

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA "TOR VERGATA"

FACOLTA' DI SCIENZE

DOTTORATO DI RICERCA IN IMMUNOLOGIA

XX CICLO DEL CORSO DI DOTTORATO

Livelli di NFkB, IkBα e IkBγ nella mucosa intestinale e produzione di citochine da PBMC in Pazienti con Morbo di Crohn trattati con anticorpo monoclonale anti-TNFα (Infliximab).

Dottorando Dott.ssa Maria Ciarniello

Docente Guida/Tutor: Prof. Gino Doria

Dott.ssa Luisa Guidi

Coordinatore: Prof. Paolo Rossi

INDICE

Capitolo 1 Morbo di Crohn e Rettocolite ulcerosa: la malattia infiami cronica dell'intestino	
 ↓ 1. Epidemiologia	6 10
↓ 1.4 Terapia convenzionale	
Capitolo 2 Etiologia e patogenesi delle IBD: convergenza di predispo	
genetica, irregolarità immunitaria e fattori ambientali	15
↓ 2. Aspetti genetici delle IBD	18
♣ 2.1 Sistema immunitario e IBD	
♣ 2.2 Fattori ambientali	
♣ 2.3 La Malattia di Crohn è una malattia autoimmune?	
♣ 2.4 La Malattia di Crohn come malattia infettiva	
♣ 2.5 La MC è una malattia autoimmune indotta da infezione	
Capitolo 3 Contributo clinico-sperimentale	38
Contributo cinneo sperimentale	50
↓ 3. Introduzione	38
↓ 3.1 Obiettivi dello studio	42
♣ 3.2 Pazienti e metodi	45
↓ 3.3 Risultati	48
↓ 3.4 Discussione	51
4 3.5 Conclusioni	56
Bibliografia	64
Pubblicazioni	72

CAPITOLO 1

MORBO DI CROHN E RETTOCOLITE ULCEROSA: LA MALATTIA INFIAMMATORIA CRONICA DELL'INTESTINO

Le malattie infiammatorie croniche intestinali o IBD (Inflammatory Bowel Disease) comprendono due entità patologiche apparentemente distinte, ad eziologia sconosciuta e patogenesi immuno-infiammatoria complessa, la malattia di Crohn e la rettocolite ulcerosa (1).

Il morbo di Crohn (MC) è una malattia infiammatoria cronica dellaintestino descritta nel 1932 da Crohn (ma anche da Ginzburg e Oppenheimer), da cui la denominazione, caratterizzata da una reazione infiammatoria cronica di tipo granulomatoso, a carico di segmenti intestinali coinvolti in maniera discontinua. Essa colpisce tratti ben localizzati, donde il termine di enterite regionale o enterite segmentaria, dizione non del tutto corretta in quanto la malattia può interessare qualsiasi sezione del canale alimentare, dalla cavità orale sino allaorifizio anale, anche se la localizzazione più frequente è la leconiminazione di ileite terminale). La MC, pur potendo interessare con distribuzione segmentaria qualsiasi sezione della pparato digerente, più comunemente interessa la localizzazione o il colon.

La rettocolite ulcerosa o colite ulcerosa (RCU) è una malattia infiammatoria cronica che colpisce la mucosa di una parte o di tutto il colon, soprattutto nelle porzioni distali (retto) con ulcerazioni superficiali facilmente sanguinanti. Løinfiammazione cronica degli strati superficiali del colon coinvolge preferenzialmente løampolla rettale ove può anche essere localizzata in maniera esclusiva (proctite

ulcerosa). Non sono coinvolti gli strati più profondi della parete intestinale e la malattia è ristretta al colon, diffondendosi in maniera contigua dai segmenti distali verso quelli prossimali.

Entrambe le patologie possono seguire un decorso del tutto imprevedibile, di tipo cronico, caratterizzato da fasi di riacutizzazione. Il loro trattamento è sintomatico e basato sulløimpiego di farmaci antinfiammatori non steroidei come gli aminosalicilati, corticosteroidi ed immunosoppressori. Lo sviluppo di stenosi, fistole ed ascessi spesso rende indispensabile løintervento chirurgico.

