

Imuno-histoquímica na avaliação das doenças inflamatórias intestinais (DII)

Immunohistochemistry in the assessment of Inflammatory bowel disease (IBD)

Maria Thereza Carvalho Rodriguez Guisande¹; Maria Eduarda dos Santos Tavares de Lira¹; Luciano de Figueiredo Borges²; Jarbas Sampaio Filho³; Hugo Perazzo Pedroso Barbosa³; Pedro Pereira Tenório¹.

RESUMO

Introdução: As doenças inflamatórias intestinais (DII), doença de Crohn e da retocolite ulcerativa, são desordens crônicas de etiologia idiopática cujo diagnóstico histopatológico é dado por meio de diversos marcadores imuno-histoquímicos, já que tais doenças algumas vezes podem ser de difícil diferenciação clínica. Estes marcadores imuno-histoquímicos também podem ser utilizados para auxiliar em certos casos na determinação de diagnósticos diferenciais. **Objetivo:** revisar os mais recentes ensaios clínicos publicados que se utilizaram da imuno-histoquímica para a avaliação de marcadores úteis no diagnóstico, tratamento e acompanhamento de doenças inflamatórias intestinais da doença de Crohn e da retocolite ulcerativa. **Métodos:** Realizou-se uma revisão integrativa dos trabalhos publicados entre 2014 e 2017 presentes nas bases de dados PubMed/MEDLINE e Cochrane Library, a partir da busca pelos descritores "Inflammatory bowel disease" AND "immunohistochemistry". O estudo foi feito com base em 19 trabalhos de uma amostra de 20 estudos selecionados, um artigo foi excluído por não encaixar no escopo do trabalho. **Resultados:** Os resultados evidenciaram que a metaloproteinase (MMP-9) e calprotectina fecal são marcadores úteis para o diagnóstico das doenças inflamatórias intestinais. Além disso, as quantificações do fator de necrose tumoral (TNF), interleucina (IL-6) e Anti-TNF se mostraram úteis para o acompanhamento de pacientes da doença de Crohn e da retocolite ulcerativa, principalmente na verificação de melhora ou piora do quadro clínico após a instituição de terapia farmacológica. **Conclusão:** Concluiu-se que a imuno-histoquímica é uma metodologia bastante promissora para o acompanhamento clínico da doença de Crohn e da retocolite ulcerativa. Contudo, é necessário o desenvolvimento de mais pesquisas que visem a descobertas de outros marcadores que contribuam para o cuidado destas doenças.

Palavras-chave: Doenças crônicas intestinais; Imuno-Histoquímica; Marcadores imuno-histoquímicos; Doenças intestinais; Doença de Crohn; Retocolite ulcerativa.

ABSTRACT

Introduction: Inflammatory bowel diseases (IBD), Crohn's disease and ulcerative rectocolitis, are chronic disorders with idiopathic aetiology which histopathologic diagnosis is given by immunohistochemical markers, since these diseases can be difficult to differentiate clinically. Immunohistochemical markers can also be used to assist in some cases, determining differential diagnoses. **Objective:** to review the most recent published clinical reviews using immunochemistry to analyse useful markers for the diagnosis, treatment, and follow up of the inflammatory bowel diseases, Crohn's disease and ulcerative rectocolitis. **Methods:** An integrative bibliographic review was performed for articles published between 2014 and 2017 available on the PubMed/MEDLINE and Cochrane library databases. The searched terms were "inflammatory bowel disease" AND "immunohistochemistry". The present study was based on 19 articles from 20 selected studies, one article was deleted because it did not fit the scope of work. **Results:** The results showed that metalloproteinases MMP-9 and faecal calprotectin are useful markers for the diagnosis of inflammatory bowel diseases. Furthermore, the quantification of tumor necrosis factor (TNF), interleucina (IL-6) and Anti-TNF also were useful on the follow up of Crohn's disease and ulcerative rectocolitis; especially to analyse worsening and improvement of the clinical condition after starting the pharmacological therapy. **Conclusion:** From the review of the selected studies, it can be concluded that immunochemistry is a very promising methodology to analyse the IBD, Crohn's disease and ulcerative rectocolitis. However, further research to discover other markers and to contribute to the care of these patients should be encouraged.

