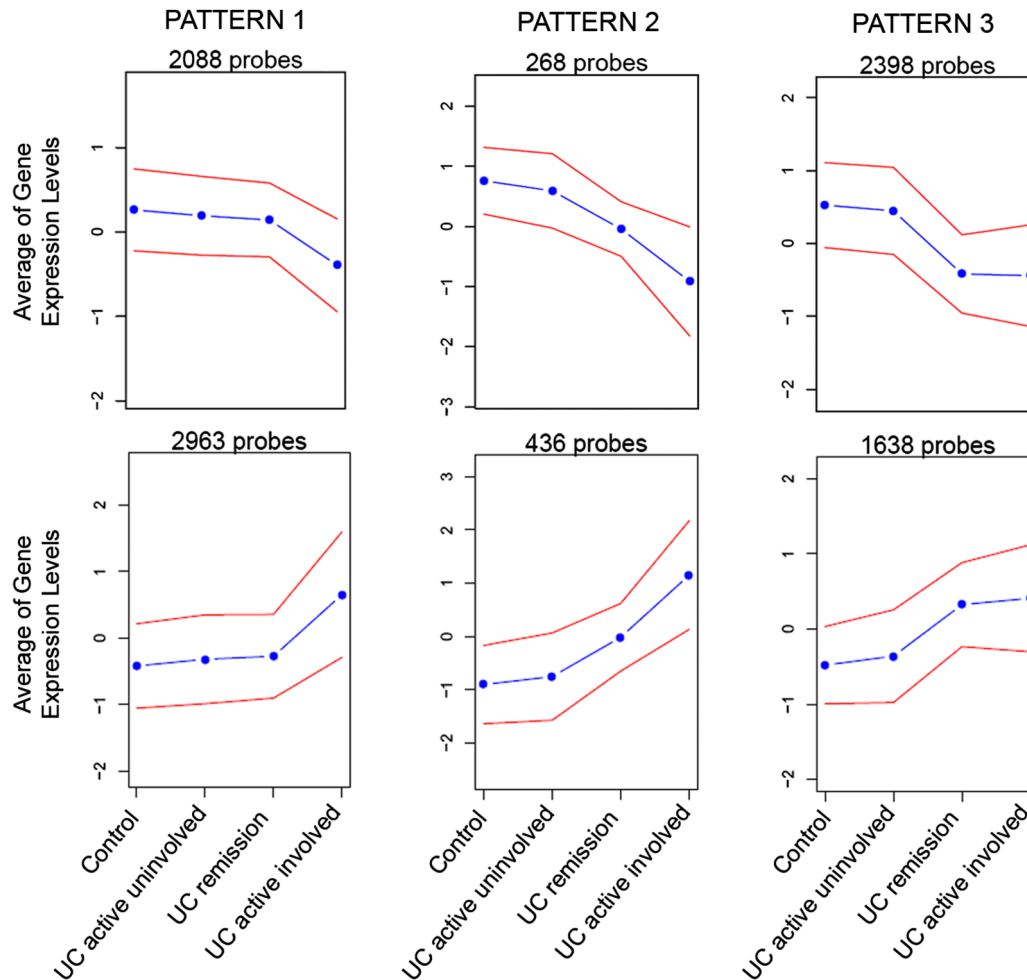


Figure 2 Expression patterns according to microarray analysis. The 6,365 genes identified as differential expressed between ulcerative colitis (UC) active and non-inflammatory bowel disease (non-IBD) controls were grouped into 6 clusters according to 3 expression patterns. For each cluster of genes, the average expression levels (blue points) and the corresponding SD (red line) are shown on the y-axis for each group of observations. The expression level of each gene was normalised to a mean=0.

concentration and transport of lipids is shown, suggesting reduced energy production, whereas protein metabolism increased. Pathway analysis also revealed a large number of regulated genes involved in cellular movement, mainly associated

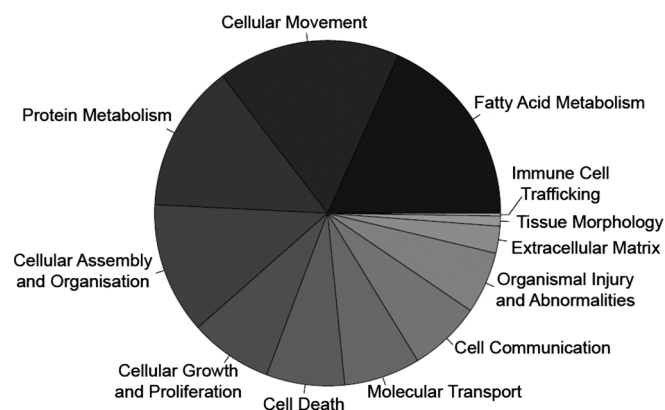


Figure 3 Pie chart representation of the relevant biological functions altered in both active ulcerative colitis (UC) and UC in remission. Twelve categories, including several biological functions, are shown across a range of black and white colouring.

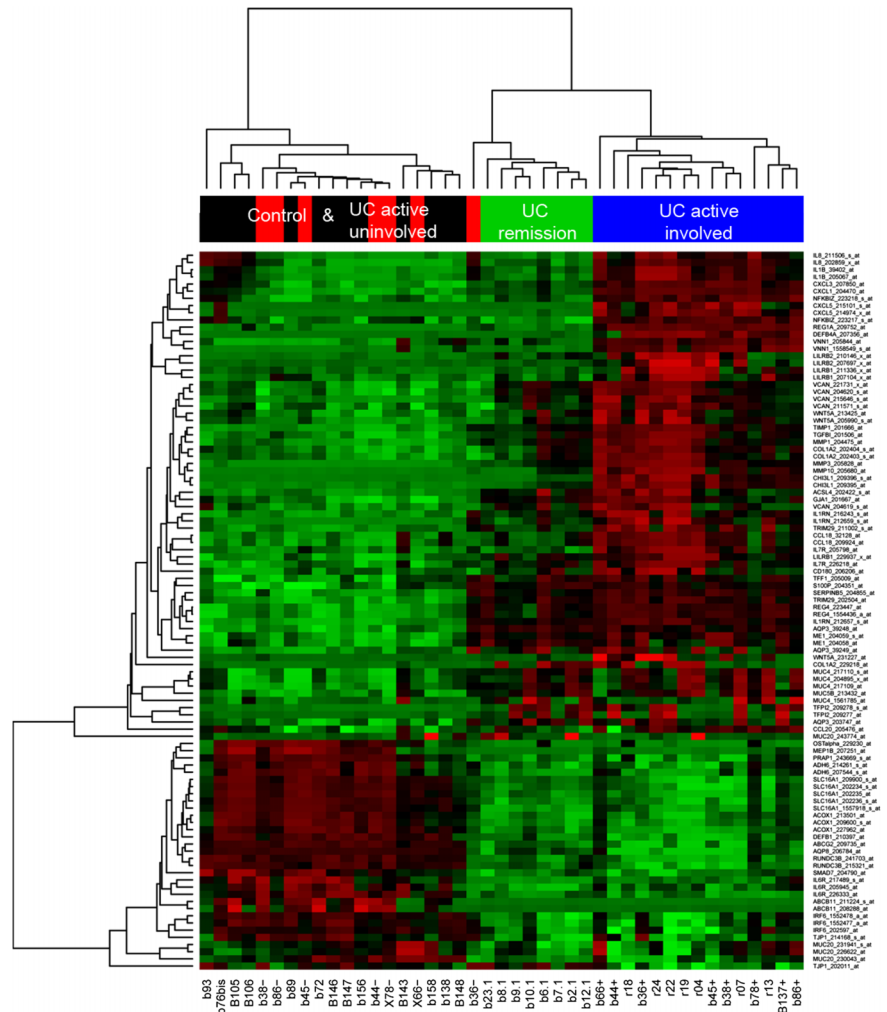
with the migration of cancer cells. Cellular assembly and organisation was perturbed, with a marked reduction in the tight junction and actin filament formation, and in the quantity of glandular epithelial cells. In addition, our analysis revealed an increase in the adhesion of stromal cells and in the spreading of fibroblasts during remission. Interestingly, biological functions related to colony formation and to the proliferation of colon cancer were found to be elevated. The cell death of epithelial cells and the cytotoxicity of tumour cells were similarly perturbed.

By contrast, that set of genes exclusively deregulated in patients with active UC versus non-IBD controls (pattern 1, figure 2) was primarily associated with immune function and inflammatory response (immune cell trafficking, cell movement and communication, etc), though it was also found to play a role in proliferative and regenerative responses (cellular growth and proliferation, cell death and tissue morphology) (see online supplementary table S2B).

Identification of a UC in remission signature

We next selected 54 genes (see online supplementary table S1) that (1) belonged to one of the 3 aforementioned patterns of gene expression (figure 2) and that (2) were involved in some of the major regulated pathways discussed above. Figure 4 shows a

Figure 4 Heatmap representation of microarray expression of 54 candidate genes for the ulcerative colitis (UC)-in-remission signature (100 probes). Heatmap representation of microarray expression of 54 selected target genes. Each row shows one individual probe (representing 54 selected genes) and each column shows one experimental sample. High expression levels are shown in red and low expression levels in green. An unsupervised hierarchical cluster method, using a Pearson distance and average linkage method, was applied for each sample and gene classification. Samples belonged to one of the following groups: non-inflammatory bowel disease (non-IBD) controls (shown in black, n=13), non-involved mucosa segments from patients with active UC (UC active uninvolved; in red, n=7), involved mucosa segments from patients with active UC (UC active involved; in blue, n=15) and endoscopically and histologically inactive UC (UC remission; in green, n=8).



heatmap representation of the microarray expression profile for the chosen 54 genes (100 probes). Microarray expression values for these 54 genes allowed discrimination between groups of UC patients in an unsupervised hierarchical cluster analysis of samples from cohort 1 (figure 4). The selected genes included several belonging to pattern 1 (ie, REG1A, IL8, CXCL3 and WNT5A) shown in the upper part of the heatmap (figure 4), and genes whose expression was deregulated in UC remission and UC active involved samples compared with non-IBD controls (patterns 2 and 3). Ninety-six per cent of the genes selected (52 out of the 54 analysed) were technically validated by real-time RT-PCR. Correlation coefficients (*r*) between the expression of microarray and real-time RT-PCR analyses and the *p* values for each probe are shown in the online supplementary table S3.

The UC-in-remission signature is confirmed by real-time RT-PCR in an independent cohort of patients

Next, we analysed the expression of these 52 selected genes using real-time RT-PCR in an independent cohort of patients (cohort 2; table 1). We obtained a refined set of 38 genes (table 2) whose expression profile fell into one of the three patterns described above (figure 2). As expected, we identified a marked up-regulation in UC active involved samples of all pattern 1 selected genes. In particular, REG1A showed the highest up-regulation (1363.4-fold change compared with non-IBD controls and a 403.4 fold-change compared with UC remission

samples), followed by IGHG1, IL8, CXCL1 and CXCL3. The pattern 2 genes CHI3L1, MMP1, MMP3 and TIMP1, which are related to the extracellular matrix, showed a marked up-regulation both in UC active and in UC remission samples compared with controls. By contrast, AQP8, a transporter found in the apical membrane of enterocyte cells (pattern 2), was significantly down-regulated in UC active involved and UC remission samples. An additional 22 genes belonging to expression pattern 3 were validated in this cohort. These genes showed a significant up- or down-modulation in UC active involved and UC remission samples. For all pattern 3 genes, no significant differences were found between UC active and UC remission expression. Regenerating islet-derived family member 4 (REG4), an epithelial cell-growth factor, showed the highest up-regulation followed by SERPINB5, which was also expressed by epithelial cells. The relative expression of genes encoding for different epithelial cell transporters, such as ABCG2, AQP3 and SLC16A1, is also shown.

The expression of a subset of epithelial genes and proteins remains in a deregulated state during remission

Using patients in cohort 2, we validated a total of 29 genes as being differentially expressed in UC in remission compared with non-IBD controls (table 2, patterns 2 and 3). Remarkably, many of the genes (ie. ABCG2, AQP3, DEFB1, REG4, S100P, SLC16A1, TFF1, SERPINB5 (MASPIN), AQP8, TRIM29, RUNDC3B AND CHI3L1) whose transcription remained

Table 2 Changes in the expression of selected genes assessed by real-time RT-PCR

Gene symbol	Fold change		
	UC active involved versus control	UC remission versus control	UC active involved versus UC remission
Pattern 1			
COL1A2	7.0**	1.1	6.3**
CXCL1	21.1**	1.9	11.1**
CXCL3	11.5**	1.9	6.0*
IGHG1/G4/@/ G3/V4-31/M	59.5**	1.3	44.1*
IL8	29.6**	1.6	18.1*
NFKBIZ	2.9**	1.1	2.8**
REG1A	1363.4**	3.4	403.4**
VCAN	3.9**	-1.1	4.4*
WNT5A	5.1**	-1.1	5.7**
Pattern 2			
AQP8	-59.8**	-9.4**	-6.3*
CHI3L1	626.0**	12.3**	50.9**
LILRB2	7.3**	1.8*	4.0*
MMP1	111.8**	13.8**	8.1*
MMP3	354.8**	22.6**	15.7*
TGFBI	5.9**	2.0**	2.9*
TIMP1	10.9**	4.0**	2.8*
Pattern 3			
ABCG2	-8.3**	-4.7*	-1.8
ACOX1	-2.2**	-1.9**	-1.1
ACSL4	6.1**	2.4**	2.6
ADH6	-2.3*	-1.7*	-1.4
AQP3	3.1**	4.0**	-1.3
CXCL5	44.7**	3.9*	11.5
DEFB1	-3.3**	-1.9*	-1.7
GJA1	4.2**	2.1**	2
IL1B	18.7**	2.6*	7.1
IL1RN	12.7**	7.9**	1.6
IL6R	-1.7*	-1.4*	-1.2
ME1	5.7**	6.6**	-1.2
MMP10	48.8**	10.4**	4.7
REG4	25.1**	22.7**	1.1
RUNDC3B	-3.1*	-2.3*	-1.3
S100P	8.6**	13.0**	-1.5
SERPINB5	10.0**	15.2**	-1.5
SLC16A1	-3.5*	-2.9**	-1.2
SMAD7	-1.9**	-1.5*	-1.3
TFF1	9.7**	6.0**	1.6
TFPI2	13.3**	6.3**	2.1
TRIM29	7.9**	9.8**	-1.3

*p<0.05.

**p<0.005.

Relative change (fold change) in gene expression determined by real-time RT-PCR in non-IBD controls, involved areas of active UC patients (UC active involved), and involved areas of UC patients in endoscopic remission (UC remission). Based on their relative expression among groups, genes could be classified into three different patterns (described in figure 2). Significant adjusted p values from a Mann-Whitney-Wilcoxon test are shown as.

IBD, inflammatory bowel disease; RT-PCR, reverse transcriptase PCR; UC, ulcerative colitis.

altered despite mucosal healing were primarily expressed by epithelial cells; this suggests that the epithelial lining is particularly susceptible during this chronic inflammatory condition.

Figure 5 shows the boxplot representation of gene expression by real-time RT-PCR for some of the most relevant epithelial cell-expressed genes that remained in a deregulated state in UC-in-remission samples. In addition, the expression of REG1A, a gene only up-regulated in UC active involved samples, is shown as a marker of inflammation. Apical

membrane butyrate receptor (SLC16A1) and the molecular transporters (AQP8 and ABCG2), which are expressed primarily by enterocytes, showed a significant down-regulation both in active UC and UC in remission. By contrast, the expression of AQP3, a basolateral transporter of these cells, exhibited a significant increase in transcription. Two genes secreted by goblet cells, REG4 and TFF1, also showed an increase in transcription. Moreover, the expression of less well-known epithelial genes—such as S100P, SERPINB5, TRIM29, RUNDC3B and CHI3L1—remained significantly altered in UC in remission.

In order to further confirm this signature, we determined by immunohistochemistry the expression of 3 selected proteins: REG4, S100P and SERPINB5 (table 2). In addition, we determined the expression of REG1A (pattern 1, figure 2 and table 2) as an epithelial marker of ongoing inflammation. Intestinal epithelial localisation of all four antigens was confirmed by immunofluorescent co-staining with an epithelial marker (EpCAM). Expression of REG4, REG1A, S100P and SERPINB5 (shown in green) within EpCAM-positive (in red) intestinal epithelial cells in the intestinal crypts is shown in figure 6A (white arrows). Strong S100P-expressing cells negative for EpCAM were also identified in the intestinal lamina propria (figure 6A, yellow arrow).

Protein expression of these four epithelial-related genes was quantified by immunohistochemistry in a cohort of 23 patients (cohort 3; see table 1 for patients' characteristics). In all samples tested, the expression of REG1A, REG4 and SERPINB5 was localised exclusively to the intestinal epithelium, whereas both epithelial cells and a subset of lamina propria cells stained for S100P (figure 6B). As expected, non-IBD control samples showed negative or mild staining for REG4, S100P, SERPINB5 and REG1A, while these four proteins exhibited significantly increased expression in the inflamed mucosa of active UC patients (representative immunostainings are shown in figure 6B). The intensity for each protein was determined using a qualitative score ranging from 0 to 2 (0=negative stain, 1=mild stain, 2=strong stain). Expression of S100P and SERPINB5 was significantly higher in UC in remission (p<0.04) compared with controls, while the expression of REG4 did not reach statistical significance (p=0.13). In agreement with the transcriptional data (both microarray and real-time RT-PCR), expression of REG1A in UC-in-remission patients was comparable with non-IBD controls and significantly different (p<0.005) from that of the involved areas of UC active patients (figure 6C).

DISCUSSION

In the present study, we examined the transcriptional profile of the intestinal mucosa of UC patients in remission, using a whole-genome approach. Our study identified pathways that are permanently deregulated in UC despite endoscopic and histological remission.

During active inflammation, a large number of genes are significantly regulated in UC patients.⁷⁻¹² As is common in stressed tissues, this includes purely pro-inflammatory genes, and numerous protecting and regenerating mechanisms. Activation of these mechanisms of defense is essential to overcoming cellular stress. In fact, a failure to correctly do so can lead to more severe tissue damage and/or chronic inflammation. These protective mechanisms, which are induced as a response to stress, need to be turned off once the stressor (eg, infectious organism, damaging agent, etc) is eliminated in order to avoid, for instance, uncontrolled cell proliferation, which can lead to fibrosis or dysplasia. In the context of chronic inflammation

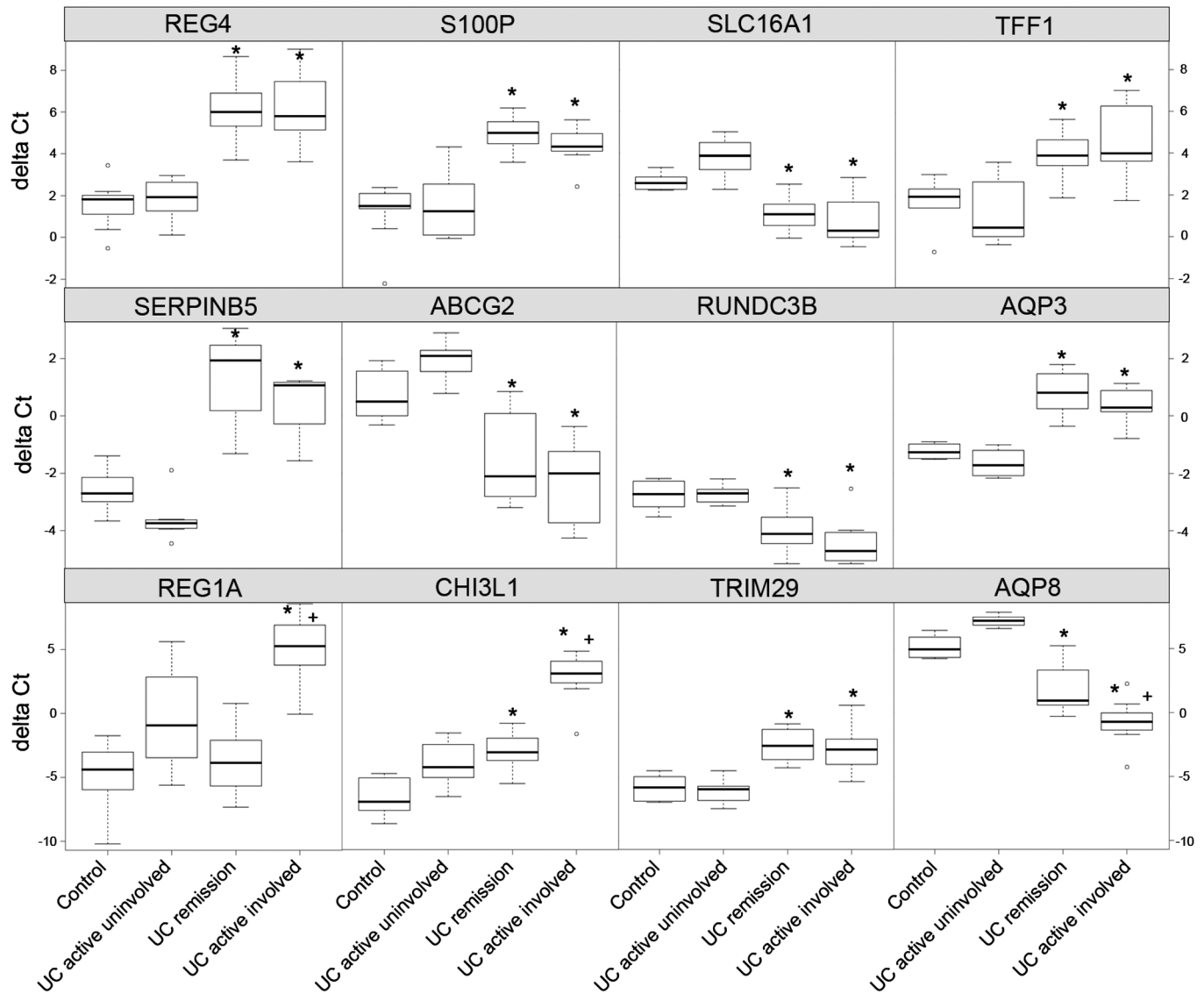


Figure 5 Expression of selected epithelial cells-expressed genes determined by real-time reverse transcriptase PCR (RT-PCR) in non-inflammatory bowel disease (non-IBD) controls and ulcerative colitis (UC) patients with active and inactive disease. Boxplot representation of 12 epithelial cell-expressed genes as measured by real-time RT-PCR (delta Ct) in cohort 2, including 10 non-IBD controls, 12 UC remission, 8 UC active uninvolved and 7 UC active involved samples. Statistical significance compared with controls (* $p < 0.05$) and with UC in remission (+ $p < 0.05$) is shown.

(UC), however, it remains unclear whether these genes, which belong to both pro-inflammatory and protective subsets, return to homeostatic levels once inflammation is under control.

As we and others,^{9 12 13 18 19} have shown, remission can indeed be accomplished by modulating the inflammatory response with a large number of reversibly modulated genes capable of returning to basal levels. These include genes that transcribe for cytokines, adhesion molecules, immunoglobulins, antimicrobial peptides and tissue-remodelling enzymes, among many others. Achieving expression profiles for this gene set comparable with those seen in a healthy intestine appears to be necessary in order to completely heal the mucosa of UC patients. These genes (ie, IL8, REG1A and CXCL1) and the proteins they encode may therefore represent important targets whose modulation would be associated with mucosal healing and clinical recovery. Moreover, they may constitute good biomarkers that closely correlate with clinical, endoscopic and histological remission, as we have recently shown.¹⁹ While this

set of genes is reversibly induced or repressed, a second group that is also significantly up- or down-regulated in active disease shows only partial or no modulation in inactive patients, despite complete histological and endoscopic remission. This suggests that modulation of this gene set is not required to achieve mucosal healing, and that—in contrast to the first set of reversibly modulated genes—these genes may not serve as candidate targets or biomarkers of disease activity. Overall, our data strongly suggests that the involved intestinal mucosa of UC patients does not return to “normal” after inflammation has resolved, but rather remains in a permanently altered state characterised by a unique transcriptional signature. Importantly, many of the genes we identified as being perturbed in UC-in-remission mucosa have been widely reported to be associated with the development of gastrointestinal carcinomas.^{20–25} In particular, REG4, S100P and SERPINB5, three of the genes here associated with the inactive UC signature, are known to be involved in epithelial cell proliferation and

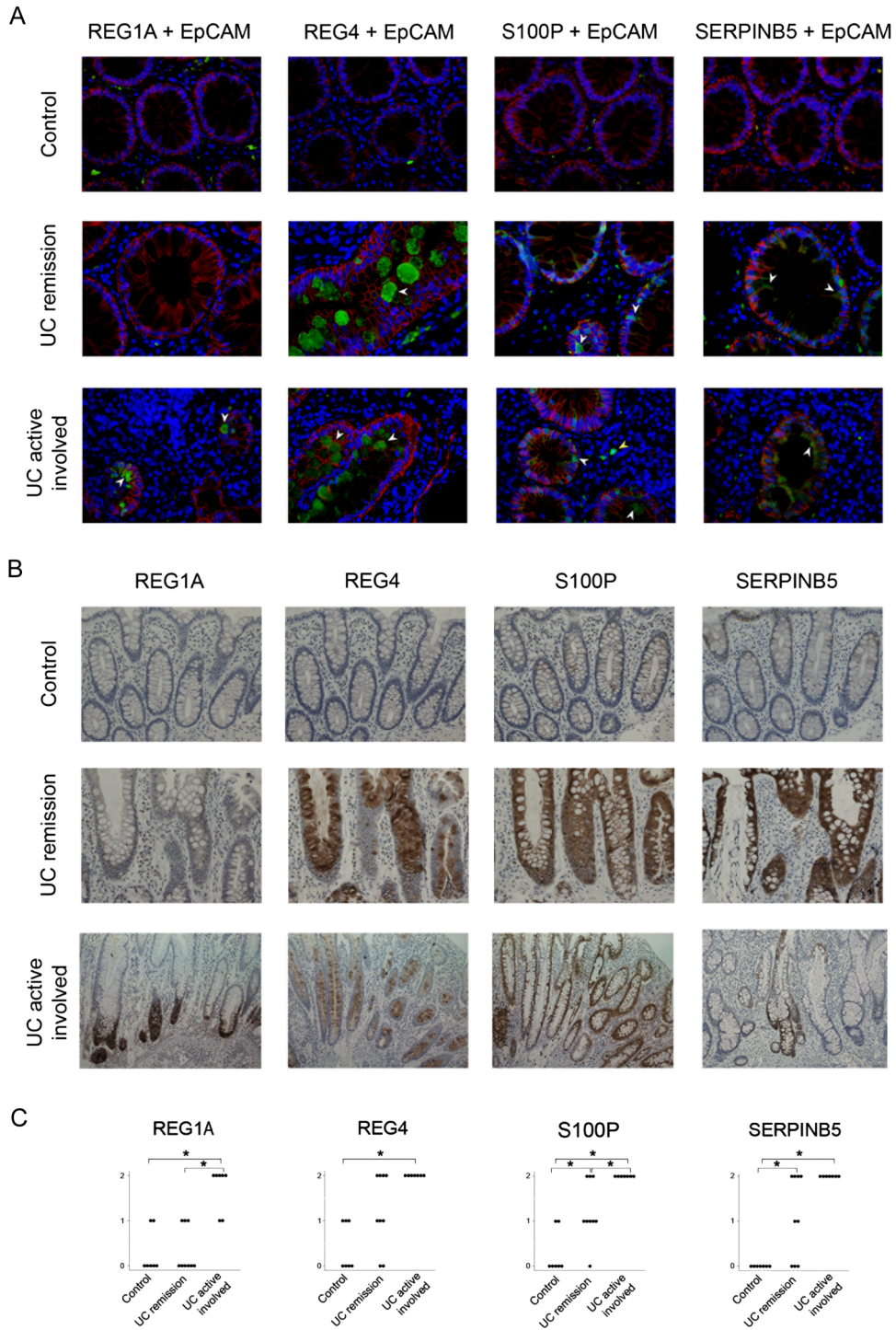


Figure 6 Immunostaining of REG1A, REG4, S100P and SERPINB5 in epithelial cells shows different intensity patterns in active ulcerative colitis (UC) or UC in remission and non-inflammatory bowel disease (non-IBD) control biopsy samples. (A) Representative two-colour immunofluorescent staining of fixed paraffin-embedded colonic tissue from one non-IBD control, one UC-in-remission patient (involved mucosa), and from an active UC (UC active involved) patient. All samples were co-stained with EpCAM (red) and one of the following selected markers: REG1A, REG4, S100P or SERPINB5 (green). Sections were counterstained with DAPI (blue). Images were obtained using a 40x objective. White arrows highlight co-localisation of proteins. The yellow arrow shows S100P expression by non-epithelial cells. (B) Representative immunohistochemical staining of fixed paraffin-embedded colonic tissue from one non-IBD control, from the involved area of a patient with endoscopically and histologically inactive UC (UC in remission), and from a patient with active UC (UC active involved). All samples were stained with REG1A, REG4, S100P and SERPINB5 antibodies. Sections were counterstained with haematoxylin. Images from the non-IBD control and the UC remission patient were taken with a 20x objective lens, while the UC active involved subject image was obtained using a 10x objective lens in order to view the whole crypt length. (C) Scatterplot representation of qualitative scores for REG1A, REG4, S100P and SERPINB5 immunohistochemical staining in a cohort of 23 patients (non-IBD controls, n=7; inactive UC (UC remission), n=9; active UC (UC active involved), n=7). Each black dot represents one individual sample. Staining scores range between 0 and 2 (0=negative stain, 1=mild stain, 2=strong stain) for all proteins. Statistical significance between groups was determined using Fisher's exact test and is represented as *p<0.05.

resistance to apoptosis. REG4 is the most recently described member of the regenerating C-type lectin family of proteins.²⁶ REG4 promotes cell growth by inducing the expression of the anti-apoptotic genes BCL-2, BCL-X and Survivin,²⁷ and its transcription is induced by different growth factors.²⁸ By contrast, expression of the genes that encode for other family members, such as REG1A and REG3, is induced in response to pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6, IL-8, IFN- γ or IL-1 β ,^{28, 29} and as we show here, is significantly down-regulated during remission.