Sebbene l\(\text{getiologia} \) di tali affezioni non sia completamente chiarita, sono diversi i fattori che intervengono (schema 1) nella patogenesi delle IBD che sino a qualche anno fa erano un settore con poche innovazioni o addirittura in una fase di stagnazione. La scoperta che l\(\text{getiologia} Helicobacter Pylori \) possa causare la gastrite e l\(\text{gulcera} \) ha comportato il tentativo di identificare tra i bilioni di batteri che vivono nel colon, i ceppi responsabili dell\(\text{ginizio} \) e/o della perpetuazione dell\(\text{ginfezione} \) intestinale. Il ruolo dei batteri \(\text{è} \) sostenuto da modelli sperimentali nell\(\text{ganimale} \). Alcuni studi hanno infatti dimostrato che la colite spontanea che si produce nella maggioranza dei topi knockout (privati di un gene) o transgenici (con gene modificato), non si sviluppa quando questi animali sono tenuti in un ambiente sterile (germ free).

Suscettibilità genetica	
Risposta immune	
Fattori ambientali	

Schema 1. Fattori che intervengono nella etiologia delle IBD.

Sinora løagente infettivo responsabile delle IBD non è stato identificato. Sicuramente importanti nelløtiopatogenesi della MC e della RCU sono i fattori ambientali, tra cui il fumo, una dieta carente di Zinco, i fattori genetici, løaggregazione familiare sia verticale (genitore-figlio) che orizzontale (fratello-fratello), la possibilità di infezioni con ceppi virali come quello del morbillo.

I risultati migliori della ricerca delle IBD si sono attualmente avuti dallo studio dei meccanismi della regolazione della infiammazione immuno-mediata. Tra i molti esempi dell'associazione tra IBD e sistema immune certamente sono di primo piano quelli tra infezione da HIV e MC. Eø riconosciuto come nelle fasi precoci dell'anfezione da HIV-1, la mucosa del tratto gastrointestinale serva da sito di entrata del virus, di amplificazione e replicazione virale e di deplezione dei linfociti T. Proprio la deplezione dei linfociti T CD4+ produce la guarigione della MC nei malati con infezione da HIV-1.

Le conoscenze sulla regolazione e attivazione/soppressione delle citochine hanno permesso di produrre farmaci che modificano le risposte biologiche sfruttando le conoscenze genetiche. Alcuni di questi come l\(\preceq\) anti-TNF, che \(\preceq\) un anticorpo chimerico monoclonale della classe delle IgG1 e la Ciclosporina sono ormai diventati parte integrante della terapia convenzionale basata sino a pochissimo tempo fa essenzialmente sull\(\preceq\) uso dei corticosteroidi.

Altre molecole come IL10 ricombinante, IL11, ISIS 2302 sono ancora in fase sperimentale. Tuttavia, il riconoscimento che le cellule e i mediatori solubili della tossicità possono cambiare con lœvoluzione della malattia, ha comportato il fatto che una strategia terapeutica efficace nelle fasi precoci della malattia, possa diventare inutile o dannosa nelle fasi tardive. Nella MC ad esempio la terapia con anticorpo IgG1 monoclonale chimerico anti-TNFα (Infliximab)

può indurre in modo imprevedibile la formazione di anticorpi antinucleo sino nel 10% dei Pazienti trattati. Poiché le scoperte in campo immnunologico hanno fornito negli ultimi 10 anni i risultati più interessanti, saranno descritti in modo più dettagliato i dati della letteratura che riguardano le nuove acquisizioni dei meccanismi autoimmuni della infiammazione e i risultati ottenuti nel nostro studio.

1. EPIDEMIOLOGIA

Eø interessante notare come RCU e MC presentino aspetti epidemiologici ed etiopatogenetici simili che ne permettono la discussione parallela. Tali malattie sono più comuni tra i bianchi della popolazione caucasica piuttosto che tra gli Africani della popolazione nera e gli Orientali, con una incidenza da 3 a 6 volte maggiore tra gli Ebrei che tra i non Ebrei.

In generale sono malattie più comuni nel Nord America e nel Nord Europa e la loro incidenza e prevalenza stanno aumentando anche nelle regioni più meridionali del continente europeo, mentre rimangono più basse in tutte le altre aree geografiche del mondo (estremamente rare in Africa, India, Sud America).

Løincidenza definisce i nuovi casi diagnosticati per anno, la prevalenza invece rappresenta il numero di Pazienti affetti dalla malattia ogni 100.000 abitanti e ne definisce sia løimpatto nella comunità, sia il peso socioeconomico.