Keywords: Chronic bowel diseases; Immunohistochemistry; Immunohistochemical markers; Bowel diseases; Crohn Disease; Ulcerative colitis.

Contribuição dos autores:

MTCRG coleta, tabulação, delineamento do estudo, discussão dos achados e redação do manuscrito; MESTL discussão dos achados e redação do manuscrito; LFB elaboração do manuscrito; JSF elaboração do manuscrito; HPPB elaboração do manuscrito; PPT orientação do projeto, delineamento do estudo e elaboração do manuscrito.

Contato para correspondência:

Maria Eduarda Lira

E-mail:

eduardatlira@outlook.com

Conflito de interesses:

Não há

Financiamento:

Não há

Recebido:

06/03/2019

Aprovado: 11/11/2019



INTRODUÇÃO

Retocolite ulcerativa (RCU) e doença de Crohn (DC) são doenças inflamatórias intestinais (DII) de etiologia multifatorial idiopática, caracterizada pela inflamação crônica do trato gastrointestinal (TGI). O diagnóstico é realizado através da constatação de vários fatores, a retocolite ulcerativa é atualmente diagnosticada pela presença de diarreia por mais de 4 semanas

atrelado à presença de inflamação ativa na endoscopia e a alterações crônicas pela biopsia quando outros possíveis diagnósticos foram excluídos¹. A doença de Crohn é também diagnosticada por uma junção de fatores e exclusão de diagnósticos diferenciais. Uma análise útil na suspeita de doença de Crohn é a avaliação do íleo terminal, que pode estar acometido nessa doença².

O diagnóstico diferencial entre RCU e DC pode ser realizado pela avaliação clínica e pelos aspectos endoscópicos distintos, como localização de acometimento e profundidade das camadas comprometidas do tubo digestório. Porém, em alguns casos, o diagnóstico diferencial pode ser dificultado por apresentações atípicas. Além disso, a padronização de técnicas para diagnóstico e o acompanhamento destas enfermidades ainda representam um grande desafio no âmbito da saúde, já que muitos elementos que compõe a história natural destas doenças ainda permanecem desconhecidos³⁻⁴. O tratamento de ambas doenças com anticorpos monoclonais, como o fármaco adalimumabe, e proteínas de fusão vem diminuindo a atenção de drogas já bem estabelecidas. Contudo, as terapias convencionais ainda persistem, como o uso do Ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) e o Metotrexato⁵. Há ainda os probióticos que, comprovadamente, reduzem a severidade da inflamação e podem manter a remissão nas DII⁶.

Em relação a tais desordens, destacam-se algumas alterações genéticas associadas à modulação inflamatória do tecido linfóide associado ao intestino (tecido linfóide associado ao intestino-GALT). Os polimorfismos gênicos, neste sentido, vêm sendo atribuídos às mais variadas etapas da inflamação observada nas DII, desde o reconhecimento de antígenos (gene NOD2) até a regulação e contrarregulação da resposta adaptativa (genes STAT3, JAK2, RIL-10, RIL-23 e RIL-6.). A partir disto, segue uma grande orquestra de eventos imunológicos que se apresentam de maneira anormal, gerando a quebra do mecanismo fisiológico da tolerância oral, de forma que os mediadores da inflamação se tornam desproporcionalmente reativos aos estímulos antigênicos (exógenos ou endógenos da microbiota)⁷⁻⁸.

Constata-se então que estas DII, Retocolite ulcerativa e doença de Crohn, representam um ótimo campo para a exploração molecular e imunológica na esfera de suas respectivas fisiopatologias. A imunohistoquímica, pode ser uma ferramenta útil na identificação de potenciais marcadores para o diagnóstico e o acompanhamento dos pacientes acometidos por DII. Esta técnica envolve a identificação de antígenos a partir de anticorpos seletivos. A imunohistoquímica, então, se torna uma via de investigação bastante viável, capaz de elucidar a presença, qualitativa e quantitativa, de marcadores testados para determinada afecção⁹. Apesar disto, pouco destes marcadores tem sido verdadeiramente explorado, tanto no diagnóstico diferencial entre as duas doenças inflamatórias, quanto no acompanhamento dos indivíduos acometidos por elas.