S100P belongs to the S100 family of proteins (which includes S100A8/S100A9, also known as calprotectin, a widely used faecal biomarker of disease activity in UC). This family of proteins is involved in the regulation of cell-cycle progression and differentiation. Similar to REG4, S100P is frequently over-expressed in several epithelial tumour types, including CRC.²⁴ Interestingly, a recent study reported the over-expression of S100P in both UC-associated high-grade dysplasia and colon cancer, and in the non-dysplastic mucosa of UC patients who progressed to dysplasia.³⁰ These findings suggest that there are changes in protein expression early in the neoplastic progression, before any histological changes become evident in epithelial cells.

SERPINB5 (MASPIN) is an intracellular serine protease inhibitor. Expression of SERPINB5 has been shown to gradually increase from non-cancerous mucosa to adenocarcinoma through adenoma.³¹ SERPINB5 expression reportedly increased in over 90% of patients with active IBD, compared with 10% of healthy controls. In inactive chronic IBD, expression was seen in about 40% of patients,³² in close agreement with our own results.

Importantly, our validated UC-in-remission signature included other epithelial cell-related genes including defensin DEFB1, SLC16A1 encoding for the butyrate receptor, the aquaporins AQP3 and AQP8, the trefoil factor TFF1, and those genes encoding for less well-known proteins such as TRIM29 and RUNDC3B. DEFB1 encodes for the antimicrobial peptide defensin β 1, which is constitutively expressed in the intestinal epithelium.³³ Defensins are key effectors of the innate immune response in the intestine. A decrease in expression of DEFB1 has been shown in colonic Crohn's disease, but not in UC.³³ Using larger cohorts of patients, both we and others,¹⁴ have shown that DEFB1 is indeed significantly down-regulated in active UC and in recovered inactive patients, compared with non-IBD controls. Defective production of antimicrobial peptides could potentially lead to activation of the mucosal immune system and to promotion of disease relapse.

Another interesting target identified in this study is the SLC16A1 gene encoding for the butyrate receptor. Butyrate is a product of commensal metabolism and provides about 70% of the total energy requirements of colonocytes. A reduction in expression of the butyrate receptor during active UC has been previously reported to result in decreased butyrate oxidation.^{34, 35} Apart from being a source of energy for colonocytes, butyrate is involved in the inhibition of several key processes, such as colonic carcinogenesis, inflammation and oxidative stress. A decrease in SLC16A1 in intestinal epithelial cell lines reduces the intracellular availability of butyrate, thereby potentially affecting its oxidation and its regulatory effects on cell proliferation, differentiation, apoptosis and inflammation.^{36–39} Therefore, lower SLC16A1 expression might promote uncontrolled epithelial cell proliferation and contribute to the risk of CRC development. Indeed, SLC16A1 expression is down-regulated dramatically during colon carcinogenesis. This down-regulation of SLC16A occurs as a relatively early event in the adenoma-carcinoma sequence.²⁵

In summary, using transcriptional analysis of the intestinal mucosa we describe herein a unique molecular signature associated with UC in remission. By showing that this gene set is being aberrantly expressed in remitting UC mucosa, we believe the evidence points to new molecular mechanisms that potentially become perturbed in the involved mucosa of UC patients in remission. Interestingly, this signature closely resembles that of the malignantly transformed epithelium. The important question to answer is whether permanent deregulation of these genes influences long-term UC-associated complications such as epithelial cell transformation, loss of intestinal function and disease relapse. While we cannot conclude from our study what the physiological consequences of maintaining these genes in a permanently perturbed state are, one can speculate that in the absence of active inflammation (in the remitting mucosa), the continued aberrant expression of these genes may facilitate the growth of spontaneously occurring malignant epithelial cells and/or promote disease relapse. Whether any of these genes could serve as reliable predictors of progression to CRC in UC patients requires further study.

Acknowledgements We thank the Endoscopy Department at Hospital Clinic Barcelona for providing us with the samples required to conduct this study, and our patients for their selfless participation. We are indebted to Dr Daniel Benitez-Ribas, Dr Elisabeth Calderón-Gómez, and Dr Isabella Dotti for their critical reading of the manuscript and to Joe Moore for the editorial assistance.

Competing interests None.

Contributors AS and JP designed the study; MCM, IO and ER recruited patients; IO and ER assessed clinical disease activity; MJ assessed histological disease activity; NP, RMB and ME performed experiments; NP and JLL performed bioinformatic and biostatistic analysis; and AS, NP, JMP and JP wrote the manuscript.

Funding This work was supported by grant BFU2008–02 683/BFI to AS from the Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain, and by CIBERehd.

Ethics approval Hospital Clínic Ethical Committee.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

Data sharing statement Microarray raw data from samples included in this study have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus and are accessible through GEO Series accession number GSE38713.

REFERENCES

- Langholz E, Munkholm P, Davidsen M, *et al*. Course of ulcerative colitis: analysis of changes in disease activity over years. *Gastroenterology* 1994;**107**:3–11.
- Colombel JF, Rutgeerts P, Reinisch W, *et al*. Early mucosal healing with infliximab is associated with improved long-term clinical outcomes in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2011;**141**:1194–201.
- Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, *et al*. *Mucosal immunology*. San Diego; Academic Press, 1999.
- Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 2001;**48**:526–35.
- Rutter MD, Saunders BP, Wilkinson KH, *et al*. Thirty-year analysis of a colonoscopic surveillance program for neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2006;**130**:1030–8.
- Farraye FA, Odze RD, Eaden J, *et al*. AGA technical review on the diagnosis and management of colorectal neoplasia in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2010;**138**:746–74, 774 e741–44; quiz e712–43.
- 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.
- Dieckgraefe BK, Stenson WF, Korzenik JR, *et al*. Analysis of mucosal gene expression in inflammatory bowel disease by parallel oligonucleotide arrays. *Physiol Genomics* 2000;**4**:1–11.
- Noble CL, Abbas AR, Cornelius J, *et al*. Regional variation in gene expression in the healthy colon is dysregulated in ulcerative colitis. *Gut* 2008;**57**:1398–405.
- Okahara S, Arimura Y, Yabana T, *et al*. Inflammatory gene signature in ulcerative colitis with cDNA microarray analysis. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;**21**:1091–7.
- Costello CM, Mah N, Häslér R, *et al*. Dissection of the inflammatory bowel disease transcriptome using genome-wide cDNA microarrays. *PLoS Med* 2005;**2**:771–87.
- Wu F, Dassopoulos T, Cope L, *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.

13. **Bjerrum JT**, Hansen M, Olsen J, *et al.* Genome-wide gene expression analysis of mucosal colonic biopsies and isolated colonocytes suggests a continuous inflammatory state in the lamina propria of patients with quiescent ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2010;**16**:999–1007.
14. **Arijs I**, De Hertogh G, Lemaire K, *et al.* Mucosal gene expression of antimicrobial peptides in inflammatory bowel disease before and after first infliximab treatment. *PLoS One* 2009;**4**:e7984.
15. **Stange EF**, Travis SP, Vermeire S, *et al.* European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis* 2008;**2**:1–23.
16. **Schroeder KW**, Tremaine WJ, Ilstrup DM. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study. *N Engl J Med* 1987;**317**:1625–9.
17. **Matts SG**. The value of rectal biopsy in the diagnosis of ulcerative colitis. *Q J Med* 1961;**30**:393–407.
18. **Olsen J**, Gerdts TA, Seidelin JB, *et al.* Diagnosis of ulcerative colitis before onset of inflammation by multivariate modeling of genome-wide gene expression data. *Inflamm Bowel Dis* 2009;**15**:1032–8.
19. **Roman J**, Planell N, Lozano JJ, *et al.* Evaluation of responsive gene expression as a sensitive and specific biomarker in patients with ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* Published Online First: 12 May 2012. doi: 10.1002/ibd.23020
20. **Kamarainen M**, Heiskala K, Knuutila S, *et al.* RELP, a novel human REG-like protein with up-regulated expression in inflammatory and metaplastic gastrointestinal mucosa. *Am J Pathol* 2003;**163**:11–20.
21. **Oue N**, Kuniyasu H, Noguchi T, *et al.* Serum concentration of Reg IV in patients with colorectal cancer: overexpression and high serum levels of Reg IV are associated with liver metastasis. *Oncology* 2007;**72**:371–80.
22. **Glebov OK**, Rodriguez LM, Soballe P, *et al.* Gene expression patterns distinguish colonoscopically isolated human aberrant crypt foci from normal colonic mucosa. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;**15**:2253–62.
23. **Birkenkamp-Demtroder K**, Olesen SH, Sorensen FB, *et al.* Differential gene expression in colon cancer of the caecum versus the sigmoid and rectosigmoid. *Gut* 2005;**54**:374–84.
24. **Fuentes MK**, Nigavekar SS, Arumugam T, *et al.* RAGE activation by S100P in colon cancer stimulates growth, migration, and cell signaling pathways. *Dis Colon Rectum* 2007;**50**:1230–40.
25. **Lambert DW**, Wood IS, Ellis A, *et al.* Molecular changes in the expression of human colonic nutrient transporters during the transition from normality to malignancy. *Br J Cancer* 2002;**86**:1262–9.
26. **Rafa L**, Dessein AF, Devisme L, *et al.* REG4 acts as a mitogenic, motility and pro-invasive factor for colon cancer cells. *Int J Oncol* 2010;**36**:689–98.
27. **Bishnupuri KS**, Luo Q, Sainathan SK, *et al.* Reg IV regulates normal intestinal and colorectal cancer cell susceptibility to radiation-induced apoptosis. *Gastroenterology* 2010;**138**:616–26, 626 e611–12.
28. **Nanakin A**, Fukui H, Fujii S, *et al.* Expression of the REG IV gene in ulcerative colitis. *Lab Invest* 2007;**87**:304–14.
29. **Sekikawa A**, Fukui H, Fujii S, *et al.* Possible role of REG alpha protein in ulcerative colitis and colitic cancer. *Gut* 2005;**54**:1437–44.
30. **Brentnall TA**, Pan S, Bronner MP, *et al.* Proteins That Underlie Neoplastic Progression of Ulcerative Colitis. *Proteomics Clin Appl* 2009;**3**:1326.
31. **Zheng H**, Tsuneyama K, Cheng C, *et al.* Maspin expression was involved in colorectal adenoma-adenocarcinoma sequence and liver metastasis of tumors. *Anticancer Res* 2007;**27**:259–65.
32. **Cao D**, Wilentz RE, Abbruzzese JL, *et al.* Aberrant expression of maspin in idiopathic inflammatory bowel disease is associated with disease activity and neoplastic transformation. *Int J Gastrointest Cancer* 2005;**36**:39–46.
33. **Peyrin-Biroulet L**, Beisner J, Wang G, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation is required for maintenance of innate antimicrobial immunity in the colon. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;**107**:8772–7.
34. **De Preter V**, Arijs I, Windey K, *et al.* Impaired butyrate oxidation in ulcerative colitis is due to decreased butyrate uptake and a defect in the oxidation pathway. *Inflamm Bowel Dis* 2012;**18**:1127–36.
35. **Thibault R**, De Coppet P, Daly K, *et al.* Down-regulation of the monocarboxylate transporter 1 is involved in butyrate deficiency during intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2007;**133**:1916–27.
36. **Inan MS**, Rasoulopour RJ, Yin L, *et al.* The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF-kappaB activity in a human colonic epithelial cell line. *Gastroenterology* 2000;**118**:724–34.
37. **Segain JP**, Raingeard de la Bletiere D, Bourrille A, *et al.* Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* 2000;**47**:397–403.
38. **Siavoshian S**, Segain JP, Kornprobst M, *et al.* Butyrate and trichostatin A effects on the proliferation/differentiation of human intestinal epithelial cells: induction of cyclin D3 and p21 expression. *Gut* 2000;**46**:507–14.
39. **Cuff M**, Dyer J, Jones M, *et al.* The human colonic monocarboxylate transporter Isoform 1: its potential importance to colonic tissue homeostasis. *Gastroenterology* 2005;**128**:676–86.

Estudi 2.

Usefulness of transcriptional blood biomarkers as a non-invasive surrogate marker of mucosal healing and endoscopic response in ulcerative colitis

Núria Planell^{1,2}, M Carme Masamunt¹, Raquel Franco Leal^{1,3},
Lorena Rodríguez⁴, Miriam Esteller¹, Juan J Lozano², Anna
Ramírez¹, Maria de Lourdes Setsuko Ayrizono³, Claudio Saddy
Rodrigues Coy³, Ignacio Alfaro¹, Ingrid Ordás¹, Sudha
Visvanathan⁵, Elena Ricart¹, Jordi Guardiola⁴, Julián Panés¹,
Azucena Salas¹

¹ Department of Gastroenterology, IDIBAPS, Hospital Clínic, CIBER-EHD, Barcelona 08036, Spain. ² Bioinformatics Platform, CIBER-EHD, Barcelona 08036, Spain. ³ IBD Research Laboratory, Surgery Department, University of Campinas, Sao Paulo, Brazil. ⁴ Department of Gastroenterology, Hospital Universitari de Bellvitge-Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. ⁵ Boehringer-Ingelheim Pharmaceuticals Inc, Ridgefield, CT, USA

Journal of Crohn's and Colitis 11.11 (2017): 1335-1346

Resum

Objectius. La Colitis Ulcerosa (CU) és una malaltia inflamatòria del còlon. El procediment de referència actual per avaluar l'activitat de la malaltia és la colonoscòpia ja que la precisió de la simptomatologia clínica és insuficient. L'objectiu del present estudi és la identificació de biomarcadors fiables i no invasius, a partir de l'anàlisi transcripcional de sang perifèrica, que permetin predir la presència de lesions intestinals i la resposta a tractaments en pacients amb CU.

Metodologia. Es recullen mostres de sang perifèrica d'un total de 152 pacients amb CU en el moment de l'endoscòpia. L'ARN de sang total de 25 pacients amb CU i 20 controls sans és analitzat mitjançant microarrays. Un subconjunt dels gens que es correlacionen amb l'activitat endoscòpica de la malaltia són validats mitjançant PCR a temps real en una cohort independent de 111 pacients amb CU. El poder predictiu d'aquests per a determinar lesions intestinals és avaluat. La resposta a tractament s'explora en una cohort longitudinal que inclou 16 casos amb CU tractats amb anti-TNF- α i seguits durant 14 setmanes.

Resultats. L'anàlisi de microarrays mostra 122 gens significativament alterats en la sang de pacients de CU endoscòpicament activa. Una correlació significativa amb el grau d'activitat endoscòpica s'observa en varis gens, incloent *HP*, *CD177*, *GPR84* i *S100A12*. Utilitzant *HP* com a transcript predictor de l'activitat endoscòpica obtenim una precisió del 67,3%, mentre que utilitzant la PCR, la VSG o el recompte de plaquetes la precisió és del 52,4, 45,2 i 30,3%, respectivament. Finalment, després de 14 setmanes de tractament, la resposta a anti-TNF- α induïx alteracions en l'expressió d'*HP*, *CD177*, *GPR84* i *S100A12* en sang perifèrica que es correlacionen amb els canvis de l'activitat endoscòpica de la malaltia.

Conclusions. Els canvis transcripcionals observats en sang perifèrica de pacients amb CU són sensibles a la millora endoscòpica i poden esdevenir una bona eina per monitoritzar els pacients amb CU.

Original Article

Usefulness of Transcriptional Blood Biomarkers as a Non-invasive Surrogate Marker of Mucosal Healing and Endoscopic Response in Ulcerative Colitis



Núria Planell,^{a,b} M. Carme Masamunt,^a Raquel Franco Leal,^{a,c}
Lorena Rodríguez,^d Miriam Esteller,^a Juan J. Lozano,^b Anna Ramírez,^a
Maria de Lourdes Setsuko Ayrizono,^c Claudio Saddy Rodrigues Coy,^c
Ignacio Alfaro,^a Ingrid Ordás,^a Sudha Visvanathan,^e Elena Ricart,^a
Jordi Guardiola,^d Julián Panés,^a Azucena Salas^a

^aDepartment of Gastroenterology, IDIBAPS, Hospital Clínic, CIBER-EHD, Barcelona, Spain ^bBioinformatics Platform, CIBER-EHD, Barcelona, Spain ^cIBD Research Laboratory, Surgery Department, University of Campinas, Sao Paulo, Brazil ^dDepartment of Gastroenterology, Hospital Universitari de Bellvitge-Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain ^eBoehringer-Ingelheim Pharmaceuticals, Ridgefield, CT, USA

Corresponding author: Azucena Salas, Department of Gastroenterology, IDIBAPS, Hospital Clínic, CIBERehd, Barcelona 080036, Spain. Tel.: +34-932272436; email: asalas1@clinic.cat

Abstract

Background and Aims: Ulcerative colitis [UC] is a chronic inflammatory disease of the colon. Colonoscopy remains the gold standard for evaluating disease activity, as clinical symptoms are not sufficiently accurate. The aim of this study is to identify new accurate non-invasive biomarkers based on whole-blood transcriptomics that can predict mucosal lesions and response to treatment in UC patients.

Methods: Whole-blood samples were collected for a total of 152 UC patients at endoscopy. Blood RNA from 25 UC individuals and 20 controls was analysed using microarrays. Genes that correlated with endoscopic activity were validated using real-time polymerase chain reaction in an independent group of 111 UC patients, and a prediction model for mucosal lesions was evaluated. Responsiveness to treatment was assessed in a longitudinal cohort of 16 UC patients who started anti-tumour necrosis factor [TNF] therapy and were followed up for 14 weeks.

Results: Microarray analysis identified 122 genes significantly altered in the blood of endoscopically active UC patients. A significant correlation with the degree of endoscopic activity was observed in several genes, including *HP*, *CD177*, *GPR84*, and *S100A12*. Using *HP* as a predictor of endoscopic disease activity, an accuracy of 67.3% was observed, compared with 52.4%, 45.2%, and 30.3% for C-reactive protein, erythrocyte sedimentation rate, and platelet count, respectively. Finally, at 14 weeks of treatment, response to anti-TNF therapy induced alterations in blood *HP*, *CD177*, *GPR84*, and *S100A12* transcripts that correlated with changes in endoscopic activity.

Conclusions: Transcriptional changes in UC patients are sensitive to endoscopic improvement and appear to be an effective tool to monitor patients over time.

Key Words: Gene expression; blood biomarkers; ulcerative colitis; anti-TNF- α

1. Introduction

Ulcerative colitis [UC] is a chronic inflammatory disease of the colon. Disease is characterised by continuous mucosal inflammation,¹ which in most patients, follows a remitting and relapsing course.² Disease activity can be determined by assessments of clinical symptoms and endoscopic lesions.³ Nonetheless, the potential discrepancies between clinical symptoms and endoscopic lesions,⁴ as well as the association of mucosal healing with sustained remission and reduced surgery requirements,^{2,5} makes mucosal healing a therapeutic objective in UC management.

Although endoscopy is the gold standard for assessing disease activity and severity, it carries a considerable economic cost, discomfort for patients and, in severe cases, risk of procedure complications. Moreover, the need for endoscopic procedures may negatively impact on patient recruitment in clinical trials. Consequently, considerable efforts have been made to identify reliable non-invasive biomarkers that can predict disease activity. Available serological and faecal biomarkers, although widely used in clinical practice and clinical trials, have low diagnostic accuracy for the detection of ongoing inflammation, particularly in cases of mild or moderately active UC.^{6–8}

We and others have previously shown that transcriptional analysis of intestinal biopsies is a useful tool for identifying not only disease biomarkers, but also molecular mechanisms of intestinal inflammation.^{9–13} Nonetheless, little evidence is available on the usefulness and reliability of transcriptional changes in whole-blood samples in patients suffering from inflammatory bowel disease [IBD].¹⁴

Here, we assess the sensitivity of whole-blood transcriptional changes to predict endoscopic lesions in UC. Whole-genome microarray analysis or real-time polymerase chain reaction [RT-PCR] of total blood was used in a total of 152 UC patients undergoing endoscopy to assess disease severity. Our study identifies and validates blood transcriptional biomarkers that can be used in clinical settings as predictors of endoscopic activity. Moreover, the sensitivity of the identified blood biomarkers as surrogate indicators of response to therapy was evaluated using a prospective cohort of patients receiving anti-tumour necrosis factor alpha [TNF α].

2. Materials and Methods

More detailed information is described in the supplementary materials and methods [available as Supplementary data at *ECCO-JCC* online].

2.1. Patient population and assessment of disease activity

Two cohorts of patients were included in this study. The first cohort came from a cross-sectional multicentre study, and included UC patients who had undergone clinical and endoscopic evaluations. From December 2012 to December 2015, 136 UC patients and 20 non-IBD controls (11 males; median age of 47 years (interquartile range [IQR]: 38–54)) were recruited at the Hospital Clinic Barcelona [Spain], the Hospital Universitari de Bellvitge [Spain], and the Clinical Hospital of the Faculty of Medical Sciences, University of Campinas [Brazil] [Table 1]. Non-IBD controls were those subjects undergoing a screening colonoscopy for colorectal cancer and who had had a normal examination. The second cohort came from an observational prospective study at Hospital Clinic Barcelona [Spain], and included UC patients who had been treated with an anti-TNF α antibody [infliximab, adalimumab or golimumab] and followed up for 14 weeks.

All patients underwent clinical and endoscopic evaluations at Weeks 0 and 14. From January 2013 to September 2015, 16 UC patients were included [Table 2]. Patients with concomitant infections were excluded from both cohorts.

Institutional ethics committee approval was required in all centres and written informed consent was obtained for all patients.

As we hypothesised that changes in a systemic biomarker [such as a transcript in blood] may be influenced by the inflammatory burden [whole disease extension and activity at a given time point],¹⁵ two different endoscopic scores were reported; the endoscopic Mayo score and the Modified Score [MS, sum of the endoscopic Mayo score for the five colonic segments].¹⁶ For those cases with incomplete colonoscopy [$n = 16$], the MS could not be calculated. Endoscopic remission was defined as an endoscopic Mayo score or MS = 0.

2.2. Blood collection

Whole blood [2.5 ml] for RNA extraction was collected at the time of endoscopy using the PAXgene Blood RNA System [PreAnalytiX GmbH, Switzerland] according to the manufacturer's instructions. Blood was also collected for standard clinical tests (C-reactive protein [CRP], erythrocyte sedimentation rate [ESR], platelet count, etc.) and to measure haptoglobin concentration [ADVIA Chemistry System, Siemens Healthineers, Germany].

2.3. RNA isolation

Total blood RNA was isolated using the PAXgene Blood RNA Kit [Qiagen, Spain] in a QIAcube instrument [Qiagen, Spain] following the manufacturer's instructions. Additional DNase Treatment & Removal [Ambion, Life Technologies, USA] was used to safely eliminate DNA contamination from RNA samples. Purity and integrity of the total RNA were assessed with the 2100 Bioanalyzer [Agilent, Germany] and only samples with an RNA integrity number [RIN] > 7.0 were used. RNA was quantified using a NanoDrop spectrophotometer [Nanodrop Technologies, USA].