NelløEuropa Occidentale e negli Stati Uniti, løincidenza della RCU, compresa la proctite ulcerosa, è di circa 10-15 casi per 100.000 abitanti/anno con una prevalenza di circa 70-150 casi per 100.000 abitanti. Løincidenza della sola proctite è più bassa rispetto alla RCU vera e propria. Løincidenza della MC è di circa 2 casi per 100.000 abitanti/anno con una prevalenza di 20640/100.000. Le eccezioni

sembrano essere rappresentate da Francia, Belgio e Germania in cui invece si è rilevata una maggiore incidenza della MC (2).

Negli anni Ø0 lo studio condotto dallÆC-IBD Study è stato il primo studio di tipo prospettico che ha permesso di raccogliere dati sulløincidenza della RCU e della MC nei Paesi del bacino Mediterraneo ottenendo un'incidenza di 8.6 per la RCU e 3.69 per la MC. Per quanto riguarda løItalia, (GISC, *Int J Epidemiol* 1996) il tasso di incidenza della RCU è stato di 5.2, mentre quello della MC di 2.3.

Per quanto riguarda løincidenza della RCU, alløaumento osservato prima degli anni ÷60, ha fatto seguito una situazione di stazionarietà e, quindi, di progressiva riduzione almeno negli USA; in altre aree geografiche, come in Scozia, Norvegia, Svezia, Islanda, è stato riscontrato un costante aumento della incidenza della malattia.

Løincidenza della MC è andata via via crescendo fino agli anni σ 0-÷80 quando ha raggiunto una sorta di plateau (in particolare løincidenza è aumentata negli ultimi 25 anni nel Nord Europa con livelli, in Svezia, di 6/100.000 abitanti/anno).

Eø stata anche segnalata una certa stagionalità delløesordio della RCU con un picco a dicembre-gennaio che farebbe pensare ad un concorso di fattori ambientali stagionali. E' confermata una maggiore incidenza di IBD nelle zone urbane ed industrializzate (questo ha aperto il campo a speculazioni riguardanti un possibile contributo di fattori inquinanti). Benchè non siano disponibili dati sicuri, sembra che løncidenza della MC (soprattutto colica) sia in aumento.

Tutti i gruppi di età sono a rischio per le IBD, anche se è raro il riscontro di queste patologie al di sotto dei 10 anni e al di sopra di 80. Il picco maggiore di incidenza si colloca, comunque, tra 15 e 35 anni per i maschi e tra 20 e 40 per le femmine, con un secondo picco comune tra i 50 e i 60 anni. Per quanto riguarda il sesso, non sembra

emergere dalle casistiche più recenti una differenza significativa con un rapporto uomo/donna variabile da 1.1:1.0 a 0.9:1.0 secondo le aree geografiche prese in esame, anche se il sesso femminile, soprattutto se al di sotto dei 45 anni, sembra presentare un rischio per MC del 20-30% maggiore rispetto ai maschi.

Løetà di insorgenza specie della RCU ha un andamento bimodale. Nel 50% dei casi la malattia insorge tra i 15 e 30 anni mentre un secondo picco di incidenza si osserva tra i 55 ed i 65 anni. Si sta sempre più confermando la diagnosi di IBD in soggetti di età avanzata con forme cliniche rappresentate da RCU localizzate a sinistra o a livello del retto-sigma senza grossa tendenza alløaggressività. Eø evidente infine løncidenza familiare di IBD nel 2-5% dei soggetti aventi familiari che ne sono affetti. Non esiste alcuna specificità per una data forma di malattia infiammatoria delle intestino alløinterno di un determinato gruppo familiare. Questøultimo dato epidemiologico suggerisce loipotesi che nello sviluppo di queste malattie possano svolgere un ruolo comune sia i fattori genetici che quelli ambientali. Inoltre la complessità dei fattori che favoriscono le IBD è sottolineata anche dal fatto che avvenimenti di vita clinicamente stressanti possono precedere nel tempo lo sviluppo clinico della malattia infiammatoria intestinale.