Estudos recentes destacaram variadas tecnologias previstas nos consensos internacionais para o diagnóstico e acompanhamento destas DII, com grau de recomendação e validade científicas testadas e comprovadas. Porém, ainda há bastantes limitações como, escores clínicos com quesitos subjetivos, exames laboratoriais e de imagens com baixa especificidade, endoscopias/ colonoscopias com usos limitados, dentre outros¹⁴⁻¹⁵. A evidência de componentes inflamatórios da doença e métodos imunohistoquímicos para identificá-los representa uma saída a estas limitações, visto que, apesar de nem sempre expressarem um padrão clínico detectável, ambas as doenças invariavelmente consistem em eventos inflamatórios que podem ser aferidos por meio dos seus marcadores. A partir disto, o cuidado aos pacientes com DII poderá ser mais efetivo. O presente estudo, portanto, consiste em uma revisão dos mais recentes ensaios clínicos publicados que se utilizaram da imunohistoquímica para a avaliação de marcadores úteis no diagnóstico, acompanhamento e resposta ao tratamento das DII.

MÉTODOS

Tratou-se de uma revisão integrativa da literatura. A estratégia de busca foi realizada nas bases de dados PubMed/MEDLINE e Cochrane Library, através dos descritores (MeSH) "inflammatory bowel disease" AND "immunohistochemistry". As datas de publicação foram delimitadas de janeiro de 2014 a maio de 2017 e os tipos de trabalhos pesquisados foram restringidos a ensaios clínicos na língua inglesa. Os estudos incluídos foram aqueles que abordaram as doenças inflamatórias intestinais a partir dos marcadores imuno-histoquímicos característicos dessas condições, como o MMP-9 e a calprotectina. Tal estratégia levou a 20 resultados, sendo um deles descartado pelo enfoque dado ao manejo terapêutico da neuralgia pós-herpética, o que desvirtua dos objetivos desta pesquisa.

RESULTADOS

A partir da metodologia descrita, 19 trabalhos foram analisados e seus respectivos resultados seguem esquematizados no **Quadro 1** (arquivo suplementar 1). Encontra-se, de forma geral e de acordo com os trabalhos estudados, os principais usos dos biomarcadores na DII na **Figura 1**.

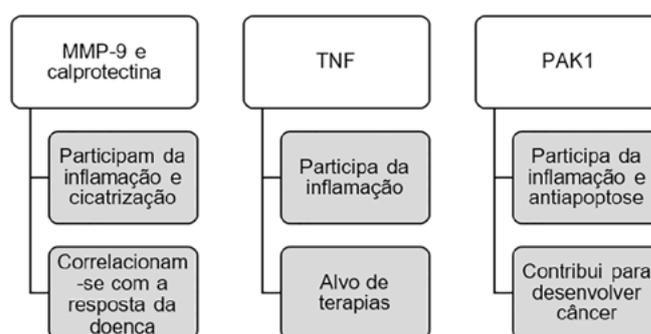


Figura 1. Principais biomarcadores analisados

DISCUSSÃO

Uma ferramenta importantíssima usada na identificação dos biomarcadores das doenças inflamatórias intestinais é o estudo imunohistoquímico, que pode identificar uma proteína alvo. A depender do método adotado, esta reação de identificação do antígeno (proteína alvo ou marcador tecidual) poderá envolver apenas anticorpos primários (método direto), como também a presença de um segundo tipo de anticorpo (método indireto) que, em vez de se ligar diretamente ao antígeno, se ligará aos anticorpos primários. Independentemente do método adotado, a formação da coloração diferenciada no tecido marcado ocorrerá a partir da presença de cromóforos associados a um ou a outro anticorpo, primário ou secundário, a depender do método.