2.4. Microarray

The derived cDNA from whole blood [Group 1, Table 1], produced by Ovation® PicoSL WTA System V2 [NuGEN, USA], was hybridised to high-density oligonucleotide Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays [Affymetrix, USA] and raw data were analysed using Bioconductor tools in R [version 3.1.0].^{17–23}

Microarray raw data [.cel files] and processed data have been deposited in the National Center for Biotechnology Information [NCBI] 's Gene Expression Omnibus²⁴ and are accessible through GEO Series accession number GSE94648 [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc = GSE94648].

2.5. Quantitative RT-PCR

Microarray transcriptional data was validated using RT-PCR analysis for a selected set of 23 target genes and four endogenous controls [Supplementary Table 1, available as Supplementary data at *ECCO-JCC* online]. Technical validation was performed in a subset of samples previously evaluated by microarray. For biological validation, an independent group of samples [Group 2, Table 1] was employed.

Total RNA [500 ng] was transcribed to cDNA and real-time PCR was performed using custom-designed TaqMan Low Density Arrays [TLDA platform, Applied Biosystems, Life Technologies, USA].²⁵

Table 1. Clinical and demographic characteristics of UC patients from cohort 1. Patients with UC are divided into active or remission, based on their endoscopic Mayo scores. Continuous variables are described as median and IQR, and categorical variables as absolute frequencies and percentages; *p*-values from non-parametric tests are shown.

Cohort 1: Clinical and demographic characteristics			
	Active UC	Remission UC	<i>p</i> -Value
Total	103	33	—
Microarray [Group 1]			
Total	17	8	—
Gender			0.39
Male	12 [70.6%]	4 [50%]	
Female	5 [29.4%]	4 [50%]	
Age [years]	45 [35–54]	52 [43–57]	0.22
Duration of disease [years]	9 [3–12]	13 [13–22]	< 0.01
Extent of disease			0.14
Proctitis	1 [5.9%]	3 [37.5%]	
Left-sided colitis	12 [70.6%]	3 [37.5%]	
Extensive colitis	4 [23.5%]	2 [25%]	
Medication			0.88
No treatment	2 [11.8%]	2 [25%]	
5-ASA	10 [58.8%]	5 [62.5%]	
Immunosuppressors	2 [11.8%]	1 [12.5%]	
Anti-TNF	2 [11.8%]	0 [0%]	
Steroids	1 [5.9%]	0 [0%]	
Combined therapy	0 [0%]	0 [0%]	
CRP [mg/dL]	1.1 [0.3–1.8]	0.2 [0.02–0.3]	< 0.01
ESR [mm/h]	16.0 [7.0–22.8]	16.0 [12.0–18.3]	0.94
Platelet count [10 ⁹ /L]	320 [291–381]	233 [189–386]	0.14
Global Mayo Score	7 [5–8]	0 [0–0]	< 0.01
Endoscopic Mayo Score			—
Score 0	0 [0%]	8 [100%]	
Score 1	1 [5.9%]	0 [0%]	
Score 2	4 [23.5%]	0 [0%]	
Score 3	12 [70.6%]	0 [0%]	
N/L Ratio	3.3 [2.6–3.5]	2.6 [2.2–2.9]	0.20
Real-Time PCR [Group 2]			
Total	86	25	—
Gender			0.25
Male	53 [61.6%]	12 [48%]	
Female	33 [38.4%]	13 [52%]	
Age [years]	45 [36–56]	50 [37–60]	0.42
Duration of disease [eayrs]	9 [4–15]	15 [11–23]	< 0.01
Extent of disease			0.38
Proctitis	21 [24.4%]	3 [12%]	
Left-sided colitis	25 [29.1%]	9 [36%]	
Extensive colitis	40 [46.5%]	13 [52%]	
Medication			0.07
No treatment	4 [4.7%]	4 [16%]	
5-ASA	32 [37.2%]	13 [52%]	
Immunosuppressors	18 [20.9%]	5 [20%]	
Anti-TNF	7 [8.1%]	2 [8%]	
Steroids	11 [12.8%]	0 [0%]	
Combined therapy	14 [16.3%]	1 [4%]	
CRP [mg/dL]	0.84 [0.17–2.24]	0.12 [0.03–0.5]	< 0.01
ESR [mm/h]	11.5 [7.0–26.5]	10.0 [5.5–15.5]	0.25
Platelet count [10 ⁹ /L]	279 [228–323]	252 [194–273]	0.03
Global Mayo Score	6 [2–8.8]	0 [0–0]	< 0.01
Endoscopic Mayo Score			—
Score 0	0 [0%]	25 [100%]	
Score 1	24 [27.9%]	0 [0%]	
Score 2	21 [24.4%]	0 [0%]	
Score 3	41 [47.7%]	0 [0%]	
MS	4 [2–7.8]	0 [0–0]	—

Table 1. Continued

Cohort 1: Clinical and demographic characteristics			
	Active UC	Remission UC	<i>p</i> -Value
Neutrophils [%]	64.5 [57.1–68.7]	61 [54.5–68.2]	0.27
Neutrophil count [$10^9/L$]	3.9 [3.0–5.9]	3.6 [2.9–4.9]	0.28
N/L ratio	2.8 [1.9–3.2]	2.1 [1.5–3.1]	0.16

UC, ulcerative colitis; IQR, interquartile range; 5-ASA, 5-aminosalicylic acid; TNF, tumour necrosis factor; CRP, C-reactive protein; ESR, erythrocyte sedimentation rate; RT-PCR, real-time polymerase chain reaction; N/L ratio; neutrophil-lymphocyte ratio; MS; Modified Score [sum of endoscopic Mayo score of each segment], only available for patients with complete endoscopy procedure [$n = 95$].

Table 2. Clinical and demographic characteristics of UC patients from cohort 2. Patients' demographics and clinical characteristics at screening [Week 0] and at Week 14. Continuous variables are described as median and IQR, and categorical variables as absolute frequencies and percentages; *p*-values from paired analysis between Weeks 0 and 14 are shown.

COHORT 2: Clinical and demographic characteristics			
	Week 0	Week 14	<i>p</i> -Value
Number of cases	16		
Gender [male/female]			
Male	9 [56.3%]		
Female	7 [43.7%]		
Age [years]	41 [35–53]		
Duration of disease [years]	6 [3–18]		
Extent of disease			
Proctitis	0 [0%]		
Left-sided colitis	5 [31.3%]		
Extensive colitis	11 [68.7%]		
Medication	< 0.01		
No treatment	2 [12.5%]		
5-ASA	1 [6.3%]		
Immunosuppressors	10 [62.5%]		
Anti-TNF	2 [12.5%] ^a		
Steroids	1 [6.3%]		
Combined therapy	0 [0%]		
CRP [mg/dL]	2 [0.4–3.7]		
ESR [mm/h]	43 [17.5–66.5]		
Platelet count [$10^9/L$]	368 [252–503]		
Global Mayo Score	9 [8–9]		
Endoscopic Mayo Score	6 [2–9]		
Score 0	0 [0%]		
Score 1	1 [6.3%]		
Score 2	3 [18.7%]		
Score 3	3 [18.7%]		
MS	9 [81.3%]		
Neutrophils [%]	9 [5.8–12]		
Neutrophil count [$10^9/L$]	7 [2–9.8]		
N/L ratio	0.04		
MS	7 [2–9.8]		
Neutrophils [%]	63.6 [56.7–73.42]		
Neutrophil count [$10^9/L$]	3.2 [2.5–6.2]		
N/L ratio	2.8 [2.1–4.4]		
			0.02

UC, ulcerative colitis; IQR, interquartile range; 5-ASA, 5-aminosalicylic acid; TNF, tumour necrosis factor; CRP, C-reactive protein; ESR, erythrocyte sedimentation rate; N/L ratio; neutrophil-lymphocyte ratio; MS; Modified Score [sum of endoscopic Mayo score of each segment].

^aThese two cases were treated with an anti-TNF α drug, but stopped due to no response and started a different one.

2.6. Statistical analysis

Continuous variables were described as median and IQR, and categorical variables as absolute frequencies. Pearson's product moment correlation coefficient was applied for continuous variables in order to identify the linear association between paired samples. The Spearman rank correlation coefficient was applied in order to test any associations between continuous and ordinal variables or between continuous variables without assuming a linear relationship. The relationship between categorical variables was assessed by Fisher's exact test. The Mann-Whitney-Wilcoxon and Kruskal-Wallis

tests were carried out to analyze the statistical significance of differences between groups [difference between two populations or among more than two populations, respectively]. To correct for multiple testing, the method of Benjamini and Hochberg²³ was used. The logistic regression was used to predict endoscopic activity, and the lasso regression analysis method [least absolute shrinkage and selection operator] was performed for variable selection.²⁶ The receiver operating characteristic [ROC] area under the curve [AUC] was then calculated to assess the ability to detect mucosal lesions in our models, and the DeLong's test was used to determine significant

differences between the ROC curves. A p -value ≤ 0.05 was considered statistically significant. All analyses were performed using R statistical environment [V.3.1.0].

3. Results

3.1. Whole-blood transcriptional analysis identifies changes in gene expression associated with the presence of endoscopic mucosal lesions in UC

We first carried out whole-blood microarray transcriptional analysis of 25 UC patients with endoscopically active disease [$n = 17$] or in remission [$n = 8$] [Table 1, Group 1] and 20 non-IBD controls. This analysis revealed a set of 122 genes [80% upregulated] whose expression significantly changed in the peripheral blood of UC patients with endoscopic lesions compared with those in remission and non-IBD controls [Figure 1A, B; and Supplementary Table 2, available as Supplementary data at ECCO-JCC online]. The changes in blood gene expression associated with disease activity were modest. Only 15 of the identified 122 genes showed a greater than 2-fold change compared with non-IBD individuals and UC patients in endoscopic remission. A sizeable proportion of the identified genes are related to neutrophils: *CD177*,²⁷ haptoglobin [*HP*],²⁸ G-protein coupled receptor 84 [*GPR84*],²⁹ hexokinase 3 [*HK3*],^{30,31} arginase

1 [*ARG1*],³² annexin A3 [*ANXA3*],^{33,34} and S100 calcium binding protein A12 [*S100A12*].³⁵

In order to validate these findings, we performed RT-PCR for a selected set of 23 genes [Supplementary Tables 1 and 2] in an independent group of UC patients [Table 1, Group 2]. We confirmed eight genes that are significantly altered in endoscopically active [$n = 86$] compared with non-active [$n = 25$] UC patients [Figure 1B, C; Supplementary Table 3, available as Supplementary data at ECCO-JCC online].

3.2. Transcriptional changes in blood correlate with the degree of endoscopic disease activity

Next, we assessed whether whole-blood transcription could discriminate UC patients based on the degree of endoscopic disease severity [Table 1, Group 2]. We hypothesised that changes in a systemic biomarker [such as a transcript in blood] may be influenced by both severity and extension of the disease [inflammatory burden]. In order to test our hypothesis, two approaches were undertaken. First, we determined the correlation between gene expression and the endoscopic Mayo score; second, we assessed the correlation between gene expression and the MS [Modified Score; as a surrogate measure of inflammatory burden, see Materials and Methods]. The endoscopic Mayo score and the MS were highly correlated [Spearman's rank correlation

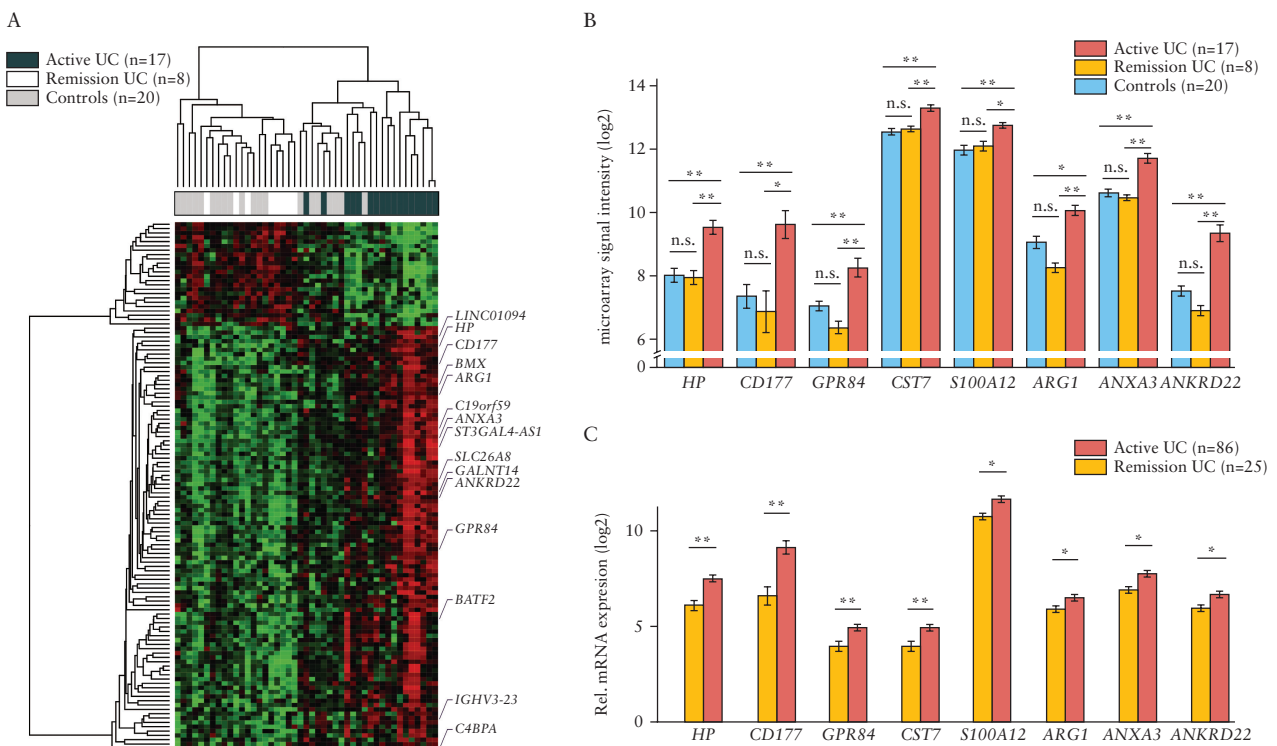


Figure 1. Whole-blood transcriptional profile associated with the presence of endoscopic mucosal lesions in UC. [A] Heatmap representation of differentially expressed genes in peripheral blood from UC and non-IBD controls according to microarray analysis [Table 1, Group 1]. A total of 122 differentially expressed genes in active UC patients [endoscopic Mayo score ≥ 1] compared with non-IBD controls and UC patients in remission [endoscopic Mayo score = 0] are represented and the 15 genes with a fold-change above 2 are highlighted. Up-regulated genes are shown in red and down-regulated genes are shown in green. Each row shows one individual gene and each column an experimental sample. Unsupervised hierarchical cluster method using Pearson distance and average linkage method was applied for gene and sample classification. Samples from non-IBD controls [shown in skyblue, $n = 20$], remission UC patients [shown in gold, $n = 8$], and active UC patients [shown in indianred, $n = 18$] are shown. [B] Bar plot representation [mean \pm MSE] of microarray data for the eight genes that have been validated by RT-PCR [Table 1, Group 1]. Samples from non-IBD controls [shown in skyblue, $n = 20$], remission UC patients [shown in gold, $n = 8$], and active UC patients [shown in indianred, $n = 18$] are shown. [C] Bar plot representations [mean \pm MSE] of the eight genes validated by RT-PCR in peripheral blood from UC patients [Table 1, Group 2]. Samples from remission UC patients [shown in gold, $n = 25$] and active UC patients [shown in indianred, $n = 86$] are shown; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ by pairwise Wilcoxon test. UC, ulcerative colitis; IBD, inflammatory bowel disease; MSE, mean squared error; RT-PCR, real-time polymerase chain reaction.

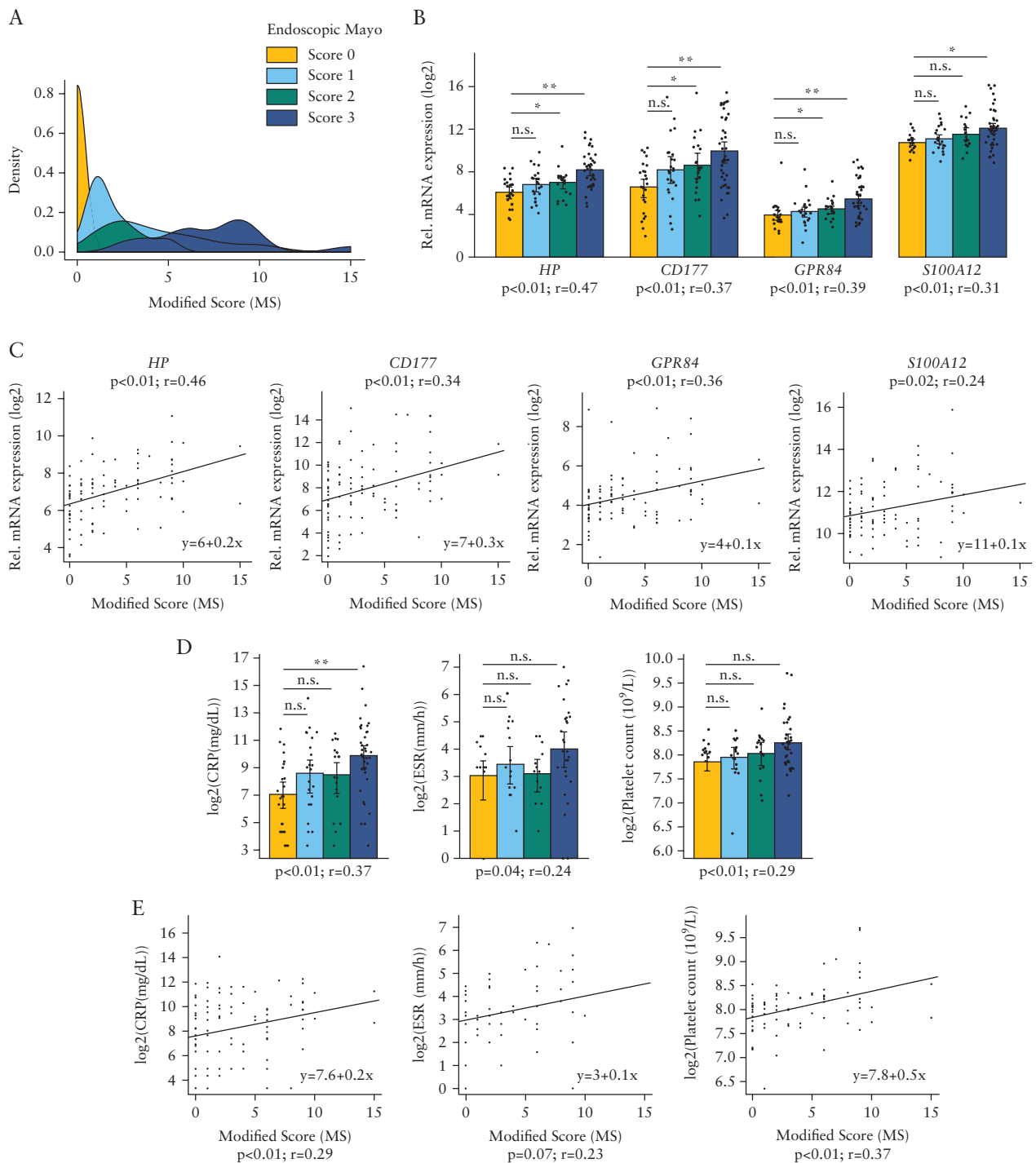


Figure 2. Association between blood transcripts and serological biomarkers with the degree of endoscopic inflammation. [A] Representations of probability density function of Modified Score [MS] for each endoscopic Mayo score. Density function of UC patients from Group 2 [Table 1] with endoscopic Mayo score equals 0 [$n = 25$, shown in gold], patients with endoscopic Mayo score = 1 [$n = 22$; shown in skyblue], patients with endoscopic Mayo score = 2 [$n = 19$; shown in seagreen], and patients with endoscopic Mayo score = 3 [$n = 29$; shown in darkblue] are shown. [B] Bar plot representation [mean \pm MSE] of *HP*, *CD177*, *GPR84*, and *S100A12* gene expression from RT-PCR analysis. Patients are categorised by endoscopic Mayo score; patients with endoscopic Mayo score = 0 [$n = 25$, shown in gold], patients with endoscopic Mayo score = 1 [$n = 24$; shown in skyblue], patients with endoscopic Mayo score = 2 [$n = 21$; shown in seagreen], and patients with endoscopic Mayo score = 3 [$n = 41$] shown in darkblue] are shown. Additionally, the data point of each observation is represented in the plot; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by pairwise Wilcoxon test. The Spearman's rho and p -value are also shown. [C] Correlation between MS and gene expression of *HP*, *CD177*, *GPR84*, and *S100A12* [RT-PCR data]. The linear regression model and Spearman's rho and p -value are shown. [D] Bar plot representation [mean \pm MSE] of CRP, ESR, and platelet count by endoscopic Mayo score [same observations as panel B]; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by pairwise Wilcoxon test. The Spearman's rho and p -value are also shown. [E] Correlation between MS and CRP, ESR, and platelet count [same observations as panel C]. The linear regression model and Spearman's rho and p -value are shown. UC, ulcerative colitis; MSE, mean squared error; RT-PCR, real-time polymerase chain reaction; CRP, C-reactive protein; ESR, erythrocyte sedimentation rate.

test, $p < 0.05$; $\rho = 0.9$], but MS better reflected the accumulated inflammation along the colon [Figure 2A]. The higher the endoscopic Mayo score, the more flattened was the MS density function due to an increased range of disease extension. Examining the association of gene expression with the endoscopic disease activity, we identified 20 genes that significantly correlated with the endoscopic Mayo score and 18 genes that significantly correlated with MS [Spearman's rank correlation test, $p < 0.05$; $\rho > 0.2$] [Table 3]. A total of 16 genes were common, with *HP*, *CD177*, and *GPR84* being those with the strongest relationship in both cases [Figure 2B, C]. Also significant was the relationship with the inflammation-related molecule *S100A12*. Moreover, pairwise analysis of the interrogated genes revealed *HP*, *CD177*, and *GPR84* as the only ones significantly regulated in patients with an endoscopic Mayo score of 2 compared with 0 [Table 3 and Figure 2B]. None of the genes was able to detect changes between patients with an endoscopic Mayo score of 1 compared with 0.

Furthermore, the association between routinely used blood biomarkers [CRP, ESR, and platelet counts] and endoscopic disease activity was explored [Supplementary Table 3 and Figure 2D, E]. Although significant correlations of the biomarkers with disease severity were observed, pairwise analysis revealed significant changes when comparing mild, moderate, or severe activity with inactive UC only for CRP [elevated exclusively in severe disease]. Additionally, given the neutrophil-related signature we had identified, we explored the potential relationship between neutrophil counts and endoscopic disease activity and found no significant associations [Supplementary

Table 3 and Supplementary Figure 1, available as Supplementary data at ECCO-JCC online].

3.3. Haptoglobin [*HP*] is the best transcript for predicting mucosal lesions in UC patients

Within the subset of genes whose expression best correlates with endoscopic disease severity, we found *HP* as the best gene to predict the presence of active mucosal lesions in UC patients. The logistic regression model for endoscopic activity prediction [endoscopic Mayo score: 0 versus ≥ 1] was assessed. The fitted model demonstrated a significant effect of *HP* [$p < 0.001$], with an odds ratio [OR] of 1.9 [95% confidence interval [CI]: 1.35–2.78] and an AUC = 0.75 [95% CI: 0.64–0.85]. Defining a cut-off of -2.9 DCt, the sensitivity and specificity were 63.5% and 80.0%, respectively [Table 4 and Figure 3—red line]. To evaluate the reproducibility of the model, a 10-fold cross-validation was done, obtaining an AUC = 0.70 [95% CI: 0.59–0.82] [Figure 3—darkblue dashed line]. Given that no significant differences were found in the transcription of *HP* in blood between patients with an endoscopic Mayo score of 0 and 1, the power of *HP* to predict moderate to severe inflammation [endoscopic Mayo score of 2 or 3] compared with no or mild inflammation [endoscopic Mayo score of 0 or 1] was explored. The fitted model similarly revealed a significant effect of *HP* [$p < 0.001$], with an odds ratio [OR] of 1.8 [95% CI: 1.36–2.50] and an AUC = 0.73 [95% CI: 0.63–0.82]. Defining a cut-off of -2.5 DCt, the sensitivity and

Table 3. List of genes assessed by RT-PCR in UC patients [Table 1, Group 2]. For each target gene, comparisons between inactive [endoscopic Mayo score = 0; $n = 25$] and active [endoscopic Mayo score ≥ 1 ; $n = 86$] UC patients using the Wilcoxon test, the correlation of the transcriptional profile and the endoscopic activity [endoscopic Mayo score and MS] using the Spearman rank correlation coefficient, and the pairwise analysis of endoscopic Mayo score using an adjusted Wilcoxon test for multiple comparisons was carried out. The p -value or Benjamini-Hochberg adjusted p -value [FDR] and the mean fold-change [Fch] are shown for each comparison. The p -value and rho value are shown for the Spearman correlation.