1.2 ANATOMIA PATOLOGICA E QUADRI ENDOSCOPICI Anatomia patologica nella malattia di Crohn.

La MC può colpire qualsiasi tratto dell'apparato digerente, dalla bocca all'ano; la localizzazione faringea o esofagea è rarissima; meno rara, anche se molto difficile, è quella allo stomaco e al duodeno; dal digiuno procedendo distalmente la localizzazione della MC diventa più comune fino all'altezza della valvola ileocecale con

frequenza massima allaleo terminale (ultimi 60 cm). Eacomune che la localizzazione non sia singola, ma che diversi tratti dellalentestino siano contemporaneamente colpiti soprattutto a livello del tenue o in parte nel tenue ed in parte nel colon: in questo caso si parla di forma diffusa della MC, ma è importante ricordare che la malattia ha sempre una distribuzione segmentaria con alternanza di tratti coinvolti e di tratti normali (skip area o lesioni a salto) con margini netti di separazione tra i segmenti colpiti e quelli indenni (la lunghezza di ciascun segmento varia da 5 a 30 cm).

La malattia è più frequentemente localizzata alloileo distale (circa 60% dei casi); piuttosto comune è il coinvolgimento del colon ascendente sia da solo (circa 10%) sia associato a quello ileale (ileocolite: 40%); il retto è interessato nel 5% dei casi e ancora più raro è lointeressamento duodenale e/o gastrico (1%). In una piccola percentuale di Pazienti, specialmente bambini e adolescenti, si osserva un importante ed esteso interessamento del digiuno oltre che delloileo.

Nelle sezioni coinvolte dalla malattia løinfiammazione interessa a tutto spessore la parete intestinale (mucosa, sottomucosa, muscolare, sierosa), fino a coinvolgere la sierosa, il mesentere ed i linfonodi mesenterici, comunemente compromessi, spiegandosi in tal modo il caratteristico sviluppo di fistole e raccolte ascessuali.

Le lesioni macroscopiche più precoci, evidenti alla laparotomia, sono løiperemia e løedema della mucosa, del mesentere e dei linfonodi, cui seguono ulcere superficiali chiamate afte, la cui confluenza porta alla formazione di ulcere serpiginose trasversali e longitudinali che sulla mucosa edematosa e infiammata danno luogo a rigonfiamenti nodulari, da cui il caratteristico aspetto radiologico ad õacciottolato romanoö. Ulteriori evoluzioni della malattia possono portare sia a fibrosi con rigidità della parete intestinale che a stenosi e formazione

di fistole. La mucosa può ulcerarsi ed al di sotto di essa possono formarsi tragitti fistolosi. Le anse intestinali tendono ad accollarsi løuna alløaltra oppure alla parete addominale o agli organi retroperitoneali; le fistole possono mettere in connessione due anse oppure possono addirittura aprirsi in altri organi (vescica, uretere, vagina) o anche alløesterno, soprattutto in corrispondenza delle cicatrici chirurgiche oppure in sede periombelicale o perineale. Talvolta le fistole hanno una lunghezza tale da raggiungere anche la regione glutea e quella delløanca.

Dal punto di vista microscopico, l\(\phi\) elemento diagnostico pi\(\tilde{\psi}\) utile \(\tilde{\psi}\) il granuloma con necrosi non caseosa, infiammazione discontinua e transmurale focale con aggregati linfocitari e fissurazioni. I granulomi sono costituiti da cellule epitelioidi e cellule giganti di Langhans. Il quadro istologico mostra un infiltrato di macrofagi, neutrofili, linfociti e plasmacellule e si estende a tutti gli strati della parete intestinale.

Il corrispettivo endoscopico del Crohn delløleo terminale è quello di una mucosa interessata da ulcere ad andamento serpinginoso. Løinsieme di processi infiammatori e riparazione dà luogo ad un quadro endoscopico di mucosa ad acciottolato che può variare con løintensità della malattia. Come conseguenza delløinfiammazione della sierosa, nella MC le anse intestinali adiacenti tendono ad aderire tra loro fino a costituire una massa palpabile più frequentemente in fossa iliaca destra. La diagnosi endoscopica di IBD per poter essere conclusiva deve essere integrata dagli esami di laboratorio ed istologici oltre che da un attento esame clinico. Infatti quadri endoscopici simili a quelli osservati nelle IBD sono da riferire a malattie che coinvolgono il sistema autoimmune come løAIDS, che rappresentano una sfida importante anche alløendoscopista esperto. Inoltre la proctite da Chlamydia nei maschi omosessuali e altre

infezioni come la shigellosi, la tubercolosi del ceco, l\(\text{\pi}\) mebiasi, possono mimare il quadro endoscopico della MC. La colite ischemica e la sigmoidite da raggi possono essere scambiate per RCU.

Anatomia patologica nella rettocolite ulcerosa.