Na esfera da fisiopatologia, os marcadores MMP-9 e calprotectina são derivados predominantemente dos neutrófilos e parecem participar, além da inflamação, do processo de cicatrização da mucosa intestinal. Estudos já indicam que há boa correlação de ambos os marcadores com a resposta clínica, endoscópica e histológica da doença²¹. Mais que isso, os marcadores fecais parecem ter mais associação com as DII do que os laboratoriais, comumente adotados³¹. De forma complementar, os testes ELISA pesquisados por Mirsepasi-Lauridsen et al. (2016)²² são muito úteis na identificação de calprotectina fecal. Superando os caminhos em vigência, esses testes guardam boa sensibilidade para detecção de componentes que podem fornecer o diagnóstico de forma menos dispendiosa para os pacientes do que a ileocolonosopia. Importante indicar, ainda, o marcador citoqueratina CK7 que pode ser analisado

concomitantemente aos marcadores anteriormente citados. A citoqueratina CK7 é uma proteína importante que muitas vezes esteve associada com a tumorigênese e progressão da inflamação em pacientes com DII, portanto é útil também para marcar a severidade da inflamação da DII⁸.

Ademais, a expressão do gene VNN1, a partir da detecção da sua proteína correspondente Vanin-1, também foi investigada quanto à detecção das DII. Polimorfismos que acabam interferindo no Vanin-1 podem causar importante quebra da homeostase da mucosa intestinal por meio da desregulação da glutatona e da ativação de proliferadores de peroxissoma tipo gama (PPAR γ) (ambos envolvidos na tolerância do epitélio intestinal e no desencadeamento da inflamação)²⁹. Apesar de suas repercussões, essa análise genética ainda é pouco utilizada na prática, devido a sua participação sempre incompleta no desencadeamento das DII.

Uma das principais linhas do tratamento das DII, é o infliximab, um potente inibidor de TNF, administrado por via parenteral. Uma das desvantagens desta administração é que o inibidor se dissemina de forma sistêmica, antes de atingir o seu alvo terapêutico: a mucosa intestinal. Já drogas que apresentam potencial semelhante, como o AVX-470, mas que apresentam via de administração oral, mostram-se superiores por possuírem ação direta sobre a mucosa^{13,14}. Apesar disto, tratamentos com anti-TNF podem não dar resultados em cerca de 50% dos casos³². Desta forma, verificar a quantidade de TNF nas membranas celulares do epitélio da mucosa, predizendo a resposta terapêutica antes da instituição do tratamento, poderiam evitar exposição medicamentosa desnecessária, melhorando aspectos de segurança e efetividade¹⁹.

Além disso, a falta de resposta ao tratamento com anti-TNF pode indicar que existam outros mediadores da inflamação em diferentes fenótipos da doença. Por isso, a análise de outros alvos-terapêuticos é imprescindível para o tratamento. O PAK1 é uma proteína envolvida na fisiopatologia das DII e que, além de contribuir na regulação inflamatória do TNF, tem efeitos anti-apoptóticos relacionados ao desenvolvimento de câncer – uma evolução relativamente frequente, principalmente em pacientes com RCU²⁶.

Uma das pesquisas também verificou que pacientes que apresentam altos níveis séricos de infliximab e ausência de resposta com a intensificação do tratamento, possivelmente expressam um fenótipo não TNF para as doenças³³. Diante desta evidência, o trabalho de Steenholdt et al. (2014)¹⁷ concluiu que a IL-6 seria a citocina central alternativa no processo inflamatório. Outro estudo evidenciou boa resposta dos pacientes com falta de resposta aos anti-TNF ao tratamento com anticorpos anti-IL-6³⁴.

Já aqueles pacientes que apresentam baixos níveis séricos de infliximab, possivelmente estão sofrendo com a depuração da droga por meio de úlceras ativas¹⁷. Assim, infliximab fecal passa a ser não só um marcador de falha terapêutica, como também um indicador da atividade da doença³⁵.

Na busca pelos marcadores que evidenciassem melhora ou piora das DII, um dos destaques foi complexo NGAL-MMP-9¹⁶. Este complexo participa do dano ao tecido na inflamação intestinal e sugere-se, a partir de hipóteses, que o NGAL protege o MMP-9 da autodegradação. O MMP-9 se comporta de modo semelhante à calprotectina fecal nas DII – ambos indicadores de inflamação ativa³⁶.