Gene	Wilcoxon		Spearman correlation		Pairwise analysis					Spearman correlation		
	Active vs inactive		Endoscopic Mayo score		Score 1 vs 0	Score 2 vs 0	Score 3 vs 0	MS		p -Value	rho	
	p -Value	Fch	P -value	rho	FDR	Fch	FDR	Fch	FDR	Fch		
<i>HP</i>	0.000	2.656	0.000	0.471	0.105	1.633	0.026	1.894	0.000	4.246	0.000	0.465
<i>CD177</i>	0.001	5.825	0.000	0.370	0.120	3.000	0.043	4.091	0.001	10.294	0.001	0.338
<i>GPR84</i>	0.001	1.973	0.000	0.393	0.119	1.276	0.025	1.507	0.002	2.925	0.000	0.362
<i>CST7</i>	0.005	1.518	0.001	0.321	0.199	1.249	0.192	1.280	0.007	1.842	0.002	0.319
<i>S100A12</i>	0.017	1.877	0.001	0.309	0.423	1.250	0.101	1.724	0.026	2.493	0.022	0.243
<i>ARG1</i>	0.036	1.507	0.001	0.302	0.796	1.155	0.366	1.219	0.016	1.963	0.124	0.160
<i>ANXA3</i>	0.037	1.811	0.001	0.336	0.533	1.263	0.210	1.482	0.029	2.582	0.005	0.318
<i>ANKRD22</i>	0.048	1.637	0.005	0.280	0.980	1.032	0.108	1.526	0.088	2.108	0.041	0.221
<i>ZDHHC19</i>	0.050	1.879	0.002	0.293	0.627	1.183	0.520	1.305	0.035	2.918	0.019	0.244
<i>HK3</i>	0.054	1.289	0.001	0.313	0.929	1.042	0.537	1.125	0.017	1.564	0.016	0.247
<i>GALNT14</i>	0.057	1.589	0.000	0.360	0.939	1.063	0.630	1.214	0.006	2.278	0.009	0.276
<i>CARD16</i>	0.075	1.180	0.001	0.315	0.976	-1.033	0.581	1.087	0.017	1.383	0.005	0.285
<i>CASP5</i>	0.081	1.263	0.050	0.187	0.440	1.205	0.440	1.194	0.440	1.338	0.033	0.220
<i>AIM2</i>	0.105	1.274	0.002	0.318	0.948	-1.147	0.659	1.116	0.027	1.651	0.015	0.271
<i>TLR5</i>	0.144	1.314	0.007	0.255	0.806	-1.001	0.533	1.248	0.082	1.573	0.039	0.213
<i>MMP9</i>	0.147	1.448	0.008	0.252	0.759	1.053	0.421	1.182	0.116	1.927	0.042	0.209
<i>CA4</i>	0.161	1.261	0.028	0.209	0.874	1.113	0.874	1.054	0.224	1.487	0.322	0.103
<i>C1QB</i>	0.254	1.214	0.263	0.108	0.814	1.048	0.586	1.349	0.586	1.254	0.028	0.227
<i>CLEC4D</i>	0.364	1.224	0.001	0.299	0.126	-1.244	0.358	1.163	0.046	1.606	0.019	0.240
<i>FBXO6</i>	0.456	1.135	0.032	0.203	0.831	-1.022	0.831	-1.035	0.157	1.343	0.051	0.201
<i>SLC26A8</i>	0.465	1.168	0.011	0.241	0.327	-1.236	0.948	1.050	0.095	1.530	0.035	0.216
<i>TDRD9</i>	0.659	1.238	0.030	0.206	0.623	-1.064	0.329	-1.081	0.088	1.690	0.268	0.115
<i>CD274</i>	0.964	1.109	0.248	0.114	0.503	-1.236	0.919	1.086	0.594	1.318	0.147	0.154

UC, ulcerative colitis; RT-PCR, real-time polymerase chain reaction; MS, Modified Score.

specificity were 60.7% and 81.6%, respectively [Table 4 and Figure 3—green line]. The 10-fold cross-validation showed an AUC = 0.71 [95% CI: 0.61–0.80] [Figure 3—skyblue dashed line]. Both approximations gave similar results, showing *HP* to have fair discrimination ability in predicting mucosal lesions in UC patients.

Moreover, serological protein levels of *HP* were measured for the majority of patients [$n = 98$] from Group 2 [Table 1] and a

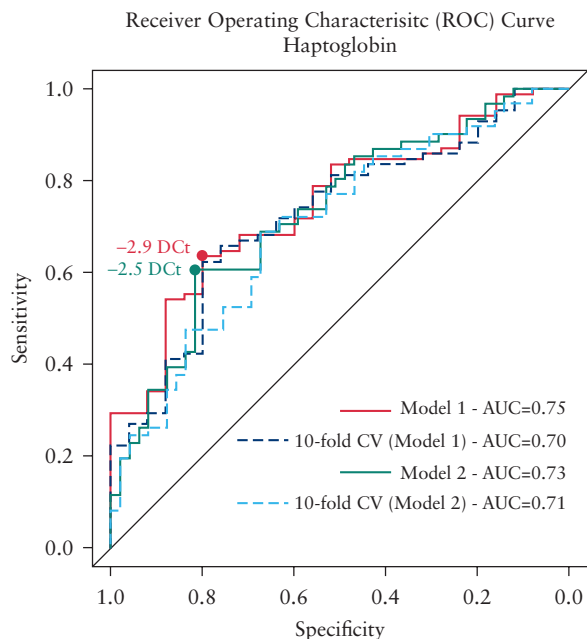


Figure 3. Predictive power of haptoglobin [*HP*] gene for disease activity in UC patients. The receiver operating characteristic curve [ROC] is shown for different models. Red line shows the ROC curve from Model 1, where the binary response is defined as inactive [endoscopic Mayo score 0] versus active [endoscopic Mayo score 1–3]. The darkblue dashed line shows the 10-fold cross-validation from Model 1. Green line shows the ROC curve from Model 2, where the binary response is defined as inactive [endoscopic Mayo score 0–1] versus active [endoscopic Mayo score 2–3]. The skyblue dashed line shows the 10-fold cross-validation from Model 2. The cut-off points associated with the best specificity and sensitivity are shown [dots] for each Model. The AUC of each ROC curve are shown. UC, ulcerative colitis; AUC, area under the curve.

Table 4. Diagnostic accuracy of haptoglobin gene expression and serological CRP, ESR, platelet counts, and *HP* protein for the detection of endoscopically active disease in ulcerative colitis. For each variable, the AUC is given and the sensitivity [Se], specificity [Sp], positive predictive value [PPV], negative predictive value [NPV], and accuracy were calculated and are shown as percentages based on the defined cut-off points. The CRP [normally < 1 mg/dL], ESR [normally < 20 mm/h], and platelet count [normally < 400 · 10⁹/L] cut-offs were defined according to the normal levels.

Biomarker	AUC	Cut-off	Se	Sp	PPV	NPV	Accuracy
<i>HP</i> transcript [DCt]	0.75	-2.9 DCt ^a	63.5	80.0	91.5	39.2	67.3
<i>HP</i> transcript [DCt]	0.73	-2.5 DCt ^b	60.7	81.6	80.4	62.5	70.0
CRP [mg/dL]	0.72	1 mg/dL	43.2	83.3	89.7	30.3	52.4
ESR [mm/h]	0.60	20 mm/h	34.5	86.7	90.9	25.5	45.2
Platelet count [10 ⁹ /L]	0.66	400 · 10 ⁹ /L	12.7	100	100	22.5	30.3
<i>HP</i> protein [g/L]	0.70	1.32 g/L ^a	48.7	90.9	94.9	33.9	58.2

CRP, C-reactive protein; ESR, erythrocyte sedimentation rate; AUC, area under the curve.

^aCut-off point resulted from the regression model with binary response defined as inactive [Endoscopic Mayo score 0] versus active [Endoscopic Mayo score 1–3].

^bCut-off point resulted from the regression model with binary response defined as inactive [Endoscopic Mayo score 0–1] versus active [Endoscopic Mayo score 2–3].

significant correlation with endoscopic disease activity and a fair predictive accuracy were observed [Table 4; Supplementary Figure 2, available as Supplementary data at ECCO-JCC online].

Although the diagnostic accuracy of *HP* is superior to that obtained from the widely used clinical biomarkers for IBD activity [CRP, ESR, and platelet count] and serological *HP*, no significant differences were found between ROC curves [DeLong's test p -value > 0.05] [Table 4].

3.4. Changes in blood transcriptional biomarkers correlate with response to anti-TNF α therapy

Finally, the ability of the identified transcriptional biomarkers [*HP*, *CD177*, *GPR84*, and *S100A12*] to evaluate changes in endoscopic activity in response to biological therapy was assessed. A cohort of UC patients with active disease starting anti-TNF α treatment [$n = 16$] were followed up over 14 weeks. Table 2 reports the clinical and endoscopic parameters at Weeks 0 and 14. Despite the fact that only four patients achieved an endoscopic Mayo score ≤ 1 at Week 14, a decrease in the global severity or extension of the endoscopic lesions was observed in the majority of cases. By reporting the MS, we identify a reduction of MS of at least 1 point in 10 cases, no changes in four, and worsening in two [Figure 4A]. In contrast, only five cases showed an endoscopic response based on the endoscopic Mayo score [reduction in endoscopic Mayo score of at least 1 point] and no changes were detected in the remaining cases. Furthermore, a better concordance is observed between the response based on the Global Mayo score and MS compared with the endoscopic Mayo score [Supplementary Figure 3, available as Supplementary data at ECCO-JCC online]. This highlights the importance of reporting both disease extension and activity to accurately reflect changes in disease activity over time.

Importantly, we found that a decrease in the expression of *HP*, *CD177*, *GPR84*, and *S100A12* was associated with a reduction in the MS. As shown in Figure 4B, the changes observed in the transcription of those genes permitted differentiation between those patients who, based on MS, endoscopically improved [blue dots] and those who worsened or did not change [red dots]. Interestingly, in two patients [black arrows], expression of the transcriptional biomarkers decreased at Week 14 despite no improvement in their MS. Although in both patients an improvement in the severity of the disease [a marked decrease in the number of ulcers] was reported, the ulcers persisted in all involved segments and therefore no change in the endoscopic score [endoscopic Mayo score of 3, or MS of 15 and 9] was noted. The behaviour of serological markers as well as

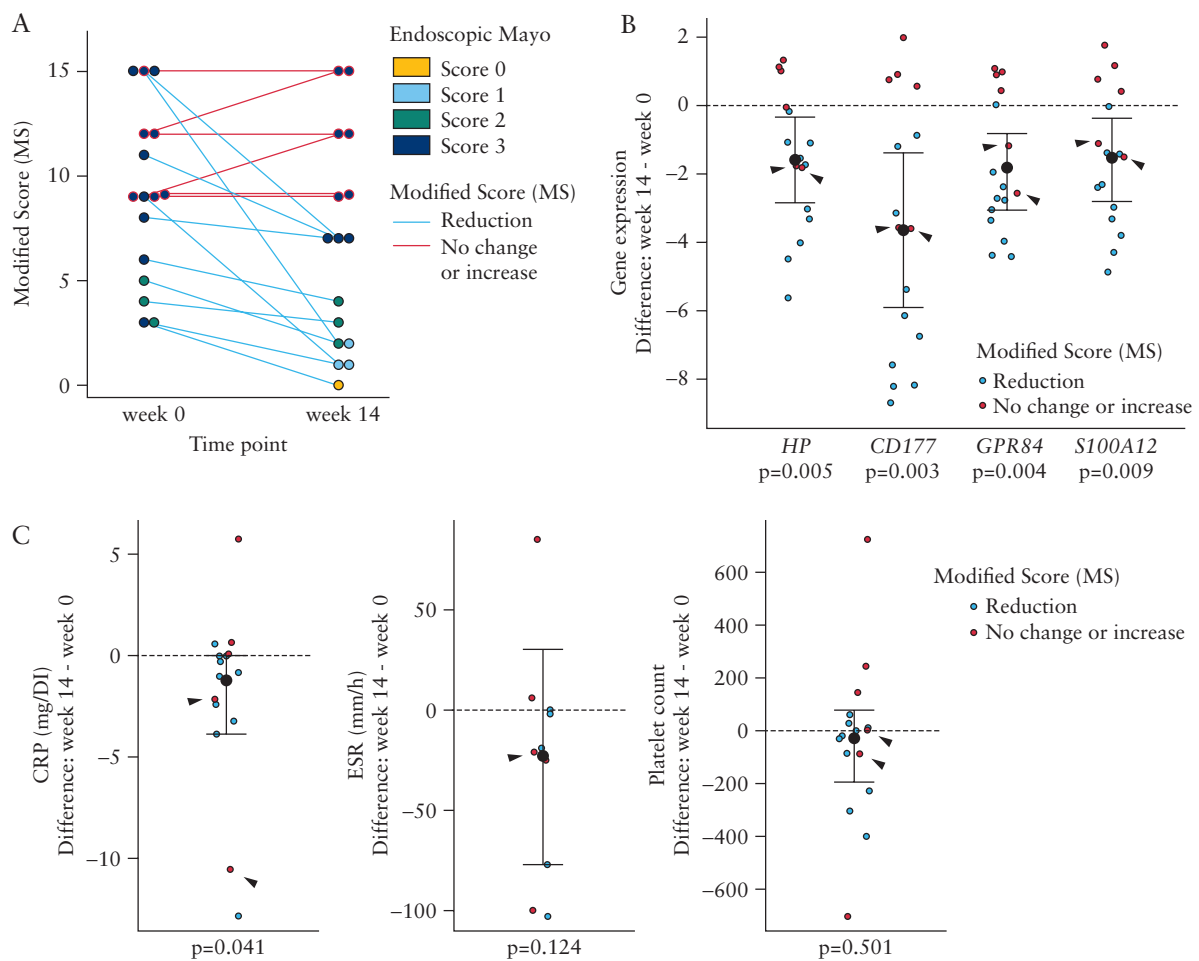


Figure 4. Changes in whole-blood transcriptional profiles are associated with endoscopic progression in UC patients after 14 weeks of anti-TNF α treatment. [A] Distribution of MS in patients with UC before and after anti-TNF α treatment [$n = 16$, Table 2]. Each dot represents an individual patient at Week 0 or 14. Dot colour corresponds to endoscopic Mayo score and the colour of the connecting line to the endoscopic progression [assessed by MS]. Blue connecting line corresponds to mucosal improvement [$n = 10$] and red connecting line to no improvement or worsening [$n = 6$]. [B] Dot plot representation of *HP*, *CD177*, *GPR84*, and *S100A12* gene expression changes after 14 weeks of anti-TNF α treatment. Y-axis shows the difference between gene expression at Weeks 14 and 0. [C] Dot plot representation of CRP, ESR, platelet count, and serological *HP* changes after 14 weeks of anti-TNF α treatment. Y-axis shows the difference between biomarker levels at Weeks 14 and 0. Black dashed line at point 0 denotes no changes in gene expression. Based on MS, individuals with mucosal improvement [shown in blue, $n = 10$] and those without improvement or worsening [shown in red, $n = 6$] are shown. Black arrows show two samples without mucosal improvement [based on MS], but decreased gene expression after treatment. Median \pm IQR are represented. UC, ulcerative colitis; MS, Modified Score; CRP, C-reactive protein; ESR, erythrocyte sedimentation rate; TNF, tumour necrosis factor; IQR, interquartile range.

serum *HP* protein before and after treatment was also evaluated and showed no significant association with the mucosal changes with the exception of CRP [Table 2 and Figure 4C].

4. Discussion

The importance of monitoring local inflammatory activity in IBD is becoming increasingly clear. There can, however, be discrepancies between clinical symptoms and the severity of mucosal lesions. In this context, clinical trials relying on clinical scores to assess activity at inclusion or efficacy as an endpoint, may result in high placebo response rates, as well as unreliable un-reproducible results.

Blood transcriptional signatures have been explored in infectious and autoimmune systemic diseases and cancer.^{36–39} The use of whole-blood transcriptional analysis to detect disease activity nonetheless remains a largely unexplored tool in IBD. Compared with the dramatic transcriptional changes observed in the intestinal mucosa

of patients with active inflammation, the degree of transcriptional regulation in blood, even in patients with severe disease, is remarkably low. This is not entirely unexpected, given that circulating cells may only partially reflect changes in the mucosa of UC patients. Nonetheless, using sensitive RT-PCR analysis, we can predict endoscopic mucosal lesions in patients with UC.

Our data reveal the important contribution of neutrophils to the systemic inflammatory response in UC patients. We show that expressions of neutrophil-related genes [including *CD177*, *HP*, *S100A12*, *ARG1*, and *ANXA3*], rather than total neutrophil numbers, are surrogate markers of endoscopic activity. Remarkably, an increase in serum and faecal concentrations of *S100A12* protein had been previously shown to correlate with disease activity in IBD patients.^{35,40} In contrast, the increased levels of serum calprotectin [*S100A8/A9*], described as a new diagnostic and prognostic marker in IBD,⁴¹ were not observed here at a transcriptional level. Similarly, the neutrophil gelatinase B-associated lipocalin [*LCN2*] and the matrix metalloproteinase-9

[MMP9] complex have been proposed as surrogate serum markers for assessing mucosal healing in UC,⁴² but were not transcriptionally regulated in blood from our patient cohort. Along the same lines, whereas we identified *HP* transcript as a sensitive predictor of mucosal lesions and therapy response, changes in serum *HP* are not sensitive to such alterations. *HP* protein is primarily synthesised by hepatocytes⁴³ but it has also been described as a specific granule protein of neutrophils,²⁸ which could explain the transcript detection at the blood level and the moderate correlation between transcript and protein measurements [$r = 0.40$]. Altogether, this suggests that although changes in serum proteins due to disease activity can originate in other tissues [eg liver, intestine], transcription consistently reflects changes in the activation and abundance of cells present in the peripheral compartment. Therefore, blood transcription and serum protein concentrations may not necessarily reflect the same biological processes.

Besides secreted or granule-associated proteins, we also identified the cell membrane proteins *CD177* and *GPR84* as predictors of endoscopic lesions. *CD177* is a neutrophil-specific GPI-anchored glycoprotein normally expressed on a subpopulation of neutrophils.⁴⁴ Although there are controversial results, the preferential recruitment of *CD177*⁺ neutrophils towards inflamed tissues has been suggested,⁴⁵ and the increased protein and transcripts for *CD177* have been described in bacterial infections, polycythaemia vera, and ANCA-associated vasculitis as well as in response to G-CSF stimulation.^{27,46} Interestingly, elevated expression of both *CD177* and *HP* genes in whole blood has been closely associated with ipilimumab-induced colitis in advanced melanoma patients, also suggesting that neutrophils potentially play a broader role in immune-related colonic disorders.⁴⁷

GPR84, mainly expressed by leukocytes, is a G protein-coupled receptor that has been described as a putative receptor for medium-chain fatty acids [MCFAs] which elicits neutrophil and macrophage chemotaxis.²⁹ The efficacy of inhibiting *GPR84* has been studied in a mouse chronic colitis model and in human UC patients [clinical trial: NCT02337608]. Although a diminution of colonic lesions and a reduction in neutrophil infiltrate was observed in mouse,⁴⁸ results in human showed safety and tolerance but the study did not meet the efficacy endpoints.⁴⁹ Nevertheless, our data points to the potential use of this gene as a biomarker of disease activity.

Taken together, we provide insights on new and promising minimally invasive biomarkers capable of predicting endoscopic mucosal lesions in patients with UC. We realise that the lack of faecal calprotectin [FC] represents the major drawback of our study, as FC has demonstrated to be the best biomarker of endoscopic activity.¹⁵ Despite considerable efforts to collect this biomarker in our study cohorts, there remained a large number of missing values, rendering it impossible to include this datum in the analysis and restricting our study to the use of other available biomarkers with poor correlation with endoscopic activity, like CRP, ESR, and platelet counts. The difficulties in FC sampling were also pointed out in the first clinical study that used FC as a primary endpoint.⁵⁰ Nonetheless, the results obtained by Sandborn *et al.*⁵¹ regarding the ability of FC to predict endoscopic remission are remarkably similar to the prediction power of *HP* in our study [Supplementary File 1, available as Supplementary data at *ECCO-JCC* online]. Whereas additional studies should be done, as the total number of patients with endoscopically inactive disease in our cohort is limited, we would like to stress that with potentially comparable predictive values, whole-blood biomarkers can offer practical advantages in clinical practice compared with faecal biomarkers.

Another limitation, as distinct inflammatory mechanisms have been suggested between early and late inflammatory bowel diseases,^{52–54} could be the difference in disease duration between our active and inactive patients. However, no significant correlation between disease duration and expression of the selected transcriptional biomarkers was found.

Importantly, our data reveal the sensitivity of the identified blood biomarkers to mirror changes in local inflammatory activity in UC patients following induction therapy. Although our results are promising, they are derived from a relatively small number of patients and restricted to anti-TNF α therapy. It will be necessary to validate the usefulness of the identified biomarkers in predicting response to drugs with mechanisms of action that differ from those of TNF α blockade. Interestingly, whole-blood *CD177*, *HP*, and *GPR84* transcripts were found at higher levels in corticosteroid-resistant children with severe UC compared with corticosteroid-responsive children,¹⁴ suggesting these are also sensitive to the effect of corticosteroids.

In summary, our study has the merit of assessing in a multicentric cohort the usefulness of transcriptional blood analysis to predict endoscopic disease activity. By starting with a whole-genome approach, we were able to identify transcripts with the potential to change based on the presence of endoscopic lesions. Importantly, we validated a subset of genes in a large group of patients with a wide range of endoscopic activity and disease extent. More importantly, the transcriptional blood biomarkers were tested for responsiveness in a prospective cohort and proved to be sensitive to changes in endoscopic disease activity.

Funding

This work was supported by Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals and the Leona and Harry Helmsley Trust.

Conflict of Interest

SV is an employee of Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals. The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge all patients for their selfless participation. We also thank Joe Moore for editorial assistance.

Author Contributions

AS and JP designed the study; MCM, IO, IJA, ER, AR, RFL, MLSA, LR, and JG recruited patients; LR, IO, IJA, ER, AR, RFL, MLSA, and CSRC assessed clinical disease activity; RFL, NP, MCM, and ME performed the experiments; NP and JJJ carried out bioinformatic and biostatistic analysis; SV participated in the discussion; and AS, NP, and JP wrote the manuscript.

Supplementary Data

Supplementary data are available at *ECCO-JCC* online.

References

- Ordás I, Eckmann L, Talamini M, Baumgart DC, Sandborn WJ. Ulcerative colitis. *Lancet* 2012;380:1606–19.
- Solberg IC, Lygren I, Jahnsen J, *et al.*; IBSEN Study Group. Clinical course during the first 10 years of ulcerative colitis: results from a population-based inception cohort [IBSEN Study]. *Scand J Gastroenterol* 2009;44:431–40.

3. Schroeder KW, Tremaine WJ, Ilstrup DM. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study. *N Engl J Med* 1987;317:1625–9.
4. Rosenberg L, Lawlor GO, Zenlea T, et al. Predictors of endoscopic inflammation in patients with ulcerative colitis in clinical remission. *Inflamm Bowel Dis* 2013;19:779–84.
5. Colombel JF, Rutgeerts P, Reinisch W, et al. Early mucosal healing with infliximab is associated with improved long-term clinical outcomes in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2011;141:1194–201.
6. Stidham RW, Higgins PD. Value of mucosal assessment and biomarkers in inflammatory bowel disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;4:285–91.
7. D'Haens G, Ferrante M, Vermeire S, et al. Fecal calprotectin is a surrogate marker for endoscopic lesions in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2012;18:2218–24.
8. Lemmens B, Arijis I, Van Assche G, et al. Correlation between the endoscopic and histologic score in assessing the activity of ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2013;19:1194–201.
9. Boland BS, Boyle DL, Sandborn WJ, et al. Validation of gene expression biomarker analysis for biopsy-based clinical trials in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2015;21:323–30.
10. Leal RF, Planell N, Kajekar R, et al. Identification of inflammatory mediators in patients with Crohn's disease unresponsive to anti-TNF α therapy. *Gut* 2015;64:233–42.
11. Planell N, Lozano JJ, Mora-Buch R, et al. Transcriptional analysis of the intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis in remission reveals lasting epithelial cell alterations. *Gut* 2013;62:967–76.
12. Román J, Planell N, Lozano JJ, et al. Evaluation of responsive gene expression as a sensitive and specific biomarker in patients with ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2013;19:221–9.
13. Wu F, Dassopoulos T, Cope L, 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.
14. Kabakchiev B, Turner D, Hyams J, et al. Gene expression changes associated with resistance to intravenous corticosteroid therapy in children with severe ulcerative colitis. *PLoS One* 2010;5:e13085.
15. Peyrin-Biroulet L, Panes J, Sandborn WJ, et al. Defining disease severity in inflammatory bowel diseases: Current and future directions. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2016;14:348–54.e17.
16. Lobatón T, Bessisow T, De Hertogh G, et al. The Modified Mayo Endoscopic Score [MMES]: a new index for the assessment of extension and severity of endoscopic activity in ulcerative colitis patients. *J Crohns Colitis* 2015;9:846–52.
17. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 2004;5:R80.
18. R Development Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2014.
19. Gautier L, Cope L, Bolstad BM, Irizarry RA. affy-analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics* 2004;20:307–15.
20. Dai M, Wang P, Boyd AD, et al. Evolving gene/transcript definitions significantly alter the interpretation of GeneChip data. *Nucleic Acids Res* 2005;33:e175.
21. Johnson WE, Li C, Rabinovic A. Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. *Biostatistics* 2007;8:118–27.
22. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 2015;43:e47.
23. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc B* 1995;57:289–300.
24. Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene expression omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* 2002;30:207–10.
25. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;3:RESEARCH0034.
26. Efron B, Hastie T, Johnstone I, Tibshirani R. Least angle regression. *Ann Stat* 2004;32:407–99.
27. Hu N, Mora-Jensen H, Theilgaard-Mönch K, et al. Differential expression of granulopoiesis related genes in neutrophil subsets distinguished by membrane expression of CD177. *PLoS One* 2014;9:e99671.
28. Theilgaard-Mönch K, Jacobsen LC, Nielsen MJ, et al. Haptoglobin is synthesized during granulocyte differentiation, stored in specific granules, and released by neutrophils in response to activation. *Blood* 2006;108:353–61.
29. Suzuki M, Takaishi S, Nagasaki M, et al. Medium-chain fatty acid-sensing receptor, GPR84, is a proinflammatory receptor. *J Biol Chem* 2013;288:10684–91.
30. Rijksen G, Staal GE, Beks PJ, Streefkerk M, Akkerman JW. Compartmentation of hexokinase in human blood cells. Characterization of soluble and particulate enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1982;719:431–7.
31. Federzoni EA, Valk PJ, Torbett BE, et al. PU.1 is linking the glycolytic enzyme HK3 in neutrophil differentiation and survival of APL cells. *Blood* 2012;119:4963–70.
32. Munder M, Mollinedo F, Calafat J, et al. Arginase 1 is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity. *Blood* 2005;105:2549–56.
33. Le Cabec V, Maridonneau-Parini I. Annexin 3 is associated with cytoplasmic granules in neutrophils and monocytes and translocates to the plasma membrane in activated cells. *Biochem J* 1994;303[Pt 2]:481–7.
34. Mirsaeidi M, Gidfar S, Vu A, Schraufnagel D. Annexins family: insights into their functions and potential role in pathogenesis of sarcoidosis. *J Transl Med* 2016;14:89.
35. Foell D, Kucharzik T, Kraft M, et al. Neutrophil derived human S100A12 [EN-RAGE] is strongly expressed during chronic active inflammatory bowel disease. *Gut* 2003;52:847–53.
36. Lill M, Köks S, Soomets U, et al. Peripheral blood RNA gene expression profiling in patients with bacterial meningitis. *Front Neurosci* 2013;7:33.
37. Hu X, Yu J, Crosby SD, Storch GA. Gene expression profiles in febrile children with defined viral and bacterial infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:12792–7.
38. Kam SH, Singh A, He JQ, et al. Peripheral blood gene expression changes during allergen inhalation challenge in atopic asthmatic individuals. *J Asthma* 2012;49:219–26.
39. Galamb O, Sipos F, Solymosi N, et al. Diagnostic mRNA expression patterns of inflamed, benign, and malignant colorectal biopsy specimen and their correlation with peripheral blood results. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17:2835–45.
40. Kaiser T, Langhorst J, Wittkowski H, et al. Faecal S100A12 as a non-invasive marker distinguishing inflammatory bowel disease from irritable bowel syndrome. *Gut* 2007;56:1706–13.
41. Kalla R, Kennedy NA, Ventham NT, et al. Serum calprotectin: a novel diagnostic and prognostic marker in inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 2016;111:1796–805.
42. de Bruyn M, Arijis I, Wollants WJ, et al. Neutrophil gelatinase B-associated lipocalin and matrix metalloproteinase-9 complex as a surrogate serum marker of mucosal healing in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2014;20:1198–207.
43. Quaye IK. Haptoglobin, inflammation and disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008;102:735–42.
44. Stroncek D. Neutrophil-specific antigen HNA-2a [NB1, CD177]: serology, biochemistry, and molecular biology. *Vox Sang* 2002;83[Suppl 1]:359–61.
45. Wang L, Ge S, Agustian A, Hiss M, Haller H, von Vietinghoff S. Surface receptor CD177/NB1 does not confer a recruitment advantage to neutrophilic granulocytes during human peritonitis. *Eur J Haematol* 2013;90:436–7.
46. Göhring K, Wolff J, Doppl W, et al. Neutrophil CD177 [NB1 gp, HNA-2a] expression is increased in severe bacterial infections and polycythaemia vera. *Br J Haematol* 2004;126:252–4.
47. Shahabi V, Berman D, Chasalow SD, et al. Gene expression profiling of whole blood in ipilimumab-treated patients for identification of potential

- biomarkers of immune-related gastrointestinal adverse events. *J Transl Med* 2013;11:75.
48. Dupont S, Arijis I, Blanque R, et al. Gpr84 inhibition as a novel therapeutic approach in IBD: Mechanistic and translational studies. In: 10th Congress of the European Crohn's and Colitis Organisation [ECCO]; February 18-21, 2015, Barcelona, Spain.
 49. Vanhoutte F, Dupont S, Van Kaem T, et al. Human safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of the gpr84 antagonist glpg1205, a potential new approach to treat IBD. *J Crohns Colitis* 2015;9[Suppl 1]:S387.
 50. Reinisch W, Panés J, Khurana S, et al. Anrukizumab, an anti-interleukin 13 monoclonal antibody, in active UC: efficacy and safety from a phase IIa randomised multicentre study. *Gut* 2015;64:894-900.
 51. Sandborn WJ, Panés J, Zhang H, Yu D, Niezychowski W, Su C. Correlation between concentrations of fecal calprotectin and outcomes of patients with ulcerative colitis in a phase 2 trial. *Gastroenterology* 2016;150:96-102.
 52. Kugathasan S, Saubermann LJ, Smith L, et al. Mucosal T-cell immunoregulation varies in early and late inflammatory bowel disease. *Gut* 2007;56:1696-705.
 53. Desreumaux P, Brandt E, Gambiez L, et al. Distinct cytokine patterns in early and chronic ileal lesions of Crohn's disease. *Gastroenterology* 1997;113:118-26.
 54. Veny M, Esteller M, Ricart E, Piqué JM, Panés J, Salas A. Late Crohn's disease patients present an increase in peripheral Th17 cells and cytokine production compared with early patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2010;31:561-72.