Nella RCU la reazione infiammatoria è a carico della mucosa del colon che, macroscopicamente, si presenta cosparsa di ulcere, iperemica e sanguinante. Løinfiammazione interessa la mucosa in maniera uniforme e continua senza løinterposizione di aree di mucosa normale. Il retto è interessato nel 95% dei casi e, da qui, il processo infiammatorio si estende prossimalmente. Quando è colpito l\(\alpha\)intero colon, la malattia può interessare løleo terminale per pochi centimetri (õbackwash ileitisö) senza che, tuttavia, si determini quel tipico ispessimento delle pareti e restringimento del lume ileale, quale si osserva nella MC. Læpitelio di rivestimento della mucosa delle cripte e la sottomucosa sono infiltrati da elementi infiammatori di tipo neutrofilo che, progressivamente, distruggono la superficie epiteliale con conseguente sviluppo di ulcere multiple. L\(\overline{g}\)infiltrato neutrofilo delle cripte dà luogo alla caratteristica, ma non specifica, formazione di piccoli ascessi criptici e alla loro eventuale distruzione. Ricorrenti episodi di infiammazione danno luogo ai caratteristici aspetti di cronicità della malattia. La fibrosi e la retrazione longitudinale determinano un accorciamento del colon. La perdita della normale austratura fa assumere al viscere un aspetto tubulare che radiologicamente è descritto come ocanna di stufao. Gli isolotti di mucosa che si rigenerano intorno ad aree di mucosa ulcerata e disepitelizzata, si presentano come õpolipiö che protrudono nel lume del colon, di natura infiammatoria e non neoplastica e, pertanto, definiti pseudopolipi.

1.2 QUADRO CLINICO

Il Paziente affetto da IBD è giovane o adulto (20-40 anni) anche se esistono eccezioni con esordio in età più avanzata (verso 60 anni). La sintomatologia è subdola, se si eccettuano le forme più rare ad esordio acuto; in principio il Paziente può avere soltanto febbre, e poi compaiono dolori addominali, soprattutto in corrispondenza della regione ileocecale e quindi in fossa iliaca destra dove la malattia si localizza più spesso. Il dolore è spontaneo, sordo, continuo e si accentua alla palpazione e in questa sede ed è frequente, allæsame obiettivo, il reperto palpatorio di masse irregolari dolenti a salsicciotto.

In secondo luogo, il Paziente lamenta diarrea (3-4 scariche al giorno), ma di regola senza sangue visibile, anche se è frequente il sanguinamento occulto. Se la malattia progredisce, si hanno disturbi correlati alla formazione di un infiltrato perianale dolente e løinsorgenza di fistole che necessitano di diagnosi differenziale con fistole ed ascessi di origine infettiva. Nei casi più gravi la fistolizzazione della parete intestinale provoca sanguinamento, a volte con emorragie di una certa entità.

Quadro clinico della RCU.

Diarrea ematica e dolore addominale, spesso con febbre e calo ponderale sono i principali sintomi della RCU. Nei casi di lieve entità, è presente una sintomatologia caratterizzata da una o due evacuazioni giornaliere di feci semi-formate contenente scarsa quantità di sangue, senza alcuna manifestazione sistemica. Nei casi più gravi, løalvo è francamente diarroico con emissione di feci liquide miste a sangue e pus, associato a dolore addominale severo con sintomi e segni di disidratazione, anemia, febbre e perdita di peso. Nelle forme a prevalente impegno rettale, sono presenti stipsi e tenesmo. Può

riscontrarsi un addome disteso con dolorabilità lungo il decorso del colon, mentre nei casi lievi l\(\textit{ge}\) same obiettivo pu\(\textit{o}\) essere del tutto normale. Le manifestazioni extraintestinali (MEI) sono artrite, lesioni cutanee o epatopatia. Le complicanze pi\(\textit{u}\) temibili sono la cancerizzazione e la distensione acuta del colon (megacolon tossico) con perforazione intestinale.

Quadro clinico della malattia di Crohn.