Outros importantes marcadores estudados foram os anticorpos anti-CuzD1 e anti-Gp2 (anticorpos antipancreáticos). Apesar de parecer distante a relação de ambos com as DII, CuzD1 e Gp2 estão

envolvidos na imunidade adaptativa e podem coordenar a tolerância do trato gastrointestinal a outros antígenos³⁷. São devido a tais funções que estes anticorpos estão relacionados com as complicações nas doenças²⁸. Tais complicações surgem, em geral, à medida que a doença progride junto à inflamação. Um dos indicadores desta progressão é o DUBA, componente capaz de regular positivamente citocinas inflamatórias como a IL-17 e o INF- γ ²⁷.

CONCLUSÃO

Como exposto, a diferenciação clínica da doença de Crohn e da retocolite ulcerativa é difícil e a necessidade de estudos histopatológicos por meio de marcadores imuno-histoquímicos torna-se imperativo em muitos casos.

O estudo dos marcadores através da técnica de imuno-histoquímica pode ser considerado como um grande auxílio no manejo das doenças inflamatórias intestinais no que tange ao diagnóstico, tratamento e acompanhamento. Contudo, destaca-se a escassez de estudos nesse contexto e, desta forma, é necessário o desenvolvimento de mais ensaios clínicos a fim de se criar uma padronização para o uso desta técnica na rotina clínica.

REFERÊNCIAS

1. Valdovinos-García R, Martínez-Vázquez M. Diagnostic approach to inflammatory bowel disease. *IBD Reviews*. 2018;4:30-8.
2. Wehkamp J, Götz M, Herrlinger K, Steurer W, Stange EF. Inflammatory bowel disease: crohn's disease and ulcerative colitis. *Dtsch Arztebl Int*. 2016;113:72-82. DOI: 10.3238/arztebl.2016.0072
3. Ko J, Auyeung K. Inflammatory bowel disease: etiology, pathogenesis and current therapy. *Curr Pharm Des*. 2014;20(7):1082-96. DOI: 10.2174/13816128113199990416
4. Hanauer, S B. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm Bowel Dis*. 2006;12(5):S3-S9. DOI: 10.1097/01.mib.0000195385.19268.68
5. Su HJ, Chiu YT, Chiu CT, Lin YC, Wang CY, Hsieh JY, et al. Inflammatory bowel disease and its treatment in 2018: Global and Taiwanese status updates. *J Formos Med Assoc*. 2019;118(7):1083-92. doi: 10.1016/j.jfma.2018.07.005
6. Mikov MM, Stojančević MP, Bojić GM. Probiotics as a promising treatment for inflammatory bowel disease. *Hospl Pharmacol*. 2014;1(1):52-60. DOI: 10.5937/hpimj1401052M
7. Khor B, Gardet A, Xavier R J. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2011;474(7351):307-17. doi: 10.1038/nature10209
8. 1. Xie H, Xiao S, Pai R, Jiang W, Shadrach B, Carver P, et al. Diagnostic utility of TP53 and cytokeratin 7 immunohistochemistry in idiopathic inflammatory bowel disease-associated neoplasia. *Mod Pathol*. 2013;27(2):303-13. doi: 10.1038/modpathol.2013.133
9. Dabbs D J. *Diagnostic Immunohistochemistry [livro eletrônico]*. Elsevier Health Sciences, 2013 [acesso em ano Mes dia]. Disponível em: ???
10. Gomollón F, Dignass A, Annesse V, Tilg H, Gert Van Assche GV, Lindsay JO, et al. 3rd European Evidence-based Consensus on the diagnosis and management of crohn's disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management. *J Crohns Colitis* 2017;11(1):3-25. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjw168>
11. Magro F, Gionchetti P, Eliakim R, Ardizzone S, Armuzzi A, Barreiro-de Acosta M, et al. Third European Evidence-based Consensus on diagnosis and management of ulcerative colitis. Part 1: Definitions, Diagnosis, extra-intestinal manifestations, pregnancy, cancer surveillance, surgery, and ileo-anal pouch disorders. *J Crohns Colitis*. 2017;11(6):649-70. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjx008>
12. Hartman D, Lemos B, Erlich E, Patel R, Kim S, Tracey D, et al. P-103 modulation of inflammatory and disease biomarkers following 4 week treatment with AVX-470, an Oral Anti-TNF Antibody, in ulcerative colitis patients. *Inflamm Bowel Dis*. 2014;20(Supl1):S69-S70. <https://doi.org/10.1097/01.MIB.0000456856.72564.82>
13. Hartman DS, Tracey DE, Lemos BR, Erlich EC, Burton RE, Keane DM, et al. Effects of AVX-470, an oral, locally acting anti-tumour necrosis factor antibody, on tissue biomarkers in patients with active ulcerative colitis. *J Crohns Colitis*. 2016;10(6):641-9. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjw026
14. Atreya R, Neumann H, Neufert C, Waldner MJ, Billmeier U, Zopf Y, et al. In vivo imaging using fluorescent antibodies to tumor necrosis factor predicts therapeutic response in Crohn's disease. *Nat Med*. 2014;20(3):313-8. doi: 10.1038/nm.3462
15. Steenholdt C, Coskun M, Buhl S, Bendtzen K, Ainsworth MA, Brynskov, J et al. Circulating cytokines and cytokine receptors in infliximab treatment failure due to TNF- α independent crohn disease. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(16):e3417. doi: 10.1097/MD.0000000000003417
16. Brandse JF, Van den Brink GR, Wildenberg ME, Van der Kleij D, Rispens T, Jansen JM, et al. Loss of infliximab into feces is associated with lack of response to therapy in patients with severe ulcerative colitis. *Gastroenterol*. 2015;149(2):350-5.e2. doi: 10.1053/j.gastro.2015.04.016