Discussió

Durant un procés inflamatori s'activen un conjunt de mecanismes encarregats de retornar l'organisme a la normalitat. En el cas de la CU s'han descrit un gran nombre de gens significativament regulats en la fase activa de la malaltia [223, 246–249, 294]. Entre aquests trobem gens típicament pro-inflamatoris i d'altres relacionats amb mecanismes de protecció i regeneració, característics de la resposta inflamatòria de qualsevol teixit davant d'una situació d'estrès.

Alteracions en els mecanismes responsable de retornar l'organisme a un estat homeostàtic podria conduir en un dany exacerbat del teixit en qüestió o derivar en inflamació crònica, el que podria contribuir a una proliferació cel·lular descontrolada donant lloc a la formació de fibrosis o displàsia.

Davant d'una patologia crònica, com és el cas de la CU, es desconeix si els processos involucrats en la resposta inflamatòria, tan els pro-inflamatoris com els protectors, retornen a nivells homeostàtics quan la inflamació està sota control.

L'estudi transcripcional de la mucosa intestinal en remissió de pacients amb CU ens ha permès corroborar, d'acord amb resultats d'estudis anteriors [223, 226, 250, 294, 295], que la supressió de la inflamació o remissió endoscòpica va acompanyada de la modulació d'un gran nombre de gens capaços de retornar a nivells d'expressió equivalents als de la mucosa intestinal d'un individu sa. Entre aquests gens s'engloben gens que codifiquen citocines, molècules d'adhesió, immunoglobulines, pèptids antimicrobians i enzims remodeladors de teixit, entre altres.

Així, l'expressió de gens com *IL8*, *REG1A* i *CXCL1*, podrien considerar-se bons biomarcadors d'activitat clínica, endoscòpica i histològica de la CU [250].

Per altra banda, hem pogut identificar un subconjunt de gens que romanen alterats en la mucosa en remissió. Dins d'aquest conjunt de gens observem dos perfils d'expressió diferents, gens que quan la mucosa està en remissió mostren una modulació parcial, presentant uns nivells d'expressió intermedis entre la mucosa sana i la mucosa inflamada, i gens que presenten nivells d'expressió similars als de la mucosa inflamada. Suggestint-nos que la modulació d'aquests gens no serà clau per la resolució de la inflamació, i que no podran considerar-se biomarcadors d'activitat de la malaltia.

Tanmateix, la identificació d'aquesta signatura transcripcional característica de la mucosa intestinal en remissió, i la validació tan a nivell transcripcional com proteic d'alguns dels gens identificats, ens senyala que existeixen mecanismes en la mucosa intestinal dels pacients amb CU que no retornen a la normalitat després d'un procés inflamatori. Aquest fet recalca la rellevància de l'epiteli en la patogènesis de la CU, podent amagar mecanismes responsables de la cronicitat de la malaltia. Cal destacar que part dels gens identificats s'han associat amb el desenvolupament de càncer gastrointestinal [296–301]. En concret, *REG4*, *S100P* i *SERPINB5*, augmentats en la mucosa inflamada i en remissió de pacients amb CU, es relacionen amb el creixement cel·lular i la resistència a l'apoptosi, podent establir un vincle entre la CU i l'increment del risc de desenvolupar CCR [289, 290].

La importància d'assolir remissió endoscòpica o curació mucosa en el tractament de la CU és cada cop més evident, tan en la pràctica clínica com en els estudis clínics [302]. La remissió endoscòpica es relaciona amb una millor evolució de la malaltia i la disminució de la probabilitat de sotmetre's a una cirurgia [17, 286]. A més, l'efecte placebo es veu clarament reduït quan la remissió endoscòpica o curació mucosa s'inclou com a objectiu en els estudis clínics [303].

El principal inconvenient en la definició de la remissió mucosa com a fita en el tractament de pacients amb CU és la necessitat de sotmetre els pacients a una colonoscòpia; una prova invasiva, que comporta elevats costos econòmics, la disconformitat dels pacients i, en els casos més greus, el risc de complicacions durant el procediment. A més, també pot influenciar negativament en el reclutament de pacients per als estudis clínics. Alternatives a la colonoscòpia, com

l'avaluació de la simptomatologia clínica i altres biomarcadors d'activitat presenten discrepàncies amb les lesions endoscòpiques [190, 291–293].

Així, la identificació d'un biomarcador no invasiu per a determinar la presència de lesions endoscòpiques pot ser clau en el monitoratge de la CU. L'anàlisi transcripcional de sang perifèrica de pacients amb MII no ha estat massa explorat, podent ser una bona opció per la cerca de biomarcadors.

En comparació amb les diferències que identifiquem a nivell de teixit entre la mucosa inflamada i la mucosa sana o en remissió, en l'estudi transcripcional de sang perifèrica aquestes diferències són molt subtils. Tot i així, hem identificat i validat un subgrup de transcripts relacionats amb l'activitat endoscòpica. Molts d'aquests transcripts es relacionen amb neutròfils, posant de manifest la importància d'aquesta població tot i l'absència de diferències a nivell de recompte de cèl·lules. Entre aquests gens trobem *S100A12*, anteriorment descrit com a biomarcador d'activitat en sèrum i femta [304, 305].

L'elevada correlació entre els transcripts identificats fa que la predicció de l'activitat de la malaltia no millori utilitzant un model multivariant. Així, el marcador amb major poder predictiu que identifiquem és el gen que codifica per l'haptoglobina (HP). Els nivells de proteïna en sèrum s'han mesurat sense detectar una relació significativa amb les lesions endoscòpiques. L'haptoglobina és una proteïna principalment secretada per hepatòcits davant d'una reacció inflamatòria [306], no obstant, també s'ha descrit com un proteïna específica dels grànuls dels neutròfils [307], essent possiblement l'origen dels nivells de transcrit detectats.

En conjunt, el llistat de gens identificats són possibles biomarcadors de l'activitat de la CU. L'estudi ha seguit un anàlisi exploratori i de descobriment amb la posterior validació dels resultats més rellevants. La validació dels resultats s'ha realitzat amb èxit i en una cohort multicèntrica que inclou pacients amb diferents graus d'activitat endoscòpica. Un dels punts fonamentals de l'estudi ha sigut la definició de l'índex endoscòpic a utilitzar. La majoria dels índex endoscòpics puntuen d'acord amb l'àrea intestinal més inflamada, no obstant, l'extensió de l'àrea inflamada podria influenciar en els canvis observats a nivell sistèmic. En conseqüència, s'han recollit dos índex endoscòpics, l'índex de Mayo i l'índex mo-

dificat (MS), el primer avalua l'àrea més afectada i el segon inclou la valoració de cada un dels segments del còlon explorats [9, 180]. Tot i que la correlació entre els transcripts identificats i ambdós índex és significativa, l'índex modificat reflexa millor els canvis endoscòpics al llarg del temps.

Així, en base a resposta endoscòpica a anti-TNF- α definida per l'índex modificat, hem pogut avaluar la utilitat d'aquests biomarcadors per determinar la resposta al tractament. Hem observat com els canvis transcripcionals de *CD177*, *HP*, *GPR84* i *S100A12* abans i després del tractament es relacionen amb la resposta al fàrmac, és a dir, amb la resposta endoscòpica de la malaltia definida per l'índex modificat. L'expressió d'aquests transcripts també s'ha descrit significativament reduïda en infants responedors a corticosteroides respecte els no responedors [222], suggerint que aquests també podrien ser bons marcadors de la resposta a corticosteroides. No obstant, estudis en cohorts més àmplies i sota l'efecte de diferents fàrmacs són necessàries per verificar el potencial real d'aquests.

El punt més crític de l'estudi ha sigut la recollida de la calprotectina, un dels biomarcadors que està donant millors resultats actualment en la determinació de l'activitat endoscòpica [308]. Tot i els esforços realitzats per aconseguir els nivells de calprotectina en femta, l'elevat nombre de casos en els que no va poder ser recollida ens ha obligat a eliminar aquesta variable de l'estudi. Per contra, hem utilitzat altres biomarcadors recollits en la pràctica clínica habitual: PCR, VSG i recompte de plaquetes.

Les dificultats en la recollida de caplprotectina fecal ja s'havien posat de manifest en estudis anteriors [97], donant suport a la necessitat d'altres biomarcadors de més fàcil accés i manipulació.

Finalment, cal tenir present que, tot i estudiar una cohort de pacients representativa dels diferents graus d'activitat endoscòpica, el nombre final d'individus amb lesions endoscòpiques en remissió inclosos en el nostre estudi és baix. En conseqüència, estudis en cohorts més grans i amb un major nombre de casos en remissió endoscòpica són necessaris per validar l'ús de l'*HP* com a predictor de l'activitat endoscòpica de la CU.

Conclusions

La tesi doctoral que s'ha realitzat, on es caracteritza a nivell transcripcional la mucosa intestinal en remissió de pacients amb CU i es determinen biomarcadors de l'activitat endoscòpica a partir de l'estudi transcripcional de sang perifèrica, ens permet concloure que:

- La mucosa intestinal en remissió d'individus amb CU presenta una signatura transcripcional única en comparació amb la mucosa intestinal de pacients amb CU activa i d'individus sans.
- La signatura transcripcional associada a la remissió conté majoritàriament gens expressats per la barrera epitelial, suggerint que aquestes cèl·lules romanen alterades tot i la curació mucosa.
- Entre els gens que es regulen a la mucosa intestinal durant l'activitat de la malaltia i que retornen a nivells control un cop assolida la curació mucosa trobem *REG1A*. Aquest és un bon biomarcador d'activitat inflamatòria en la mucosa intestinal, tan a nivell transcripcional com proteic.
- *REG4*, *S100P* i *SERPINB5* romanen alterats en la mucosa inflamada i en remissió dels pacients amb CU, tan a nivell transcripcional com proteic.
- El perfil transcripcional de sang perifèrica de pacients amb CU endoscòpicament activa és significativament diferent de controls sans i de pacients amb CU endoscòpicament inactiva.
- L'expressió d'*HP*, *CD177* i *GPR84* en sang perifèrica es correlaciona amb el grau d'activitat endoscòpica de la CU.
- L'expressió d'*HP* en sang perifèrica és millor biomarcador que la PCR, VSG i el recompte de plaquetes, per a la detecció de lesions intestinals en la cohort estudiada.

- Els canvis en l'expressió d'*HP*, *CD177* i *GPR84* en sang perifèrica de pacients amb CU es correlacionen amb la resposta endoscòpica al tractament amb anti-TNF- α .

En general, podem concloure que l'estudi transcripcional tan de teixit com de sang perifèrica són eines valuoses per a la descripció de mecanismes alterats en la CU i la cerca de biomarcadors.

Bibliografia

- [1] R. Caprilli, V. Clemente, and G. Frieri, “Historical evolution of the management of severe ulcerative colitis,” *Journal of Crohn’s and Colitis*, vol. 2, no. 3, pp. 263–268, 2008.
- [2] J. L. Gamble, *Chemical anatomy, physiology and pathology of extracellular fluid: a lecture syllabus*. Harvard University Press, 1954.
- [3] A. N. Ananthakrishnan, “Epidemiology and risk factors for ibd,” *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, vol. 12, no. 4, pp. 205–217, 2015.
- [4] G. G. Kaplan and S. C. Ng, “Understanding and preventing the global increase of inflammatory bowel disease,” *Gastroenterology*, vol. 152, no. 2, pp. 313–321, 2017.
- [5] S. C. Ng, H. Y. Shi, N. Hamidi, F. E. Underwood, W. Tang, E. I. Benchimol, R. Panaccione, S. Ghosh, J. C. Wu, F. K. Chan, *et al.*, “Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies,” *The Lancet*, 2017.
- [6] N. A. Molodecky, S. Soon, D. M. Rabi, W. A. Ghali, M. Ferris, G. Chernoff, E. I. Benchimol, R. Panaccione, S. Ghosh, H. W. Barkema, *et al.*, “Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review,” *Gastroenterology*, vol. 142, no. 1, pp. 46–54, 2012.
- [7] G. G. Kaplan, “The global burden of ibd: from 2015 to 2025,” *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, vol. 12, no. 12, pp. 720–727, 2015.
- [8] E. Loftus, M. Silverstein, W. Sandborn, W. Tremaine, W. Harmsen, and A. R. Zinsmeister, “Ulcerative colitis in olmsted county, minnesota, 1940–

- 1993: incidence, prevalence, and survival,” *Gut*, vol. 46, no. 3, pp. 336–343, 2000.
- [9] K. W. Schroeder, W. J. Tremaine, and D. M. Ilstrup, “Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis,” *New England Journal of Medicine*, vol. 317, no. 26, pp. 1625–1629, 1987.
- [10] M. S. Silverberg, J. Satsangi, T. Ahmad, I. D. Arnott, C. N. Bernstein, S. R. Brant, R. Caprilli, J.-F. Colombel, C. Gasche, K. Geboes, *et al.*, “Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a working party of the 2005 montreal world congress of gastroenterology,” *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, vol. 19, no. Suppl A, pp. 5A–36A, 2005.
- [11] G. P. De Chambrun, L. Peyrin-Biroulet, M. Lémann, and J.-F. Colombel, “Clinical implications of mucosal healing for the management of ibd,” *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, vol. 7, no. 1, pp. 15–29, 2010.
- [12] M. H. Mosli, C. E. Parker, S. A. Nelson, K. A. Baker, J. K. MacDonald, G. Zou, B. G. Feagan, R. Khanna, B. G. Levesque, and V. Jairath, “Histologic scoring indices for evaluation of disease activity in ulcerative colitis,” *The Cochrane Library*, 2017.
- [13] S. Danese and C. Fiocchi, “Ulcerative colitis,” *New England Journal of Medicine*, vol. 365, no. 18, pp. 1713–1725, 2011.
- [14] E. Langholz, P. Munkholm, O. H. Nielsen, S. Kreiner, and V. Binder, “Incidence and prevalence of ulcerative colitis in copenhagen county from 1962 to 1987,” *Scandinavian journal of gastroenterology*, vol. 26, no. 12, pp. 1247–1256, 1991.
- [15] V. Bergeron, A. Vienne, H. Sokol, P. Seksik, I. Nion-Larmurier, A. Ruskone-Fourmestreaux, M. Svrcek, L. Beaugerie, and J. Cosnes, “Risk factors for neoplasia in inflammatory bowel disease patients with pancolitis,” *The American journal of gastroenterology*, vol. 105, no. 11, pp. 2405–2411, 2010.

- [16] M. J. Etchevers, M. Aceituno, O. García-Bosch, I. Ordás, M. Sans, E. Ricart, and J. Panés, “Risk factors and characteristics of extent progression in ulcerative colitis,” *Inflammatory bowel diseases*, vol. 15, no. 9, pp. 1320–1325, 2009.
- [17] I. C. Solberg, I. Lygren, J. Jahnsen, E. Aadland, O. Høie, M. Cvancarova, T. Bernklev, M. Henriksen, J. Sauar, M. H. Vatn, *et al.*, “Clinical course during the first 10 years of ulcerative colitis: results from a population-based inception cohort (ibsen study),” *Scandinavian journal of gastroenterology*, vol. 44, no. 4, pp. 431–440, 2009.
- [18] R. G. Farmer, K. A. Easley, and G. B. Rankin, “Clinical patterns, natural history, and progression of ulcerative colitis,” *Digestive diseases and sciences*, vol. 38, no. 6, pp. 1137–1146, 1993.
- [19] A. B. Stittrich, J. Ashworth, M. Shi, M. Robinson, D. Mauldin, M. E. Brunkow, S. Biswas, J.-M. Kim, K.-S. Kwon, J. U. Jung, *et al.*, “Genomic architecture of inflammatory bowel disease in five families with multiple affected individuals,” *Human genome variation*, vol. 3, 2016.
- [20] L. Halme, P. Paavola-Sakki, U. Turunen, M. Lappalainen, M. Färkkilä, and K. Kontula, “Family and twin studies in inflammatory bowel disease,” *World journal of gastroenterology: WJG*, vol. 12, no. 23, p. 3668, 2006.
- [21] H. S. De Souza and C. Fiocchi, “Immunopathogenesis of ibd: current state of the art,” *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, vol. 13, no. 1, pp. 13–27, 2016.
- [22] C. Lees, J. Barrett, M. Parkes, and J. Satsangi, “New ibd genetics: common pathways with other diseases,” *Gut*, vol. 60, no. 12, pp. 1739–1753, 2011.
- [23] A. I. Thompson and C. W. Lees, “Genetics of ulcerative colitis,” *Inflammatory bowel diseases*, vol. 17, no. 3, pp. 831–848, 2011.
- [24] C. N. Bernstein, P. Rawsthorne, M. Cheang, and J. F. Blanchard, “A population-based case control study of potential risk factors for ibd,” *The American journal of gastroenterology*, vol. 101, no. 5, pp. 993–1002, 2006.

- [25] K. Radon, D. Windstetter, A. L. Poluda, B. Mueller, E. von Mutius, S. Koletzko, *et al.*, “Contact with farm animals in early life and juvenile inflammatory bowel disease: a case-control study,” *Pediatrics*, vol. 120, no. 2, pp. 354–361, 2007.
- [26] C. Strisciuglio, F. Giugliano, M. Martinelli, S. Cenni, L. Greco, A. Staiano, and E. Miele, “Impact of environmental and familial factors in a cohort of pediatric patients with inflammatory bowel disease,” *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, vol. 64, no. 4, pp. 569–574, 2017.
- [27] B. Geerling, P. Dagnelie, A. Badart-Smook, M. Russel, R. Stockbrügger, and R.-J. Brummer, “Diet as a risk factor for the development of ulcerative colitis,” *The American journal of gastroenterology*, vol. 95, no. 4, pp. 1008–1013, 2000.
- [28] A. Sonnenberg, “Occupational distribution of inflammatory bowel disease among german employees.,” *Gut*, vol. 31, no. 9, pp. 1037–1040, 1990.
- [29] C. N. Bernstein, S. Singh, L. A. Graff, J. R. Walker, N. Miller, and M. Cheang, “A prospective population-based study of triggers of symptomatic flares in ibd,” *The American journal of gastroenterology*, vol. 105, no. 9, pp. 1994–2002, 2010.
- [30] A. N. Ananthakrishnan, H. Khalili, G. G. Konijeti, L. M. Higuchi, P. de Silva, C. S. Fuchs, J. M. Richter, E. S. Schernhammer, and A. T. Chan, “Sleep duration affects risk for ulcerative colitis: a prospective cohort study,” *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, vol. 12, no. 11, pp. 1879–1886, 2014.
- [31] T. Ali, M. F. Madhoun, W. C. Orr, and D. T. Rubin, “Assessment of the relationship between quality of sleep and disease activity in inflammatory bowel disease patients,” *Inflammatory bowel diseases*, vol. 19, no. 11, pp. 2440–2443, 2013.
- [32] J. B. Felder, B. I. Korelitz, R. Rajapakse, S. Schwarz, A. P. Horatagis, and G. Gleim, “Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on inflammatory bowel disease: a case-control study,” *The American journal of gastroenterology*, vol. 95, no. 8, pp. 1949–1954, 2000.

- [33] S. Y. Shaw, J. F. Blanchard, and C. N. Bernstein, “Association between the use of antibiotics and new diagnoses of crohn’s disease and ulcerative colitis,” *The American journal of gastroenterology*, vol. 106, no. 12, pp. 2133–2142, 2011.
- [34] R. E. Andersson, G. Olaison, C. Tysk, and A. Ekbom, “Appendectomy and protection against ulcerative colitis,” *New England Journal of Medicine*, vol. 344, no. 11, pp. 808–814, 2001.
- [35] S. S. Mahid, K. S. Minor, R. E. Soto, C. A. Hornung, and S. Galandiuk, “Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis,” in *Mayo Clinic Proceedings*, vol. 81, pp. 1462–1471, Elsevier, 2006.
- [36] L. M. Higuchi, H. Khalili, A. T. Chan, J. M. Richter, A. Bousvaros, and C. S. Fuchs, “A prospective study of cigarette smoking and the risk of inflammatory bowel disease in women,” *The American journal of gastroenterology*, vol. 107, no. 9, pp. 1399–1406, 2012.
- [37] S. Tuddenham and C. L. Sears, “The intestinal microbiome and health,” *Current opinion in infectious diseases*, vol. 28, no. 5, p. 464, 2015.
- [38] C. M. Guinane and P. D. Cotter, “Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ,” *Therapeutic advances in gastroenterology*, vol. 6, no. 4, pp. 295–308, 2013.
- [39] A. Swidsinski, A. Ladhoff, A. Pernthaler, S. Swidsinski, V. Loening-Baucke, M. Ortner, J. Weber, U. Hoffmann, S. Schreiber, M. Dietel, *et al.*, “Mucosal flora in inflammatory bowel disease,” *Gastroenterology*, vol. 122, no. 1, pp. 44–54, 2002.
- [40] D. N. Frank, C. E. Robertson, C. M. Hamm, Z. Kpadeh, T. Zhang, H. Chen, W. Zhu, R. B. Sartor, E. C. Boedeker, N. Harpaz, *et al.*, “Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases,” *Inflammatory bowel diseases*, vol. 17, no. 1, pp. 179–184, 2011.
- [41] R. Kühn, J. Löhler, D. Rennick, K. Rajewsky, and W. Müller, “Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis,” *Cell*, vol. 75, no. 2, pp. 263–274, 1993.

- [42] R. K. Sellon, S. Tonkonogy, M. Schultz, L. A. Dieleman, W. Grenther, E. Balish, D. M. Rennick, and R. B. Sartor, "Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice," *Infection and immunity*, vol. 66, no. 11, pp. 5224–5231, 1998.
- [43] C. Veltkamp, S. L. Tonkonogy, Y. P. De Jong, C. Albright, W. B. Grenther, E. Balish, C. Terhorst, and R. B. Sartor, "Continuous stimulation by normal luminal bacteria is essential for the development and perpetuation of colitis in tge26 mice," *Gastroenterology*, vol. 120, no. 4, pp. 900–913, 2001.
- [44] J. D. Taurog, J. A. Richardson, J. Croft, W. A. Simmons, M. Zhou, J. L. Fernández-Sueiro, E. Balish, and R. E. Hammer, "The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in hla-b27 transgenic rats," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 180, no. 6, pp. 2359–2364, 1994.
- [45] F. Seibold, S. Brandwein, S. Simpson, C. Terhorst, and C. Elson, "panca represents a cross-reactivity to enteric bacterial antigens," *Journal of clinical immunology*, vol. 18, no. 2, pp. 153–160, 1998.
- [46] O. Cohavy, D. Bruckner, L. Gordon, R. Misra, B. Wei, M. Eggena, S. Targan, and J. Braun, "Colonic bacteria express an ulcerative colitis panca-related protein epitope," *Infection and immunity*, vol. 68, no. 3, pp. 1542–1548, 2000.
- [47] M. E. Johansson, J. K. Gustafsson, J. Holmén-Larsson, K. S. Jabbar, L. Xia, H. Xu, F. K. Ghishan, F. A. Carvalho, A. T. Gewirtz, H. Sjövall, *et al.*, "Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis," *Gut*, pp. gutjnl-2012, 2013.
- [48] M. Van der Sluis, B. A. De Koning, A. C. De Bruijn, A. Velcich, J. P. Meijerink, J. B. Van Goudoever, H. A. Büller, J. Dekker, I. Van Seuningen, I. B. Renes, *et al.*, "Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that muc2 is critical for colonic protection," *Gastroenterology*, vol. 131, no. 1, pp. 117–129, 2006.