17. Steenholdt C, Bendtzen K, Brynskov J, Thomsen O, Ainsworth MA. Clinical implications of measuring drug and anti-drug antibodies by different assays when optimizing infliximab treatment failure in Crohn's disease: post hoc analysis of a randomized controlled trial. *Am J Gastroenterol*. 2014;109(7):1055-64. doi: 10.1038/ajg.2014.106
18. Bruyn M, Machiels K, Vandooren J, Lemmens B, Van Lommel L, Breynaert C, et al. Infliximab restores the dysfunctional matrix remodeling protein and growth factor gene expression in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2014;20(2):339-52. doi: 10.1097/01.MIB.0000438430.15553.90
19. Bruyn M, Arijis I, De Hertogh G, Ferrante M, Van Assche G, Rutgeerts P, et al. Serum neutrophil gelatinase B-associated lipocalin and matrix metalloproteinase-9 complex as a surrogate marker for mucosal healing in patients with Crohn's disease. *J Crohns Colitis*. 2015;9(12):1079-87. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjv148
20. Farkas K, Saródi Z, Bálint A, Földesi I, Tiszlavicz L, Szűcs M, et al. The diagnostic value of a new fecal marker, matrix metalloproteinase-9, in different types of inflammatory bowel diseases. *J Crohns Colitis*. 2015;9(3):231-7. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjv005>
21. Molander P, Färkkilä M, Ristimäki A, Salminen K, Kempainen H, Blomster T, et al. Does fecal calprotectin predict short-term relapse after stopping TNF α -blocking agents in inflammatory bowel disease patients in deep remission? *J Crohns Colitis*. 2015;9(1):33-40. doi: 10.1016/j.crohns.2014.06.012
22. Mirsepasi-Lauridsen HC, Bachmann Holmetoft U, Ingdam Halkjær S, Angeliki Krogfelt K, Munk Petersen A. Comparison of three commercial fecal calprotectin ELISA test kits used in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2016;51(2):211-7. doi: 10.3109/00365521.2015.1081399
23. Vinding KK, Elsberg H, Thorkilgaard T, Belard E, Pedersen N, Elkjaer M, et al. Fecal calprotectin measured by patients at home using smartphones—a new clinical tool in monitoring patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2016;22(2):336-44. doi: 10.1097/MIB.0000000000000619
24. Franzè E, Marafini I, De Simone V, Monteleone I, Caprioli F, Colantoni A, et al. Interleukin-34 induces Cc-chemokine ligand 20 in gut epithelial cells. *J Crohns Colitis*. 2016;10(1):87-94. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjv181
25. Khare V, Dammann K, Asboth M, Krnjic A, Jambrich M, Gasche C. Overexpression of PAK1 promotes cell survival in inflammatory bowel diseases and colitis-associated cancer. *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21(2):287-96. doi: 10.1097/MIB.0000000000000281
26. Dinallo V, Di Fusco D, Laudisi F, Marafini I, Monteleone I, Monteleone G. OC.02.1 high expression Of DUBA, a regulator of T cell activation, in inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis*. 2016;48(Supl2):e75. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1590-8658\(16\)30022-6](https://doi.org/10.1016/S1590-8658(16)30022-6)