- [49] M. T. Abreu, “Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 10, no. 2, pp. 131–144, 2010.
- [50] L. Dubuquoy, E. Å. Jansson, S. Deeb, S. Rakotobe, M. Karoui, J.-F. Colombel, J. Auwerx, S. Pettersson, and P. Desreumaux, “Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ in ulcerative colitis,” *Gastroenterology*, vol. 124, no. 5, pp. 1265–1276, 2003.
- [51] J. C. Brazil, N. A. Louis, and C. A. Parkos, “The role of polymorphonuclear leukocyte trafficking in the perpetuation of inflammation during inflammatory bowel disease,” *Inflammatory bowel diseases*, vol. 19, no. 7, p. 1556, 2013.
- [52] A. L. Hart, H. O. Al-Hassi, R. J. Rigby, S. J. Bell, A. V. Emmanuel, S. C. Knight, M. A. Kamm, and A. J. Stagg, “Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases,” *Gastroenterology*, vol. 129, no. 1, pp. 50–65, 2005.
- [53] O. Medina-Contreras, D. Geem, O. Laur, I. R. Williams, S. A. Lira, A. Nusrat, C. A. Parkos, and T. L. Denning, “Cx3cr1 regulates intestinal macrophage homeostasis, bacterial translocation, and colitogenic th17 responses in mice,” *The Journal of clinical investigation*, vol. 121, no. 12, pp. 4787–4795, 2011.
- [54] R. Daig, T. Andus, E. Aschenbrenner, W. Falk, J. Schölmerich, and V. Gross, “Increased interleukin 8 expression in the colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease,” *Gut*, vol. 38, no. 2, pp. 216–222, 1996.
- [55] L. Mazzucchelli, C. Hauser, K. Zraggen, H. Wagner, M. Hess, J. A. Laissue, and C. Mueller, “Expression of interleukin-8 gene in inflammatory bowel disease is related to the histological grade of active inflammation,” *The American journal of pathology*, vol. 144, no. 5, p. 997, 1994.
- [56] Y. Umehara, M. Kudo, R. Nakaoka, T. Kawasaki, and M. Shiomi, “Serum proinflammatory cytokines and adhesion molecules in ulcerative colitis,” *Hepato-gastroenterology*, vol. 53, no. 72, pp. 879–882, 2006.

- [57] A. Zahn, T. Giese, M. Karner, A. Braun, U. Hinz, W. Stremmel, and R. Ehehalt, "Transcript levels of different cytokines and chemokines correlate with clinical and endoscopic activity in ulcerative colitis," *BMC gastroenterology*, vol. 9, no. 1, p. 13, 2009.
- [58] A. Egesten, M. Eliasson, A. I. Olin, J. S. Erjefält, A. Bjartell, P. Sangfelt, and M. Carlson, "The proinflammatory cxc-chemokines gro- α /cxcl1 and mig/cxcl9 are concomitantly expressed in ulcerative colitis and decrease during treatment with topical corticosteroids," *International journal of colorectal disease*, vol. 22, no. 12, pp. 1421–1427, 2007.
- [59] A. Kaser, O. Ludwiczek, S. Holzmann, A. R. Moschen, G. Weiss, B. Enrich, I. Graziadei, S. Dunzendorfer, C. J. Wiedermann, E. Mürzl, *et al.*, "Increased expression of ccl20 in human inflammatory bowel disease," *Journal of clinical immunology*, vol. 24, no. 1, pp. 74–85, 2004.
- [60] V. Casini-Raggi, L. Kam, Y. Chong, C. Fiocchi, T. T. Pizarro, and F. Cominelli, "Mucosal imbalance of il-1 and il-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. a novel mechanism of chronic intestinal inflammation.," *The Journal of Immunology*, vol. 154, no. 5, pp. 2434–2440, 1995.
- [61] B. Siegmund, G. Fantuzzi, F. Rieder, F. Gamboni-Robertson, H.-A. Lehr, G. Hartmann, C. A. Dinarello, S. Endres, and A. Eigler, "Neutralization of interleukin-18 reduces severity in murine colitis and intestinal ifn- γ and tnf- α production," *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, vol. 281, no. 4, pp. R1264–R1273, 2001.
- [62] J. S. Hyams, J. E. Fitzgerald, W. R. Treem, N. Wyzga, and D. L. Kreutzer, "Relationship of functional and antigenic interleukin 6 to disease activity in inflammatory bowel disease," *Gastroenterology*, vol. 104, no. 5, pp. 1285–1292, 1993.
- [63] Y. Kai, I. Takahashi, H. Ishikawa, T. Hiroi, T. Mizushima, C. Matsuda, D. Kishi, H. Hamada, H. Tamagawa, T. Ito, *et al.*, "Colitis in mice lacking the common cytokine receptor γ chain is mediated by il-6-producing cd4+ t cells," *Gastroenterology*, vol. 128, no. 4, pp. 922–934, 2005.
- [64] D. Bernardo, S. Vallejo-Díez, E. R. Mann, H. O. Al-Hassi, B. Martínez-Abad, E. Montalvillo, C. T. Tee, A. U. Muruganathan, H. Núñez, S. T.

- Peake, *et al.*, “Il-6 promotes immune responses in human ulcerative colitis and induces a skin-homing phenotype in the dendritic cells and tcells they stimulate,” *European journal of immunology*, vol. 42, no. 5, pp. 1337–1353, 2012.
- [65] R. Atreya, U. Billmeier, T. Rath, J. Mudter, M. Vieth, H. Neumann, and M. F. Neurath, “First case report of exacerbated ulcerative colitis after anti-interleukin-6r salvage therapy,” *World journal of gastroenterology*, vol. 21, no. 45, p. 12963, 2015.
- [66] R. Atreya, M. Zimmer, B. Bartsch, M. J. Waldner, I. Atreya, H. Neumann, K. Hildner, A. Hoffman, R. Kiesslich, A. D. Rink, *et al.*, “Antibodies against tumor necrosis factor (tnf) induce t-cell apoptosis in patients with inflammatory bowel diseases via tnf receptor 2 and intestinal cd14+ macrophages,” *Gastroenterology*, vol. 141, no. 6, pp. 2026–2038, 2011.
- [67] T. MacDonald, P. Hutchings, M.-Y. Choy, S. Murch, and A. Cooke, “Tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma production measured at the single cell level in normal and inflamed human intestine,” *Clinical & Experimental Immunology*, vol. 81, no. 2, pp. 301–305, 1990.
- [68] S. Murch, V. Lamkin, M. Savage, J. Walker-Smith, and T. MacDonald, “Serum concentrations of tumour necrosis factor alpha in childhood chronic inflammatory bowel disease.,” *Gut*, vol. 32, no. 8, pp. 913–917, 1991.
- [69] C. Braegger, S. Nicholls, S. Murch, T. MacDonald, and S. Stephens, “Tumour necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation,” *The Lancet*, vol. 339, no. 8785, pp. 89–91, 1992.
- [70] H. Masuda, S. Iwai, T. Tanaka, and S. Hayakawa, “Expression of il-8, tnf-alpha and ifn-gamma m-rna in ulcerative colitis, particularly in patients with inactive phase.,” *Journal of clinical & laboratory immunology*, vol. 46, no. 3, pp. 111–123, 1995.
- [71] A. Borghi, L. Verstrepen, and R. Beyaert, “Traf2 multitasking in tnf receptor-induced signaling to nf- κ b, map kinases and cell death,” *Biochemical pharmacology*, vol. 116, pp. 1–10, 2016.

- [72] C. Perrier, G. De Hertogh, J. Cremer, S. Vermeire, P. Rutgeerts, G. Van Assche, D. E. Szymkowski, and J. L. Ceuppens, “Neutralization of membrane tnf, but not soluble tnf, is crucial for the treatment of experimental colitis,” *Inflammatory bowel diseases*, vol. 19, no. 2, pp. 246–253, 2012.
- [73] M. H. Holtmann, E. Douni, M. Schütz, G. Zeller, J. Mudter, H.-A. Lehr, J. Gerspach, P. Scheurich, P. R. Galle, G. Kollias, *et al.*, “Tumor necrosis factor-receptor 2 is up-regulated on lamina propria t cells in crohn’s disease and promotes experimental colitis in vivo,” *European journal of immunology*, vol. 32, no. 11, pp. 3142–3151, 2002.
- [74] P. Rutgeerts, W. J. Sandborn, B. G. Feagan, W. Reinisch, A. Olson, J. Johanns, S. Travers, D. Rachmilewitz, S. B. Hanauer, G. R. Lichtenstein, *et al.*, “Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis,” *New England Journal of Medicine*, vol. 353, no. 23, pp. 2462–2476, 2005.
- [75] D. A. Vignali and V. K. Kuchroo, “Il-12 family cytokines: immunological playmakers,” *Nature immunology*, vol. 13, no. 8, p. 722, 2012.
- [76] S. Wirtz, U. Billmeier, T. Mchedlidze, R. S. Blumberg, and M. F. Neurath, “Interleukin-35 mediates mucosal immune responses that protect against t-cell-dependent colitis,” *Gastroenterology*, vol. 141, no. 5, pp. 1875–1886, 2011.
- [77] A. Eaton-Bassiri, S. B. Dillon, M. Cunningham, M. A. Ryczyn, J. Mills, R. T. Sarisky, and M. L. Mbow, “Toll-like receptor 9 can be expressed at the cell surface of distinct populations of tonsils and human peripheral blood mononuclear cells,” *Infection and immunity*, vol. 72, no. 12, pp. 7202–7211, 2004.
- [78] K. Katakura, J. Lee, D. Rachmilewitz, G. Li, L. Eckmann, and E. Raz, “Toll-like receptor 9-induced type i ifn protects mice from experimental colitis,” *The Journal of clinical investigation*, vol. 115, no. 3, pp. 695–702, 2005.
- [79] E. Musch, T. Andus, W. Kruis, A. Raedler, M. Spehlmann, S. Schreiber, B. Krakamp, M. Malek, H. Malchow, F. Zavada, *et al.*, “Interferon- β -1a for

- the treatment of steroid-refractory ulcerative colitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial,” *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, vol. 3, no. 6, pp. 581–586, 2005.
- [80] E. Musch, T. Lutfi, P. von Stein, A. Zargari, C. Admyre, M. Malek, R. Löfberg, and O. D. von Stein, “Topical treatment with the toll-like receptor agonist dms0150 has potential for lasting relief of symptoms in patients with chronic active ulcerative colitis by restoring glucocorticoid sensitivity,” *Inflammatory bowel diseases*, vol. 19, no. 2, pp. 283–292, 2012.
- [81] L. Pastorelli, R. R. Garg, S. B. Hoang, L. Spina, B. Mattioli, M. Scarpa, C. Fiocchi, M. Vecchi, and T. T. Pizarro, “Epithelial-derived il-33 and its receptor st2 are dysregulated in ulcerative colitis and in experimental th1/th2 driven enteritis,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107, no. 17, pp. 8017–8022, 2010.
- [82] M. A. Sedhom, M. Pichery, J. R. Murdoch, B. Foligné, N. Ortega, S. Normand, K. Mertz, D. Sanmugalingam, L. Brault, T. Grandjean, *et al.*, “Neutralisation of the interleukin-33/st2 pathway ameliorates experimental colitis through enhancement of mucosal healing in mice,” *Gut*, pp. gutjnl–2011, 2012.
- [83] H. Imaeda, K. Takahashi, T. Fujimoto, E. Kasumi, H. Ban, S. Bamba, H. Sonoda, T. Shimizu, Y. Fujiyama, and A. Andoh, “Epithelial expression of interleukin-37b in inflammatory bowel disease,” *Clinical & Experimental Immunology*, vol. 172, no. 3, pp. 410–416, 2013.
- [84] E. N. McNamee, J. C. Masterson, P. Jedlicka, M. McManus, A. Grenz, C. B. Collins, M. F. Nold, C. Nold-Petry, P. Bufler, C. A. Dinarello, *et al.*, “Interleukin 37 expression protects mice from colitis,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 108, no. 40, pp. 16711–16716, 2011.
- [85] I. Monteleone, P. Vavassori, L. Biancone, G. Monteleone, and F. Pallone, “Immunoregulation in the gut: success and failures in human disease,” *Gut*, vol. 50, no. suppl 3, pp. iii60–iii64, 2002.
- [86] K. Leiper, K. Martin, A. Ellis, S. Subramanian, A. J. Watson, S. E. Christmas, D. Howarth, F. Campbell, and J. M. Rhodes, “Randomised placebo-

- controlled trial of rituximab (anti-cd20) in active ulcerative colitis,” *Gut*, vol. 60, no. 11, pp. 1520–1526, 2011.
- [87] R. MacDermott, G. Nash, and M. Nahm, “Antibody secretion by human intestinal mononuclear cells from normal controls and inflammatory bowel disease patients,” *Immunological investigations*, vol. 18, no. 1-4, pp. 449–457, 1989.
- [88] F. Takahashi and K. M. Das, “Isolation and characterization of a colonic autoantigen specifically recognized by colon tissue-bound immunoglobulin g from idiopathic ulcerative colitis,” *The Journal of clinical investigation*, vol. 76, no. 1, pp. 311–318, 1985.
- [89] X. Geng, L. Biancone, H. H. Dai, J.-C. Lin, N. Yoshizaki, A. Dasgupta, F. Pallone, and K. M. Das, “Tropomyosin isoforms in intestinal mucosa: production of autoantibodies to tropomyosin isoforms in ulcerative colitis,” *Gastroenterology*, vol. 114, no. 5, pp. 912–922, 1998.
- [90] I. J. Fuss, F. Heller, M. Boirivant, F. Leon, M. Yoshida, S. Fichtner-Feigl, Z. Yang, M. Exley, A. Kitani, R. S. Blumberg, *et al.*, “Nonclassical cd1d-restricted nk t cells that produce il-13 characterize an atypical th2 response in ulcerative colitis,” *The Journal of clinical investigation*, vol. 113, no. 10, pp. 1490–1497, 2004.
- [91] F. Heller, I. J. Fuss, E. E. Nieuwenhuis, R. S. Blumberg, and W. Strober, “Oxazolone colitis, a th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by il-13-producing nk-t cells,” *Immunity*, vol. 17, no. 5, pp. 629–638, 2002.
- [92] F. Heller, P. Florian, C. Bojarski, J. Richter, M. Christ, B. Hillenbrand, J. Mankertz, A. H. Gitter, N. Bürgel, M. Fromm, *et al.*, “Interleukin-13 is the key effector th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution,” *Gastroenterology*, vol. 129, no. 2, pp. 550–564, 2005.
- [93] P. C. Fulkerson, K. L. Schollaert, C. Bouffi, and M. E. Rothenberg, “Il-5 triggers a cooperative cytokine network that promotes eosinophil precursor maturation,” *The Journal of Immunology*, vol. 193, no. 8, pp. 4043–4052, 2014.

- [94] M. Lampinen, M. Carlson, P. Sangfelt, Y. Taha, M. Thörn, L. Lööf, Y. Raab, and P. Venge, "Il-5 and tnf- α participate in recruitment of eosinophils to intestinal mucosa in ulcerative colitis," *Digestive diseases and sciences*, vol. 46, no. 9, pp. 2004–2009, 2001.
- [95] A. Bree, F. J. Schlerman, M. Wadanoli, L. Tchistiakova, K. Marquette, X.-Y. Tan, B. A. Jacobson, A. Widom, T. A. Cook, N. Wood, *et al.*, "Il-13 blockade reduces lung inflammation after ascaris suum challenge in cynomolgus monkeys," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 119, no. 5, pp. 1251–1257, 2007.
- [96] M. T. Kasaian, D. D. Donaldson, L. Tchistiakova, K. Marquette, X.-Y. Tan, A. Ahmed, B. A. Jacobson, A. Widom, T. A. Cook, X. Xu, *et al.*, "Efficacy of il-13 neutralization in a sheep model of experimental asthma," *American journal of respiratory cell and molecular biology*, vol. 36, no. 3, pp. 368–376, 2007.
- [97] W. Reinisch, J. Panés, S. Khurana, G. Toth, F. Hua, G. M. Comer, M. Hinz, K. Page, M. O'toole, T. M. Moorehead, *et al.*, "Anrukizumab, an anti-interleukin 13 monoclonal antibody, in active uc: efficacy and safety from a phase iia randomised multicentre study," *Gut*, vol. 64, no. 6, pp. 894–900, 2015.
- [98] S. Fujino, A. Andoh, S. Bamba, A. Ogawa, K. Hata, Y. Araki, T. Bamba, and Y. Fujiyama, "Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease," *Gut*, vol. 52, no. 1, pp. 65–70, 2003.
- [99] W. Ouyang, J. K. Kolls, and Y. Zheng, "The biological functions of t helper 17 cell effector cytokines in inflammation," *Immunity*, vol. 28, no. 4, pp. 454–467, 2008.
- [100] T. Kobayashi, S. Okamoto, T. Hisamatsu, N. Kamada, H. Chinen, R. Saito, M. T. Kitazume, A. Nakazawa, A. Sugita, K. Koganei, *et al.*, "Il23 differentially regulates the th1/th17 balance in ulcerative colitis and crohn's disease," *Gut*, vol. 57, no. 12, pp. 1682–1689, 2008.
- [101] W. Hueber, B. E. Sands, S. Lewitzky, M. Vandemeulebroecke, W. Reinisch, P. D. Higgins, J. Wehkamp, B. G. Feagan, M. D. Yao, M. Karczewski, *et al.*, "Secukinumab, a human anti-il-17a monoclonal antibody, for moderate to

- severe crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial," *Gut*, pp. gutjnl-2011, 2012.
- [102] E. G. Wedebye Schmidt, H. L. Larsen, N. N. Kristensen, S. S. Poulsen, A. M. Lynge Pedersen, M. H. Claesson, and A. E. Pedersen, "Th17 cell induction and effects of il-17a and il-17f blockade in experimental colitis," *Inflammatory bowel diseases*, vol. 19, no. 8, pp. 1567–1576, 2013.
- [103] W. J. Sandborn, C. Gasink, L.-L. Gao, M. A. Blank, J. Johanns, C. Guzzo, B. E. Sands, S. B. Hanauer, S. Targan, P. Rutgeerts, *et al.*, "Ustekinumab induction and maintenance therapy in refractory crohn's disease," *New England Journal of Medicine*, vol. 367, no. 16, pp. 1519–1528, 2012.
- [104] B. G. Feagan, W. J. Sandborn, C. Gasink, D. Jacobstein, Y. Lang, J. R. Friedman, M. A. Blank, J. Johanns, L.-L. Gao, Y. Miao, *et al.*, "Ustekinumab as induction and maintenance therapy for crohn's disease," *New England Journal of Medicine*, vol. 375, no. 20, pp. 1946–1960, 2016.
- [105] K. Gerlach, Y. Hwang, A. Nikolaev, R. Atreya, H. Dornhoff, S. Steiner, H.-A. Lehr, S. Wirtz, M. Vieth, A. Waisman, *et al.*, "T h 9 cells that express the transcription factor pu. 1 drive t cell-mediated colitis via il-9 receptor signaling in intestinal epithelial cells," *Nature immunology*, vol. 15, no. 7, p. 676, 2014.
- [106] R. Atreya, J. Mudter, S. Finotto, J. Müllberg, T. Jostock, S. Wirtz, M. Schütz, B. Bartsch, M. Holtmann, C. Becker, *et al.*, "Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses t-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo," *Nature medicine*, vol. 6, no. 5, p. 583, 2000.
- [107] J. Mudter, L. Amoussina, M. Schenk, J. Yu, A. Brüstle, B. Weigmann, R. Atreya, S. Wirtz, C. Becker, A. Hoffman, *et al.*, "The transcription factor ifn regulatory factor-4 controls experimental colitis in mice via t cell-derived il-6," *The Journal of clinical investigation*, vol. 118, no. 7, pp. 2415–2426, 2008.
- [108] B. Weigmann, H. A. Lehr, G. Yancopoulos, D. Valenzuela, A. Murphy, S. Stevens, J. Schmidt, P. R. Galle, S. Rose-John, and M. F. Neurath, "The transcription factor nfatc2 controls il-6-dependent t cell activation in

- experimental colitis,” *Journal of Experimental Medicine*, vol. 205, no. 9, pp. 2099–2110, 2008.
- [109] J. Bystrom, T. E. Taher, M. S. Muhyaddin, F. I. Clanchy, P. Mangat, A. S. Jawad, R. O. Williams, and R. A. Mageed, “Harnessing the therapeutic potential of th17 cells,” *Mediators of inflammation*, vol. 2015, 2015.
- [110] G. Monteleone, R. Caruso, D. Fina, I. Peluso, V. Gioia, C. Stolfi, M. C. Fantini, F. Caprioli, R. Tersigni, L. Alessandrini, *et al.*, “Control of matrix metalloproteinase production in human intestinal fibroblasts by interleukin 21,” *Gut*, vol. 55, no. 12, pp. 1774–1780, 2006.
- [111] K. Sugimoto, A. Ogawa, E. Mizoguchi, Y. Shimomura, A. Andoh, A. K. Bhan, R. S. Blumberg, R. J. Xavier, and A. Mizoguchi, “IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis,” *The Journal of clinical investigation*, vol. 118, no. 2, pp. 534–544, 2008.
- [112] L. A. Zenewicz, G. D. Yancopoulos, D. M. Valenzuela, A. J. Murphy, S. Stevens, and R. A. Flavell, “Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease,” *Immunity*, vol. 29, no. 6, pp. 947–957, 2008.
- [113] C. Asseman, S. Mauze, M. W. Leach, R. L. Coffman, and F. Powrie, “An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory t cells that inhibit intestinal inflammation,” *Journal of Experimental Medicine*, vol. 190, no. 7, pp. 995–1004, 1999.
- [114] F. Powrie, J. Carlino, M. W. Leach, S. Mauze, and R. L. Coffman, “A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of t helper type 1-mediated colitis by cd45rb (low) cd4+ t cells,” *Journal of Experimental Medicine*, vol. 183, no. 6, pp. 2669–2674, 1996.
- [115] G. Monteleone, A. Kumberova, N. M. Croft, C. McKenzie, H. W. Steer, and T. T. MacDonald, “Blocking smad7 restores tgf- β 1 signaling in chronic inflammatory bowel disease,” *The Journal of clinical investigation*, vol. 108, no. 4, pp. 601–609, 2001.

- [116] M. C. Fantini, A. Rizzo, D. Fina, R. Caruso, M. Sarra, C. Stolfi, C. Becker, T. T. MacDonald, F. Pallone, M. F. Neurath, *et al.*, “Smad7 controls resistance of colitogenic t cells to regulatory t cell-mediated suppression,” *Gastroenterology*, vol. 136, no. 4, pp. 1308–1316, 2009.
- [117] G. Monteleone, M. F. Neurath, S. Ardizzone, A. Di Sabatino, M. C. Fantini, F. Castiglione, M. L. Scribano, A. Armuzzi, F. Caprioli, G. C. Sturniolo, *et al.*, “Mongersen, an oral smad7 antisense oligonucleotide, and crohn’s disease,” *New England Journal of Medicine*, vol. 372, no. 12, pp. 1104–1113, 2015.
- [118] J. Panés and I. Alfaro, “New treatment strategies for ulcerative colitis,” *Expert Review of Clinical Immunology*, no. just-accepted, 2017.
- [119] M. Harbord, R. Eliakim, D. Bettenworth, K. Karmiris, K. Katsanos, U. Kopylov, T. Kucharzik, T. Molnár, T. Raine, S. Sebastian, *et al.*, “Third european evidence-based consensus on diagnosis and management of ulcerative colitis. part 2: Current management,” *Journal of Crohn’s and Colitis*, p. jjx009, 2017.
- [120] M. Lamet, “A multicenter, randomized study to evaluate the efficacy and safety of mesalamine suppositories 1 g at bedtime and 500 mg twice daily in patients with active mild-to-moderate ulcerative proctitis,” *Digestive diseases and sciences*, vol. 56, no. 2, pp. 513–522, 2011.
- [121] J. K. Marshall, M. Thabane, A. H. Steinhart, J. Newman, A. Anand, and E. Irvine, “Rectal 5-aminosalicylic acid for induction of remission in ulcerative colitis,” *Cochrane Database Syst Rev*, vol. 1, 2010.
- [122] M. Connolly, C. Poole, C. Currie, P. Marteau, and S. Nielsen, “Quality of life improvements attributed to combination therapy with oral and topical mesalazine in mild-to-moderately active ulcerative colitis,” *Digestion*, vol. 80, no. 4, pp. 241–246, 2009.
- [123] J. Lennard-Jones, A. Longmore, A. Newell, C. Wilson, and F. A. Jones, “An assessment of prednisone, salazopyrin, and topical hydrocortisone hemisuccinate used as out-patient treatment for ulcerative colitis,” *Gut*, vol. 1, no. 3, pp. 217–222, 1960.

- [124] W. A. Faubion, E. V. Loftus, W. S. Harmsen, A. R. Zinsmeister, and W. J. Sandborn, "The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population-based study," *Gastroenterology*, vol. 121, no. 2, pp. 255–260, 2001.
- [125] M. E. Sherlock, C. H. Seow, A. H. Steinhart, and A. M. Griffiths, "Oral budesonide for induction of remission in ulcerative colitis," *Cochrane Database Syst Rev*, vol. 10, 2010.
- [126] F. Rizzello, P. Gionchetti, A. D'ariento, F. Manguso, G. Di Matteo, V. Annesse, D. Valpiani, T. Casetti, S. Adamo, A. Prada, *et al.*, "Oral beclomethasone dipropionate in the treatment of active ulcerative colitis: a double-blind placebo-controlled study," *Alimentary pharmacology & therapeutics*, vol. 16, no. 6, pp. 1109–1116, 2002.
- [127] S. Ardizzone, G. Maconi, A. Russo, V. Imbesi, E. Colombo, and G. B. Porro, "Randomised controlled trial of azathioprine and 5-aminosalicylic acid for treatment of steroid dependent ulcerative colitis," *Gut*, vol. 55, no. 1, pp. 47–53, 2006.
- [128] A. Timmer, P. H. Patton, N. Chande, J. W. McDonald, and J. K. MacDonald, "Azathioprine and 6-mercaptopurine for maintenance of remission in ulcerative colitis," *The Cochrane Library*, 2016.
- [129] A. Fraser, T. Orchard, and D. Jewell, "The efficacy of azathioprine for the treatment of inflammatory bowel disease: a 30 year review," *Gut*, vol. 50, no. 4, pp. 485–489, 2002.
- [130] S. Danese, G. Fiorino, L. Peyrin-Biroulet, E. Lucenteforte, G. Virgili, L. Moja, and S. Bonovas, "Biological agents for moderately to severely active ulcerative colitis: a systematic review and network meta-analysis," *Annals of internal medicine*, vol. 160, no. 10, pp. 704–711, 2014.
- [131] L. Whitehead, "The impact of biological interventions for ulcerative colitis on health-related quality of life," *AJN The American Journal of Nursing*, vol. 116, no. 11, p. 21, 2016.

- [132] R. Panccione, S. Ghosh, S. Middleton, J. R. Marquez, I. Khalif, L. Flint, H. van Hoogstraten, H. Zheng, S. Danese, and P. J. Rutgeerts, “Infliximab, azathioprine, or infliximab+ azathioprine for treatment of moderate to severe ulcerative colitis: the uc success trial,” *Gastroenterology*, vol. 140, no. 5, pp. S-134, 2011.
- [133] B. G. Feagan, P. Rutgeerts, B. E. Sands, S. Hanauer, J.-F. Colombel, W. J. Sandborn, G. Van Assche, J. Axler, H.-J. Kim, S. Danese, *et al.*, “Vedolizumab as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis,” *New England Journal of Medicine*, vol. 369, no. 8, pp. 699–710, 2013.
- [134] R. Lynch, D. Lowe, A. Protheroe, R. Driscoll, J. Rhodes, and I. Arnott, “Outcomes of rescue therapy in acute severe ulcerative colitis: data from the united kingdom inflammatory bowel disease audit,” *Alimentary pharmacology & therapeutics*, vol. 38, no. 8, pp. 935–945, 2013.
- [135] A. Kornbluth and D. B. Sachar, “Ulcerative colitis practice guidelines in adults: American college of gastroenterology, practice parameters committee,” *The American journal of gastroenterology*, vol. 105, no. 3, pp. 501–523, 2010.
- [136] D. Laharie, A. Bourreille, J. Branche, M. Allez, Y. Bouhnik, J. Filippi, F. Zerbib, G. Savoye, M. Nachury, J. Moreau, *et al.*, “Ciclosporin versus infliximab in patients with severe ulcerative colitis refractory to intravenous steroids: a parallel, open-label randomised controlled trial,” *The Lancet*, vol. 380, no. 9857, pp. 1909–1915, 2012.
- [137] J. G. Williams, M. F. Alam, L. Alrubaiy, I. Arnott, C. Clement, D. Cohen, J. N. Gordon, A. B. Hawthorne, M. Hilton, H. A. Hutchings, *et al.*, “Infliximab versus ciclosporin for steroid-resistant acute severe ulcerative colitis (construct): a mixed methods, open-label, pragmatic randomised trial,” *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, vol. 1, no. 1, pp. 15–24, 2016.
- [138] W. Kruis, L. Jonaitis, J. Pokrotnieks, T. Mikhailova, M. Horynski, M. Bátorovský, Y. Lozynsky, Y. Zakharash, I. Rácz, K. Kull, *et al.*, “Randomised clinical trial: a comparative dose-finding study of three arms of dual release mesalazine for maintaining remission in ulcerative colitis,” *Alimentary pharmacology & therapeutics*, vol. 33, no. 3, pp. 313–322, 2011.

- [139] Y. Wang, C. E. Parker, B. G. Feagan, and J. K. MacDonald, “Oral 5-aminosalicylic acid for maintenance of remission in ulcerative colitis,” *The Cochrane Library*, 2016.
- [140] A. Timmer, J. McDonald, D. J. Tsoulis, J. K. MacDonald, *et al.*, “Azathioprine and 6-mercaptopurine for maintenance of remission in ulcerative colitis,” *Cochrane Database Syst Rev*, vol. 9, 2012.
- [141] W. J. Sandborn, G. Van Assche, W. Reinisch, J.-F. Colombel, G. D’Haens, D. C. Wolf, M. Kron, M. B. Tighe, A. Lazar, and R. B. Thakkar, “Adalimumab induces and maintains clinical remission in patients with moderate-to-severe ulcerative colitis,” *Gastroenterology*, vol. 142, no. 2, pp. 257–265, 2012.
- [142] O. Hoie, F. L. Wolters, L. Riis, T. Bernklev, G. Aamodt, J. Clofent, E. Tsianos, M. Beltrami, S. Odes, P. Munkholm, *et al.*, “Low colectomy rates in ulcerative colitis in an unselected european cohort followed for 10 years,” *Gastroenterology*, vol. 132, no. 2, pp. 507–515, 2007.
- [143] L. E. Targownik, H. Singh, Z. Nugent, and C. N. Bernstein, “The epidemiology of colectomy in ulcerative colitis: results from a population-based cohort,” *The American journal of gastroenterology*, vol. 107, no. 8, p. 1228, 2012.
- [144] H. Ross, S. R. Steele, M. Varma, S. Dykes, R. Cima, W. D. Buie, and J. Rafferty, “Practice parameters for the surgical treatment of ulcerative colitis,” *Diseases of the Colon & Rectum*, vol. 57, no. 1, pp. 5–22, 2014.
- [145] E. Gorgun and F. H. Remzi, “Complications of ileoanal pouches,” *Clinics in colon and rectal surgery*, vol. 17, no. 01, pp. 43–55, 2004.
- [146] A. Waljee, J. Waljee, A. Morris, and P. D. Higgins, “Threefold increased risk of infertility: a meta-analysis of infertility after ileal pouch anal anastomosis in ulcerative colitis,” *Gut*, vol. 55, no. 11, pp. 1575–1580, 2006.
- [147] J. K. Dyson and M. D. Rutter, “Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: what is the real magnitude of the risk?,” *World journal of gastroenterology: WJG*, vol. 18, no. 29, p. 3839, 2012.

- [148] P. Munkholm, "The incidence and prevalence of colorectal cancer in inflammatory bowel disease," *Alimentary pharmacology & therapeutics*, vol. 18, no. s2, pp. 1–5, 2003.
- [149] S. H. Itzkowitz and X. Yio, "Inflammation and cancer iv. colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation," *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 287, no. 1, pp. G7–G17, 2004.
- [150] M. P. Bronner, J. N. O'Sullivan, P. S. Rabinovitch, D. A. Crispin, L. Chen, M. J. Emond, C. E. Rubin, and T. A. Brentnall, "Genomic biomarkers to improve ulcerative colitis neoplasia surveillance," *The American journal of pathology*, vol. 173, no. 6, pp. 1853–1860, 2008.
- [151] S. Chang, L. Malter, and D. Hudesman, "Disease monitoring in inflammatory bowel disease," *World Journal of Gastroenterology: WJG*, vol. 21, no. 40, p. 11246, 2015.
- [152] S. Truelove and L. Witts, "Cortisone in ulcerative colitis," *British medical journal*, vol. 2, no. 4884, p. 375, 1954.
- [153] S. C. Truelove and L. Witts, "Cortisone in ulcerative colitis," *British medical journal*, vol. 2, no. 4947, p. 1041, 1955.
- [154] J. Powell-Tuck, R. Bown, and J. Lennard-Jones, "A comparison of oral prednisolone given as single or multiple daily doses for active proctocolitis," *Scandinavian journal of gastroenterology*, vol. 13, no. 7, pp. 833–837, 1978.
- [155] A. Walsh, A. Ghosh, A. Brain, O. Buchel, D. Burger, S. Thomas, L. White, G. Collins, S. Keshav, and S. Travis, "Comparing disease activity indices in ulcerative colitis," *Journal of Crohn's and Colitis*, vol. 8, no. 4, pp. 318–325, 2014.
- [156] W. Reinisch, W. J. Sandborn, M. Bala, S. Yan, B. G. Feagan, P. Rutgeerts, G. Radford-Smith, S. Xu, D. Eisenberg, A. Olson, *et al.*, "Response and remission are associated with improved quality of life, employment and disability status, hours worked, and productivity of patients with ulcerative colitis," *Inflammatory bowel diseases*, vol. 13, no. 9, pp. 1135–1140, 2007.

- [157] L. R. Sutherland, F. Martin, S. Greer, M. Robinson, N. Greenberger, F. Saibil, T. Martin, J. Sparr, E. Prokipchuk, and L. Borgen, "5-aminosalicylic acid enema in the treatment of distal ulcerative colitis, proctosigmoiditis, and proctitis," *Gastroenterology*, vol. 92, no. 6, pp. 1894–1898, 1987.
- [158] D. o. Rachmilewitz, "Coated mesalazine (5-aminosalicylic acid) versus sulphasalazine in the treatment of active ulcerative colitis: a randomised trial.," *Bmj*, vol. 298, no. 6666, pp. 82–86, 1989.
- [159] P. Rutgeerts, "Comparative efficacy of coated, oral 5-aminosalicylic acid (claversal) and sulphasalazine for maintaining remission of ulcerative colitis," *Alimentary pharmacology & therapeutics*, vol. 3, no. 2, pp. 183–191, 1989.
- [160] S. Lichtiger and D. Present, "Preliminary report: cyclosporin in treatment of severe active ulcerative colitis," *The Lancet*, vol. 336, no. 8706, pp. 16–19, 1990.
- [161] M. Seo, M. Okada, T. Yao, M. Ueki, S. Arima, and M. Okumura, "An index of disease activity in patients with ulcerative colitis.," *American Journal of Gastroenterology*, vol. 87, no. 8, 1992.
- [162] R. Walmsley, R. Ayres, R. Pounder, and R. Allan, "A simple clinical colitis activity index," *Gut*, vol. 43, no. 1, pp. 29–32, 1998.
- [163] P. D. Higgins, M. Schwartz, J. Mapili, and E. M. Zimmermann, "Is endoscopy necessary for the measurement of disease activity in ulcerative colitis?," *The American journal of gastroenterology*, vol. 100, no. 2, pp. 355–361, 2005.
- [164] J. D. Lewis, S. Chuai, L. Nessel, G. R. Lichtenstein, F. N. Aberra, and J. H. Ellenberg, "Use of the noninvasive components of the mayo score to assess clinical response in ulcerative colitis," *Inflammatory bowel diseases*, vol. 14, no. 12, pp. 1660–1666, 2008.
- [165] N. Williet, W. J. Sandborn, and L. Peyrin-Biroulet, "Patient-reported outcomes as primary end points in clinical trials of inflammatory bowel disease," *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, vol. 12, no. 8, pp. 1246–1256, 2014.

- [166] U. D. of Health, H. S. F. C. for Drug Evaluation, Research, U. D. of Health, H. S. F. C. for Biologics Evaluation, Research, U. D. of Health, H. S. F. C. for Devices, and R. Health, “Guidance for industry: patient-reported outcome measures: use in medical product development to support labeling claims: draft guidance,” *Health and Quality of Life Outcomes*, vol. 4, pp. 1–20, 2006.
- [167] V. Jairath, R. Khanna, G. Zou, L. Stitt, M. Mosli, M. Vandervoort, G. D’haens, W. Sandborn, B. Feagan, and B. Levesque, “Development of interim patient-reported outcome measures for the assessment of ulcerative colitis disease activity in clinical trials,” *Alimentary pharmacology & therapeutics*, vol. 42, no. 10, pp. 1200–1210, 2015.
- [168] E. J. Irvine, B. Feagan, J. Rochon, A. Archambault, R. N. Fedorak, A. Groll, D. Kinnear, F. Saibil, J. W. McDonald, C. C. R. P. T. S. Group, *et al.*, “Quality of life: a valid and reliable measure of therapeutic efficacy in the treatment of inflammatory bowel disease,” *Gastroenterology*, vol. 106, no. 2, pp. 287–296, 1994.
- [169] J. Panés, C. Su, A. G. Bushmakin, J. C. Cappelleri, C. Mamolo, and P. Healey, “Randomized trial of tofacitinib in active ulcerative colitis: analysis of efficacy based on patient-reported outcomes,” *BMC gastroenterology*, vol. 15, no. 1, p. 14, 2015.
- [170] J.-F. Colombel, M. E. Keir, A. Scherl, R. Zhao, G. de Hertogh, W. A. Faubion, and T. T. Lu, “Discrepancies between patient-reported outcomes, and endoscopic and histological appearance in uc,” *Gut*, vol. 66, no. 12, pp. 2063–2068, 2017.
- [171] T. Hibi, Y. Imai, A. Senoo, K. Ohta, and Y. Ukyo, “Efficacy and safety of golimumab 52-week maintenance therapy in japanese patients with moderate to severely active ulcerative colitis: a phase 3, double-blind, randomized, placebo-controlled study-(pursuit-j study),” *Journal of Gastroenterology*, pp. 1–11, 2017.
- [172] J. Baron, A. Connell, and J. Lennard-Jones, “Variation between observers in describing mucosal appearances in proctocolitis,” *British medical journal*, vol. 1, no. 5375, p. 89, 1964.

- [173] B. G. Feagan, G. R. Greenberg, G. Wild, R. N. Fedorak, P. Paré, J. W. McDonald, R. Dubé, A. Cohen, A. H. Steinhart, S. Landau, *et al.*, “Treatment of ulcerative colitis with a humanized antibody to the $\alpha 4\beta 7$ integrin,” *New England Journal of Medicine*, vol. 352, no. 24, pp. 2499–2507, 2005.
- [174] S. Hanauer, J. Schwartz, M. Robinson, W. Roufail, S. Arora, J. Cello, and M. Safdi, “Mesalamine capsules for treatment of active ulcerative colitis: results of a controlled trial,” *American Journal of Gastroenterology*, vol. 88, no. 8, 1993.
- [175] S. B. Hanauer, M. Robinson, R. Pruitt, A. J. Lazenby, T. Persson, L.-G. Nilsson, K. Walton-Bowen, L. P. Haskell, J. G. Levine, U. B. E. S. Group, *et al.*, “Budesonide enema for the treatment of active, distal ulcerative colitis and proctitis: a dose-ranging study,” *Gastroenterology*, vol. 115, no. 3, pp. 525–532, 1998.
- [176] S. P. Travis, D. Schnell, P. Krzeski, M. T. Abreu, D. G. Altman, J.-F. Colombel, B. G. Feagan, S. B. Hanauer, M. Lémann, G. R. Lichtenstein, *et al.*, “Developing an instrument to assess the endoscopic severity of ulcerative colitis: the ulcerative colitis endoscopic index of severity (uceis),” *Gut*, vol. 61, no. 4, pp. 535–542, 2012.
- [177] S. P. Travis, D. Schnell, P. Krzeski, M. T. Abreu, D. G. Altman, J.-F. Colombel, B. G. Feagan, S. B. Hanauer, G. R. Lichtenstein, P. R. Marteau, *et al.*, “Reliability and initial validation of the ulcerative colitis endoscopic index of severity,” *Gastroenterology*, vol. 145, no. 5, pp. 987–995, 2013.
- [178] S. P. Travis, D. Schnell, B. G. Feagan, M. T. Abreu, D. G. Altman, S. B. Hanauer, P. Krzeski, G. R. Lichtenstein, P. R. Marteau, J.-Y. Mary, *et al.*, “The impact of clinical information on the assessment of endoscopic activity: characteristics of the ulcerative colitis endoscopic index of severity [uceis],” *Journal of Crohn’s and Colitis*, vol. 9, no. 8, pp. 607–616, 2015.
- [179] F. Menasci, C. Pagnini, and E. Di Giulio, “Disease extension matters in endoscopic scores: Uceis calculated as a sum of the single colonic segments performed better than regular uceis in outpatients with ulcerative colitis,” *Journal of Crohn’s and Colitis*, vol. 9, no. 8, pp. 692–693, 2015.

- [180] T. Lobatón, T. Bessissow, G. De Hertogh, B. Lemmens, C. Maedler, G. Van Assche, S. Vermeire, R. Bisschops, P. Rutgeerts, A. Bitton, *et al.*, “The modified mayo endoscopic score (mmes): a new index for the assessment of extension and severity of endoscopic activity in ulcerative colitis patients,” *Journal of Crohn’s and Colitis*, vol. 9, no. 10, pp. 846–852, 2015.
- [181] T. T. Nostrant, N. B. Kumar, and H. D. Appelman, “Histopathology differentiates acute self-limited colitis from ulcerative colitis,” *Gastroenterology*, vol. 92, no. 2, pp. 318–328, 1987.
- [182] S. Truelove and W. Richards, “Biopsy studies in ulcerative colitis,” *British medical journal*, vol. 1, no. 4979, p. 1315, 1956.
- [183] R. Wright and S. R. Truelove, “Serial rectal biopsy in ulcerative colitis during the course of a controlled therapeutic trial of various diets,” *Digestive Diseases and Sciences*, vol. 11, no. 11, pp. 847–857, 1966.
- [184] S. F. Matts, “The value of rectal biopsy in the diagnosis of ulcerative colitis,” *QJ Med*, vol. 30, pp. 393–407, 1961.
- [185] J. M. Watts, H. Thompson, and J. Goligher, “Sigmoidoscopy and cytology in the detection of microscopic disease of the rectal mucosa in ulcerative colitis,” *Gut*, vol. 7, no. 3, p. 288, 1966.
- [186] M. H. Mosli, B. G. Feagan, W. J. Sandborn, G. D’Haens, C. Behling, K. Kaplan, D. K. Driman, L. M. Shackelton, K. A. Baker, J. K. MacDonald, *et al.*, “Histologic evaluation of ulcerative colitis: a systematic review of disease activity indices,” *Inflammatory bowel diseases*, vol. 20, no. 3, pp. 564–575, 2014.
- [187] M. H. Mosli, B. G. Feagan, G. Zou, W. J. Sandborn, G. D’Haens, R. Khanna, L. M. Shackelton, C. W. Walker, S. Nelson, M. K. Vandervoort, V. Frisbie, M. A. Samaan, V. Jairath, D. K. Driman, K. Geboes, M. A. Valasek, R. K. Pai, G. Y. Lauwers, R. Riddell, L. W. Stitt, and B. G. Levesque, “Development and validation of a histological index for uc,” *Gut*, vol. 66, no. 1, pp. 50–58, 2017.
- [188] A. Marchal-Bressenot, J. Salleron, C. Boulagnon-Rombi, C. Bastien, V. Cahn, G. Cadot, M.-D. Diebold, S. Danese, W. Reinisch, S. Schrei-

- ber, S. Travis, and L. Peyrin-Biroulet, "Development and validation of the Nancy histological index for uc," *Gut*, vol. 66, no. 1, pp. 43–49, 2017.
- [189] D. B. Kim, K.-M. Lee, J. M. Lee, Y. Y. Chung, H. J. Sung, C. N. Paik, W. C. Chung, J.-H. Jung, and H. J. Choi, "Correlation between histological activity and endoscopic, clinical, and serologic activities in patients with ulcerative colitis," *Gastroenterology research and practice*, vol. 2016, 2016.
- [190] B. Lemmens, I. Arijs, G. Van Assche, X. Sagaert, K. Geboes, M. Ferrante, P. Rutgeerts, S. Vermeire, and G. De Hertogh, "Correlation between the endoscopic and histologic score in assessing the activity of ulcerative colitis," *Inflammatory bowel diseases*, vol. 19, no. 6, pp. 1194–1201, 2013.
- [191] T. Bessissow, B. Lemmens, M. Ferrante, R. Bisschops, K. Van Steen, K. Geboes, G. Van Assche, S. Vermeire, P. Rutgeerts, and G. De Hertogh, "Prognostic value of serologic and histologic markers on clinical relapse in ulcerative colitis patients with mucosal healing," *The American journal of gastroenterology*, vol. 107, no. 11, pp. 1684–1692, 2012.
- [192] S. Riley, V. Mani, M. Goodman, S. Dutt, and M. Herd, "Microscopic activity in ulcerative colitis: what does it mean?," *Gut*, vol. 32, no. 2, pp. 174–178, 1991.
- [193] A. Bitton, M. A. Peppercorn, D. A. Antonioli, J. L. Niles, S. Shah, A. Bousvaros, B. Ransil, G. Wild, A. Cohen, M. D. D. Edwardes, *et al.*, "Clinical, biological, and histologic parameters as predictors of relapse in ulcerative colitis," *Gastroenterology*, vol. 120, no. 1, pp. 13–20, 2001.
- [194] S. Ardizzone, A. Cassinotti, P. Duca, C. Mazzali, C. Penati, G. Manes, R. Marmo, A. Massari, P. Molteni, G. Maconi, *et al.*, "Mucosal healing predicts late outcomes after the first course of corticosteroids for newly diagnosed ulcerative colitis," *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, vol. 9, no. 6, pp. 483–489, 2011.
- [195] W. Colburn, V. G. DeGruttola, D. L. DeMets, G. J. Downing, D. F. Hoth, J. A. Oates, C. C. Peck, R. T. Schooley, B. A. Spilker, J. Woodcock, *et al.*, "Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. biomarkers definitions working group," *Clinical Pharmacol & Therapeutics*, vol. 69, pp. 89–95, 2001.

- [196] J. E. Baars, V. J. Nuij, B. Oldenburg, E. J. Kuipers, and C. J. van der Woude, “Majority of patients with inflammatory bowel disease in clinical remission have mucosal inflammation,” *Inflammatory bowel diseases*, vol. 18, no. 9, pp. 1634–1640, 2011.
- [197] B. Jharap, W. Sandborn, W. Reinisch, G. D’haens, A. Robinson, W. Wang, B. Huang, A. Lazar, R. Thakkar, and J.-F. Colombel, “Randomised clinical study: discrepancies between patient-reported outcomes and endoscopic appearance in moderate to severe ulcerative colitis,” *Alimentary pharmacology & therapeutics*, vol. 42, no. 9, pp. 1082–1092, 2015.
- [198] B. E. Sands, “Biomarkers of inflammation in inflammatory bowel disease,” *Gastroenterology*, vol. 149, no. 5, pp. 1275–1285, 2015.
- [199] A. Mokrowiecka, A. Gasiorowska, and E. Malecka-Panas, “panca and asca in the diagnosis of different subtypes of inflammatory bowel disease.,” *Hepato-gastroenterology*, vol. 54, no. 77, pp. 1443–1448, 2007.
- [200] M. Cioffi, A. De Rosa, R. Serao, I. Picone, and M. T. Vietri, “Laboratory markers in ulcerative colitis: Current insights and future advances,” *World journal of gastrointestinal pathophysiology*, vol. 6, no. 1, p. 13, 2015.
- [201] D. Foell, H. Wittkowski, and J. Roth, “Monitoring disease activity by stool analyses: from occult blood to molecular markers of intestinal inflammation and damage,” *Gut*, vol. 58, no. 6, pp. 859–868, 2009.
- [202] J. Langhorst, S. Elsenbruch, J. Koelzer, A. Rueffer, A. Michalsen, and G. J. Dobos, “Noninvasive markers in the assessment of intestinal inflammation in inflammatory bowel diseases: performance of fecal lactoferrin, calprotectin, and pmn-elastase, crp, and clinical indices,” *The American journal of gastroenterology*, vol. 103, no. 1, pp. 162–169, 2008.
- [203] G. Chung-Faye, B. Hayee, S. Maestranzi, N. Donaldson, I. Forgacs, and R. Sherwood, “Fecal m2-pyruvate kinase (m2-pk): A novel marker of intestinal inflammation,” *Inflammatory bowel diseases*, vol. 13, no. 11, pp. 1374–1378, 2007.
- [204] J. Guardiola, T. Lobatón, L. Rodríguez-Alonso, A. Ruiz-Cerulla, C. Arajol, C. Loayza, X. Sanjuan, E. Sánchez, and F. Rodríguez-Moranta, “Fecal level

- of calprotectin identifies histologic inflammation in patients with ulcerative colitis in clinical and endoscopic remission,” *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, vol. 12, no. 11, pp. 1865–1870, 2014.
- [205] W. J. Sandborn, J. Panés, H. Zhang, D. Yu, W. Niezychowski, and C. Su, “Correlation between concentrations of fecal calprotectin and outcomes of patients with ulcerative colitis in a phase 2 trial,” *Gastroenterology*, vol. 150, no. 1, pp. 96–102, 2016.
- [206] A. M. Schoepfer, C. Beglinger, A. Straumann, M. Trummeler, P. Renzulli, and F. Seibold, “Ulcerative colitis: Correlation of the rachmilewitz endoscopic activity index with fecal calprotectin, clinical activity, c-reactive protein, and blood leukocytes,” *Inflammatory bowel diseases*, vol. 15, no. 12, pp. 1851–1858, 2009.
- [207] F. S. Lehmann, E. Burri, and C. Beglinger, “The role and utility of faecal markers in inflammatory bowel disease,” *Therapeutic advances in gastroenterology*, vol. 8, no. 1, pp. 23–36, 2015.
- [208] M. Manz, E. Burri, C. Rothen, N. Tchanguizi, C. Niederberger, L. Rossi, C. Beglinger, and F. S. Lehmann, “Value of fecal calprotectin in the evaluation of patients with abdominal discomfort: an observational study,” *BMC gastroenterology*, vol. 12, no. 1, p. 5, 2012.
- [209] A. Lason, P.-O. Stotzer, L. Öhman, S. Isaksson, M. Sapnara, and H. Strid, “The intra-individual variability of faecal calprotectin: a prospective study in patients with active ulcerative colitis,” *Journal of Crohn’s and Colitis*, vol. 9, no. 1, pp. 26–32, 2014.
- [210] P. F. Van Rheenen, E. Van de Vijver, and V. Fidler, “Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: diagnostic meta-analysis,” *Bmj*, vol. 341, p. c3369, 2010.
- [211] P. Henderson, N. H. Anderson, and D. C. Wilson, “The diagnostic accuracy of fecal calprotectin during the investigation of suspected pediatric inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis,” *The American journal of gastroenterology*, vol. 109, no. 5, pp. 637–645, 2014.