27. Papp M, Sipeki N, Tornai T, Altorjay I, Norman GL, Shums Z, et al. Rediscovery of the anti-pancreatic antibodies and evaluation of their prognostic value in a prospective clinical cohort of Crohn's patients: the importance of specific target antigens (GP2 and CUZD1). *J Crohns Colitis*. 2015;9(8):659-68. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjv087
28. Gensollen T, Bourges C, Rihet P, Rostan A, Millet V, Noguchi T, et al. Functional polymorphisms in the regulatory regions of the VNN1 gene are associated with susceptibility to inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19(11):2315-25. doi: 10.1097/MIB.0b013e3182a32b03
29. Thörn M, Rorsman F, Rönnblom A, Sangfelt P, Wanders A, Eriksson BM, et al. Active cytomegalovirus infection diagnosed by real-time PCR in patients with inflammatory bowel disease: a prospective, controlled observational study. *Scand J Gastroenterol*. 2016;51(9):1075-80. doi: 10.3109/00365521.2016.1156154
30. Shang HX, Wang AQ, Bao CH, Wu HG, Chen WF, Wu LY, et al. Moxibustion combined with acupuncture increases tight junction protein expression in Crohn's disease patients. *World J Gastroenterol*. 2015;21(16):4986-96. doi: 10.3748/wjg.v21.i16.4986
31. Desai D, Faubion WA, Sandborn WJ. Review article: biological activity markers in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007;25(3):247-55. DOI: 10.1111/j.1365-2036.2006.03184.x
32. Hanauer SB, Sandborn WJ, Rutgeerts P, Fedorak RN, Lukas M, MacIntosh D, et al. Human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody (adalimumab) in Crohn's disease: the CLASSIC-I Trial. *Gastroenterol*. 2006;130(2):323-33. DOI: 10.1053/j.gastro.2005.11.030
33. Steenholdt C, Bendtzen K, Brynskov J, Thomsen O, Munck LK, Christensen LA, et al. Changes in serum trough levels of infliximab during treatment intensification but not in anti-infliximab antibody detection are associated with clinical outcomes after therapeutic failure in Crohn's disease. *J Crohn Colitis*. 2015;9(3):238-45. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjv004
34. Danese S, Vermeire S, Hellstern P, Panaccione R, Rogler G, Fraser G, et al. Results of ANDANTE, a randomised clinical study with an anti-IL6 antibody (PF-04236921) in subjects with Crohn's disease who are antitumour necrosis factor inadequate responders. *J Crohn Colitis*. 2016;10(Supl1):S12-S13. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjw019.014>
35. Kapel N, Meillet D, Favenec L, Magne D, Raichvarg D, Gobert JG, et al. Evaluation of intestinal clearance and faecal excretion of α 1-antitrypsin and immunoglobulins during Crohn's disease and ulcerative colitis. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. 1992;30(4):197-202. DOI: 10.1515/cclm.1992.30.4.197
36. Kubben FJ, Sier CF, Hawinkels LJ, Tschesche H, Van Duijn W, Zuidwijk K, et al. Clinical evidence for a protective role of lipocalin-2 against MMP-9 autodegradation and the impact for gastric cancer. *Eur J Cancer*. 2007;43(12):1869-76. DOI: 10.1016/j.ejca.2007.05.013
37. Roggenbuck D, Reinhold D, Werner L, Schierack P, Bogdanos DP, Conrad K. Glycoprotein 2 antibodies in Crohn's disease. *Adv Clin Chem*, 2013;60:187-208. DOI: 10.1016/b978-0-12-407681-5.00006-4