- [212] F. Stanke-Labesque, J. Pofelski, A. Moreau-Gaudry, G. Bessard, and B. Bonaz, "Urinary leukotriene e4 excretion: a biomarker of inflammatory bowel disease activity," *Inflammatory bowel diseases*, vol. 14, no. 6, pp. 769–774, 2008.
- [213] Y. Arai, S. Arihiro, T. Matsuura, T. Kato, M. Matsuoka, M. Saruta, M. Mitsunaga, M. Matsuura, M. Fujiwara, I. Okayasu, *et al.*, "Prostaglandin e–major urinary metabolite as a reliable surrogate marker for mucosal inflammation in ulcerative colitis," *Inflammatory bowel diseases*, vol. 20, no. 7, pp. 1208–1216, 2014.
- [214] K. Oikonomou, A. Kapsoritakis, C. Theodoridou, D. Karangelis, A. Germenis, I. Stefanidis, and S. Potamianos, "Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (ngal) in inflammatory bowel disease: association with pathophysiology of inflammation, established markers, and disease activity," *Journal of gastroenterology*, vol. 47, no. 5, pp. 519–530, 2012.
- [215] D. Niederwieser, D. Fuchs, A. Hausen, G. Judmaier, G. Reibnegger, H. Wachter, and C. Huber, "Neopterin as a new biochemical marker in the clinical assessment of ulcerative colitis," *Immunobiology*, vol. 170, no. 4, pp. 320–326, 1985.
- [216] K. W. Marshall, S. Mohr, F. E. Khettabi, N. Nossova, S. Chao, W. Bao, J. Ma, X.-J. Li, and C.-C. Liew, "A blood-based biomarker panel for stratifying current risk for colorectal cancer," *International journal of cancer*, vol. 126, no. 5, pp. 1177–1186, 2010.
- [217] K.-T. Yip, P. K. Das, D. Suria, C.-R. Lim, G.-H. Ng, and C.-C. Liew, "A case-controlled validation study of a blood-based seven-gene biomarker panel for colorectal cancer in malaysia," *Journal of experimental & clinical cancer research*, vol. 29, no. 1, p. 128, 2010.
- [218] R. Burakoff, S. Hande, J. Ma, P. A. Banks, S. Friedman, F. Makrauer, and C.-C. Liew, "Differential regulation of peripheral leukocyte genes in patients with active crohn's disease and crohn's disease in remission," *Journal of clinical gastroenterology*, vol. 44, no. 2, pp. 120–126, 2010.
- [219] R. Burakoff, V. Pabby, L. Onyewadume, R. Odze, C. Adackapara, W. Wang, S. Friedman, M. Hamilton, J. Korzenik, J. Levine, *et al.*, "Blood-

- based biomarkers used to predict disease activity in crohn's disease and ulcerative colitis," *Inflammatory bowel diseases*, vol. 21, no. 5, pp. 1132–1140, 2015.
- [220] R. Burakoff, S. Chao, M. Perencevich, J. Ying, S. Friedman, F. Makrauer, R. Odze, H. Khurana, and C.-C. Liew, "Blood-based biomarkers can differentiate ulcerative colitis from crohn's disease and noninflammatory diarrhea," *Inflammatory bowel diseases*, vol. 17, no. 8, pp. 1719–1725, 2011.
- [221] B. Mesko, S. Poliska, A. Vánca, Z. Szekanecz, K. Palatka, Z. Hollo, A. Horvath, L. Steiner, G. Zahuczky, J. Podani, *et al.*, "Peripheral blood derived gene panels predict response to infliximab in rheumatoid arthritis and crohn's disease," *Genome medicine*, vol. 5, no. 6, p. 59, 2013.
- [222] B. Kabakchiev, D. Turner, J. Hyams, D. Mack, N. Leleiko, W. Crandall, J. Markowitz, A. R. Otley, W. Xu, P. Hu, *et al.*, "Gene expression changes associated with resistance to intravenous corticosteroid therapy in children with severe ulcerative colitis," *PLoS One*, vol. 5, no. 9, p. e13085, 2010.
- [223] C. L. Noble, A. R. Abbas, J. Cornelius, C. W. Lees, G.-T. Ho, K. Toy, Z. Modrusan, N. Pal, F. Zhong, S. Chalasani, *et al.*, "Regional variation in gene expression in the healthy colon is dysregulated in ulcerative colitis," *Gut*, vol. 57, no. 10, pp. 1398–1405, 2008.
- [224] E. M. Comelli, S. Lariani, M.-C. Zwahlen, G. Fotopoulos, J. A. Holzwarth, C. Cherbut, G. Dorta, I. Corthésy-Theulaz, and M. Grigorov, "Biomarkers of human gastrointestinal tract regions," *Mammalian genome*, vol. 20, no. 8, pp. 516–527, 2009.
- [225] B. S. Boland, D. L. Boyle, W. J. Sandborn, G. S. Firestein, B. G. Levesque, J. Hillman, B. Zhang, J. Proudfoot, L. Eckmann, P. Ernst, *et al.*, "Validated gene expression biomarker analysis for biopsy-based clinical trials in ulcerative colitis," *Alimentary pharmacology & therapeutics*, vol. 40, no. 5, pp. 477–485, 2014.
- [226] J. Olsen, T. A. Gerds, J. B. Seidelin, C. Csillag, J. T. Bjerrum, J. T. Troelsen, and O. H. Nielsen, "Diagnosis of ulcerative colitis before onset of inflammation by multivariate modeling of genome-wide gene expression data," *Inflammatory bowel diseases*, vol. 15, no. 7, pp. 1032–1038, 2009.

- [227] S.-K. S. Hong, B. E. Maltz, L. A. Coburn, J. C. Slaughter, R. Chaturvedi, D. A. Schwartz, and K. T. Wilson, "Increased serum levels of l-arginine in ulcerative colitis and correlation with disease severity," *Inflammatory bowel diseases*, vol. 16, no. 1, pp. 105–111, 2009.
- [228] K. Balasubramanian, S. Kumar, R. R. Singh, U. Sharma, V. Ahuja, G. K. Makharia, and N. R. Jagannathan, "Metabolism of the colonic mucosa in patients with inflammatory bowel diseases: an in vitro proton magnetic resonance spectroscopy study," *Magnetic resonance imaging*, vol. 27, no. 1, pp. 79–86, 2009.
- [229] M.-A. Meuwis, M. Fillet, P. Geurts, D. De Seny, L. Lutteri, J.-P. Chapelle, V. Bours, L. Wehenkel, J. Belaiche, M. Malaise, *et al.*, "Biomarker discovery for inflammatory bowel disease, using proteomic serum profiling," *Biochemical pharmacology*, vol. 73, no. 9, pp. 1422–1433, 2007.
- [230] A. R. Joyce and B. Ø. Palsson, "The model organism as a system: integrating 'omics' data sets," *Nature reviews Molecular cell biology*, vol. 7, no. 3, p. 198, 2006.
- [231] S. A. Byron, K. R. Van Keuren-Jensen, D. M. Engelthaler, J. D. Carpten, and D. W. Craig, "Translating rna sequencing into clinical diagnostics: opportunities and challenges," *Nature Reviews Genetics*, vol. 17, no. 5, p. 257, 2016.
- [232] I. H. G. S. Consortium *et al.*, "Finishing the euchromatic sequence of the human genome," *Nature*, vol. 431, no. 7011, p. 931, 2004.
- [233] J. Harrow, A. Frankish, J. M. Gonzalez, E. Tapanari, M. Diekhans, F. Kokocinski, B. L. Aken, D. Barrell, A. Zadissa, S. Searle, *et al.*, "Gencode: the reference human genome annotation for the encode project," *Genome research*, vol. 22, no. 9, pp. 1760–1774, 2012.
- [234] E. P. Consortium *et al.*, "The encode (encyclopedia of dna elements) project," *Science*, vol. 306, no. 5696, pp. 636–640, 2004.
- [235] R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich, "Primer-directed enzymatic amplification of dna with a thermostable dna polymerase," *Science*, vol. 239, no. 4839, pp. 487–491, 1988.

- [236] S. Mizutani, D. Boettiger, and H. M. Temin, "A dna-dependent dna polymerase and a dna endonuclease in virions of rous sarcoma virus," *Nature*, vol. 228, no. 5270, p. 424, 1970.
- [237] C. A. Heid, J. Stevens, K. J. Livak, and P. M. Williams, "Real time quantitative pcr.," *Genome research*, vol. 6, no. 10, pp. 986–994, 1996.
- [238] M. Schena, D. Shalon, R. W. Davis, and P. O. Brown, "Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary dna microarray," *Science*, vol. 270, no. 5235, pp. 467–470, 1995.
- [239] Z. Wang, M. Gerstein, and M. Snyder, "Rna-seq: a revolutionary tool for transcriptomics," *Nature reviews genetics*, vol. 10, no. 1, p. 57, 2009.
- [240] R. Medzhitov and T. Horng, "Transcriptional control of the inflammatory response," *Nature Reviews Immunology*, vol. 9, no. 10, p. 692, 2009.
- [241] S. T. Smale and G. Natoli, "Transcriptional control of inflammatory responses," *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, vol. 6, no. 11, p. a016261, 2014.
- [242] M. S. Hayden and S. Ghosh, "Nf- κ b, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions," *Genes & development*, vol. 26, no. 3, pp. 203–234, 2012.
- [243] T. Tamura, H. Yanai, D. Savitsky, and T. Taniguchi, "The irf family transcription factors in immunity and oncogenesis," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 26, pp. 535–584, 2008.
- [244] G. R. Stark and J. E. Darnell Jr, "The jak-stat pathway at twenty," *Immunity*, vol. 36, no. 4, pp. 503–514, 2012.
- [245] E. F. Wagner and R. Eferl, "Fos/ap-1 proteins in bone and the immune system," *Immunological reviews*, vol. 208, no. 1, pp. 126–140, 2005.
- [246] B. Dieckgraefe, W. Stenson, J. Korzenik, P. Swanson, and C. Harrington, "Analysis of mucosal gene expression in inflammatory bowel disease by parallel oligonucleotide arrays," *Physiological genomics*, vol. 4, no. 1, pp. 1–11, 2000.

- [247] I. C. Lawrance, C. Fiocchi, and S. Chakravarti, “Ulcerative colitis and crohn’s disease: distinctive gene expression profiles and novel susceptibility candidate genes,” *Human Molecular Genetics*, vol. 10, no. 5, pp. 445–456, 2001.
- [248] S. Okahara, Y. Arimura, T. Yabana, K. Kobayashi, A. Gotoh, S. Motoya, A. Imamura, T. Endo, and K. Imai, “Inflammatory gene signature in ulcerative colitis with cdna macroarray analysis,” *Alimentary pharmacology & therapeutics*, vol. 21, no. 9, pp. 1091–1097, 2005.
- [249] C. M. Costello, N. Mah, R. Häsler, P. Rosenstiel, G. H. Waetzig, A. Hahn, T. Lu, Y. Gurbuz, S. Nikolaus, M. Albrecht, *et al.*, “Dissection of the inflammatory bowel disease transcriptome using genome-wide cdna microarrays,” *PLoS medicine*, vol. 2, no. 8, p. e199, 2005.
- [250] J. Román, N. Planell, J. J. Lozano, M. Aceituno, M. Esteller, C. Pontes, D. Balsa, M. Merlos, J. Panés, and A. Salas, “Evaluation of responsive gene expression as a sensitive and specific biomarker in patients with ulcerative colitis,” *Inflammatory bowel diseases*, vol. 19, no. 2, pp. 221–229, 2012.
- [251] A. M. Mowat and W. W. Agace, “Regional specialization within the intestinal immune system,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 14, no. 10, p. 667, 2014.
- [252] B. Von Lampe, B. Barthel, S. Coupland, E. Riecken, and S. Rosewicz, “Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease,” *Gut*, vol. 47, no. 1, pp. 63–73, 2000.
- [253] T. H. Mogensen, “Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses,” *Clinical microbiology reviews*, vol. 22, no. 2, pp. 240–273, 2009.
- [254] A. N. Theofilopoulos, R. Gonzalez-Quintial, B. R. Lawson, Y. T. Koh, M. E. Stern, D. H. Kono, B. Beutler, and R. Baccala, “Sensors of the innate immune system: their link to rheumatic diseases,” *Nature Reviews Rheumatology*, vol. 6, no. 3, p. 146, 2010.

- [255] M. A. McGuckin, S. K. Lindén, P. Sutton, and T. H. Florin, “Mucin dynamics and enteric pathogens,” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 9, no. 4, p. 265, 2011.
- [256] M. F. Kagnoff, “The intestinal epithelium is an integral component of a communications network,” *The Journal of clinical investigation*, vol. 124, no. 7, pp. 2841–2843, 2014.
- [257] R. Medzhitov, “Toll-like receptors and innate immunity,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 1, no. 2, p. 135, 2001.
- [258] K. Nothelfer, P. J. Sansonetti, and A. Phalipon, “Pathogen manipulation of b cells: the best defence is a good offence,” *Nature reviews Microbiology*, vol. 13, no. 3, p. 173, 2015.
- [259] P. Nesargikar, B. Spiller, and R. Chavez, “The complement system: history, pathways, cascade and inhibitors,” *European Journal of Microbiology and Immunology*, vol. 2, no. 2, pp. 103–111, 2012.
- [260] J. Panés, M. Peñalva, and J. Piqué, “New therapeutic targets in inflammatory bowel disease (ibd): cell adhesion molecules,” *Inmunología*, vol. 22, pp. 1–12, 2003.
- [261] R. F. Leal and A. Salas, “Adhesion molecules as a therapeutic target in ibd,” *EMJ Gastroenterol*, vol. 1, pp. 62–73, 2013.
- [262] I. Arijs, G. De Hertogh, K. Machiels, K. Van Steen, K. Lemaire, A. Schraenen, L. Van Lommel, R. Quintens, G. Van Assche, S. Vermeire, *et al.*, “Mucosal gene expression of cell adhesion molecules, chemokines, and chemokine receptors in patients with inflammatory bowel disease before and after infliximab treatment,” *The American journal of gastroenterology*, vol. 106, no. 4, p. 748, 2011.
- [263] I. Arijs, G. De Hertogh, K. Lemaire, R. Quintens, L. Van Lommel, K. Van Steen, P. Leemans, I. Cleynen, G. Van Assche, S. Vermeire, *et al.*, “Mucosal gene expression of antimicrobial peptides in inflammatory bowel disease before and after first infliximab treatment,” *PloS one*, vol. 4, no. 11, p. e7984, 2009.

- [264] A. U. Dignass, “Mechanisms and modulation of intestinal epithelial repair,” *Inflammatory bowel diseases*, vol. 7, no. 1, pp. 68–77, 2001.
- [265] A. U. Dignass and D. K. Podolsky, “Cytokine modulation of intestinal epithelial cell restitution: central role of transforming growth factor β ,” *Gastroenterology*, vol. 105, no. 5, pp. 1323–1332, 1993.
- [266] A. Dignass, K. Lynch-Devaney, H. Kindon, L. Thim, and D. K. Podolsky, “Trefol peptides promote epithelial migration through a transforming growth factor beta-independent pathway,” *The Journal of clinical investigation*, vol. 94, no. 1, pp. 376–383, 1994.
- [267] D. Paclik, K. Lohse, B. Wiedenmann, A. U. Dignass, and A. Sturm, “Galectin-2 and-4, but not galectin-1, promote intestinal epithelial wound healing in vitro through a tgf-beta-independent mechanism,” *Inflammatory bowel diseases*, vol. 14, no. 10, pp. 1366–1372, 2008.
- [268] R. Okamoto and M. Watanabe, “Molecular and clinical basis for the regeneration of human gastrointestinal epithelia,” *Journal of gastroenterology*, vol. 39, no. 1, pp. 1–6, 2004.
- [269] M. Iizuka and S. Konno, “Wound healing of intestinal epithelial cells,” *World journal of gastroenterology: WJG*, vol. 17, no. 17, p. 2161, 2011.
- [270] F. Pallone and G. Monteleone, “Mechanisms of tissue damage in inflammatory bowel disease,” *Current opinion in gastroenterology*, vol. 17, no. 4, pp. 307–312, 2001.
- [271] M. J. Waldner and M. F. Neurath, “Mechanisms of immune signaling in colitis-associated cancer,” *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, vol. 1, no. 1, pp. 6–16, 2015.
- [272] S. Gilbert, H. Nivarthi, C. N. Mayhew, Y.-H. Lo, T. K. Noah, J. Vallance, T. Rüllicke, M. Müller, A. G. Jegga, W. Tang, *et al.*, “Activated stat5 confers resistance to intestinal injury by increasing intestinal stem cell proliferation and regeneration,” *Stem Cell Reports*, vol. 4, no. 2, pp. 209–225, 2015.
- [273] L. J. Egan, A. de Lecea, E. D. Lehrman, G. M. Myhre, L. Eckmann, and M. F. Kagnoff, “Nuclear factor- κ b activation promotes restitution of woun-

- ded intestinal epithelial monolayers,” *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 285, no. 5, pp. C1028–C1035, 2003.
- [274] A. Mizoguchi, “Healing of intestinal inflammation by il-22,” *Inflammatory bowel diseases*, vol. 18, no. 9, pp. 1777–1784, 2012.
- [275] H. Miyoshi, R. Ajima, C. T. Luo, T. P. Yamaguchi, and T. S. Stappenbeck, “Wnt5a potentiates $\text{tgf-}\beta$ signaling to promote colonic crypt regeneration after tissue injury,” *Science*, vol. 338, no. 6103, pp. 108–113, 2012.
- [276] H. Miyoshi, K. L. VanDussen, N. P. Malvin, S. H. Ryu, Y. Wang, N. M. Sonnek, C.-W. Lai, and T. S. Stappenbeck, “Prostaglandin e2 promotes intestinal repair through an adaptive cellular response of the epithelium,” *The EMBO journal*, p. e201694660, 2016.
- [277] B. M. Gumbiner and N.-G. Kim, “The hippo-yap signaling pathway and contact inhibition of growth,” *J Cell Sci*, vol. 127, no. 4, pp. 709–717, 2014.
- [278] R. Okamoto, K. Tsuchiya, Y. Nemoto, J. Akiyama, T. Nakamura, T. Kanai, and M. Watanabe, “Requirement of notch activation during regeneration of the intestinal epithelia,” *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 296, no. 1, pp. G23–G35, 2009.
- [279] K. Taniguchi, L.-W. Wu, S. I. Grivennikov, P. R. De Jong, I. Lian, F.-X. Yu, K. Wang, S. B. Ho, B. S. Boland, J. T. Chang, *et al.*, “A gp130–src–yap module links inflammation to epithelial regeneration,” *Nature*, vol. 519, no. 7541, p. 57, 2015.
- [280] E. Martini, S. M. Krug, B. Siegmund, M. F. Neurath, and C. Becker, “Mend your fences: the epithelial barrier and its relationship with mucosal immunity in inflammatory bowel disease,” *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, vol. 4, no. 1, pp. 33–46, 2017.
- [281] M. Romano, F. De Francesco, L. Zarantonello, C. Ruffolo, G. A. Ferraro, G. Zanusi, A. Giordano, N. Bassi, and U. Cillo, “From inflammation to cancer in inflammatory bowel disease: molecular perspectives,” *Anticancer research*, vol. 36, no. 4, pp. 1447–1460, 2016.

- [282] C. Luo and H. Zhang, “The role of proinflammatory pathways in the pathogenesis of colitis-associated colorectal cancer,” *Mediators of Inflammation*, vol. 2017, 2017.
- [283] M. Karin and F. R. Greten, “Nf- κ b: linking inflammation and immunity to cancer development and progression,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 5, no. 10, p. 749, 2005.
- [284] Y.-C. Chung and Y.-F. Chang, “Serum interleukin-6 levels reflect the disease status of colorectal cancer,” *Journal of surgical oncology*, vol. 83, no. 4, pp. 222–226, 2003.
- [285] S. Grivennikov, E. Karin, J. Terzic, D. Mucida, G.-Y. Yu, S. Vallabhapurapu, J. Scheller, S. Rose-John, H. Cheroutre, L. Eckmann, *et al.*, “Il-6 and stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer,” *Cancer cell*, vol. 15, no. 2, pp. 103–113, 2009.
- [286] J. F. Colombel, P. Rutgeerts, W. Reinisch, D. Esser, Y. Wang, Y. Lang, C. W. Marano, R. Strauss, B. J. Oddens, B. G. Feagan, *et al.*, “Early mucosal healing with infliximab is associated with improved long-term clinical outcomes in ulcerative colitis,” *Gastroenterology*, vol. 141, no. 4, pp. 1194–1201, 2011.
- [287] R. Bryant, S. Winer, S. Travis, and R. Riddell, “Systematic review: Histological remission in inflammatory bowel disease. is ‘complete’ remission the new treatment paradigm? an ioibd initiative,” *Journal of Crohn’s and Colitis*, vol. 8, no. 12, pp. 1582–1597, 2014.
- [288] M. F. Neurath, “Cytokines in inflammatory bowel disease,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 14, no. 5, p. 329, 2014.
- [289] J. Eaden, K. Abrams, and J. Mayberry, “The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis,” *Gut*, vol. 48, no. 4, pp. 526–535, 2001.
- [290] M. D. Rutter, B. P. Saunders, K. H. Wilkinson, S. Rumbles, G. Schofield, M. A. Kamm, C. B. Williams, A. B. Price, I. C. Talbot, and A. Forbes, “Thirty-year analysis of a colonoscopic surveillance program for neoplasia in ulcerative colitis,” *Gastroenterology*, vol. 130, no. 4, pp. 1030–1038, 2006.

- [291] L. Rosenberg, G. O. Lawlor, T. Zenlea, J. D. Goldsmith, A. Gifford, K. R. Falchuk, J. L. Wolf, A. S. Cheifetz, S. C. Robson, and A. C. Moss, "Predictors of endoscopic inflammation in patients with ulcerative colitis in clinical remission," *Inflammatory bowel diseases*, vol. 19, no. 4, pp. 779–784, 2013.
- [292] R. W. Stidham and P. D. Higgins, "Value of mucosal assessment and biomarkers in inflammatory bowel disease," *Expert review of gastroenterology & hepatology*, vol. 4, no. 3, pp. 285–291, 2010.
- [293] G. D'haens, M. Ferrante, S. Vermeire, F. Baert, M. Noman, L. Moortgat, P. Geens, D. Iwens, I. Aerden, G. Van Assche, *et al.*, "Fecal calprotectin is a surrogate marker for endoscopic lesions in inflammatory bowel disease," *Inflammatory bowel diseases*, vol. 18, no. 12, pp. 2218–2224, 2012.
- [294] F. Wu, T. Dassopoulos, L. Cope, A. Maitra, S. R. Brant, M. L. Harris, T. M. Bayless, G. Parmigiani, and S. Chakravarti, "Genome-wide gene expression differences in crohn's disease and ulcerative colitis from endoscopic pinch biopsies: insights into distinctive pathogenesis," *Inflammatory bowel diseases*, vol. 13, no. 7, pp. 807–821, 2007.
- [295] J. T. Bjerrum, M. Hansen, J. Olsen, and O. H. Nielsen, "Genome-wide gene expression analysis of mucosal colonic biopsies and isolated colonocytes suggests a continuous inflammatory state in the lamina propria of patients with quiescent ulcerative colitis," *Inflammatory bowel diseases*, vol. 16, no. 6, pp. 999–1007, 2009.
- [296] M. Kämäräinen, K. Heiskala, S. Knuutila, M. Heiskala, O. Winqvist, and L. C. Andersson, "Relp, a novel human reg-like protein with up-regulated expression in inflammatory and metaplastic gastrointestinal mucosa," *The American journal of pathology*, vol. 163, no. 1, pp. 11–20, 2003.
- [297] N. Oue, H. Kuniyasu, T. Noguchi, K. Sentani, M. Ito, S. Tanaka, T. Setoyama, C. Sakakura, S. Natsugoe, and W. Yasui, "Serum concentration of reg iv in patients with colorectal cancer: overexpression and high serum levels of reg iv are associated with liver metastasis," *Oncology*, vol. 72, no. 5-6, pp. 371–380, 2007.
- [298] O. K. Glebov, L. M. Rodriguez, P. Soballe, J. DeNobile, J. Cliatt, K. Nakahara, and I. R. Kirsch, "Gene expression patterns distinguish colonosco-

- pically isolated human aberrant crypt foci from normal colonic mucosa,” *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, vol. 15, no. 11, pp. 2253–2262, 2006.
- [299] K. Birkenkamp-Demtroder, S. H. Olesen, F. B. Sørensen, S. Laurberg, P. Laiho, L. A. Aaltonen, and T. F. Ørntoft, “Differential gene expression in colon cancer of the caecum versus the sigmoid and rectosigmoid,” *Gut*, vol. 54, no. 3, pp. 374–384, 2005.
- [300] M. K. Fuentes, S. S. Nigavekar, T. Arumugam, C. D. Logsdon, A. M. Schmidt, J. C. Park, and E. H. Huang, “Rage activation by s100p in colon cancer stimulates growth, migration, and cell signaling pathways,” *Diseases of the colon & rectum*, vol. 50, no. 8, pp. 1230–1240, 2007.
- [301] D. Lambert, I. Wood, A. Ellis, and S. Shirazi-Beechey, “Molecular changes in the expression of human colonic nutrient transporters during the transition from normality to malignancy,” *British journal of cancer*, vol. 86, no. 8, p. 1262, 2002.
- [302] P. Hindryckx, F. Baert, A. Hart, F. Magro, A. Armuzzi, L. Peyrin-Biroulet, C. T. C. C. of the European Crohn’s, and C. O. (ECCO), “Clinical trials in ulcerative colitis: a historical perspective,” *Journal of Crohn’s and Colitis*, vol. 9, no. 7, pp. 580–588, 2015.
- [303] C. Su, J. D. Lewis, B. Goldberg, C. Brensinger, and G. R. Lichtenstein, “A meta-analysis of the placebo rates of remission and response in clinical trials of active ulcerative colitis,” *Gastroenterology*, vol. 132, no. 2, pp. 516–526, 2007.
- [304] D. Foell, T. Kucharzik, M. Kraft, T. Vogl, C. Sorg, W. Domschke, and J. Roth, “Neutrophil derived human s100a12 (en-rage) is strongly expressed during chronic active inflammatory bowel disease,” *Gut*, vol. 52, no. 6, pp. 847–853, 2003.
- [305] T. Kaiser, J. Langhorst, H. Wittkowski, K. Becker, A. W. Friedrich, A. Ruffer, G. J. Dobos, J. Roth, and D. Foell, “Faecal s100a12 as a non-invasive marker distinguishing inflammatory bowel disease from irritable bowel syndrome,” *Gut*, vol. 56, no. 12, pp. 1706–1713, 2007.

- [306] I. K. Quaye, “Haptoglobin, inflammation and disease,” *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene*, vol. 102, no. 8, pp. 735–742, 2008.
- [307] K. Theilgaard-Mönch, L. C. Jacobsen, M. J. Nielsen, T. Rasmussen, L. Udby, M. Gharib, P. D. Arkwright, A. F. Gombart, J. Calafat, S. K. Moestrup, *et al.*, “Haptoglobin is synthesized during granulocyte differentiation, stored in specific granules, and released by neutrophils in response to activation,” *Blood*, vol. 108, no. 1, pp. 353–361, 2006.
- [308] L. Peyrin-Biroulet, J. Panés, W. J. Sandborn, S. Vermeire, S. Danese, B. G. Feagan, J.-F. Colombel, S. B. Hanauer, and B. Rycroft, “Defining disease severity in inflammatory bowel diseases: current and future directions,” *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, vol. 14, no. 3, pp. 348–354, 2016.