Tipicamente la MC insorge in giovani adulti con febbre, dolore addominale, diarrea ematica, astenia e calo ponderale. Il dolore addominale è continuo o crampiforme, espressione di stenosi di grado variabile o aderenze intestinali. La rettorragia è meno frequente che nella RCU perché il retto è in molti casi indenne e la malattia ha un carattere transmurale con interessamento mucosale irregolare. Possono associarsi complicanze ano-rettali, quali fistole, ragadi, e ascesso peri-rettale, che spesso precedono l\u00exesordio clinico della malattia. Con il periodico riaccendersi dellainfiammazione perirettale, le pareti delloano si ispessiscono e possono svilupparsi fistole perianali o cicatrici. Una dilatazione tossica (megacolon tossico) del colon può manifestarsi in conseguenza di un interessamento esteso del viscere, anche se tale evento è meno frequente che nella RCU, dato che nella MC vi è piuttosto un ispessimento della parete intestinale. Le MEI sono più frequenti nella localizzazione colica della malattia che non nella forma ileale (3,4).

Nel complesso la mortalità aumenta con la durata del processo morboso e si aggira globalmente intorno al 5-10% di tutti i casi. Le cause più frequenti sono la peritonite e la sepsi.

1.3 DIAGNOSTICA SIEROLOGICA

Da alcuni anni si sta cercando di individuare un marcatore sierico che possa essere utilizzato per lo screening, la diagnosi e la prognosi di queste malattie. Già nel 1959 un gruppo di Ricercatori (Broberger) descrisse la presenza di autoanticorpi nelle IBD. Recentemente l\(^{\alpha}\)tenzione per la possibile differenziazione tra MC e RCU \(^{\alpha}\) stata rivolta in particolare ai seguenti autoanticorpi:

- 1. anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili (pANCA);
- 2. anticorpi anti-saccaromyces cerevisiae (ASCA);
- 3. anticorpi anti-pancreas;
- 4. anticorpi anti-cellule caliciformi intestinali.

Anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili.

Sono i principali markers sierologici delle vasculiti, in particolare in granulomatosi di Wegener, panarterite nodosa, glomerulonefrite progressiva ed IBD. ANCA (c e pANCA) vengono determinati con lømmunofluorescenza indiretta (IFI) e con løELISA. Anticorpi anti-Saccharomyces Cerevisiae (ASCA).

La determinazione degli ASCA ha assunto notevole importanza in Pazienti affetti da MC. Le metodiche comunemente usate sono IFI ed ELISA, in grado di rilevare gli isotipi IgG ed IgA. Gli ASCA riconoscono un antigene carboidratico ricco in mannani della parete cellulare del Saccharomyces. Da vari studi non emerge una correlazione tra andamento clinico e presenza e/o titolo degli ASCA. Sembrano esistere tuttavia sostanziali differenze tra Pazienti con MC del piccolo intestino, coloro che presentano un quadro di malattia silente e coloro i quali vanno più frequentemente incontro a fibrostenosi e perforazioni intestinali. Eø possibile che elevati titoli di IgG ASCA riflettano una aumentata permeabilità a livello della mucosa intestinale che è stata riscontrata in Pazienti con MC del

piccolo intestino ed in soggetti della stessa famiglia con malattia silente nonchè in Pazienti con malattia celiaca.

Anticorpi anti-pancreas.

Eø stata evidenziata unøelevata specificità tra la presenza nel siero di anticorpi contro il pancreas esocrino e løinsorgenza della MC. Løipotesi più accreditata è che tale malattia sia causata da unøimmunoreazione contro il secreto pancreatico. Løantigene pancreatico, passando nelløintestino tramite il dotto pancreatico, diffonde nella parete intestinale e forma ICC responsabili di flogosi cronica. La metodica usata per la determinazione di questo anticorpo è løIFI; il substrato ottimale è rappresentato da pancreas umano.

Anticorpi anti-cellule caliciformi intestinali.

1.4 TERAPIA CONVENZIONALE

I farmaci fondamentali sono la salazopirina (salicilazosulfapiridina + acido 5-aminosalicilico) o il solo acido 5aminosalicilico (5-ASA), cui si deve di fatto l\(\textit{gazione}\) antiinfiammatoria (5,6). La sulfapiridina si comporta da vettore ed \(\textit{e}\) responsabile della maggior parte degli effetti collaterali: intolleranza gastrica, tossicit\(\textit{a}\) epatica, nefropatia interstiziale, mielotossicit\(\textit{a}\), anemia megaloblastica da deficit di folati, anemia emolitica, infertilit\(\textit{a}\) maschile (reversibile entro 3 mesi dalla sospensione del trattamento, per riduzione del numero e della motilit\(\textit{a}\) degli spermatozoi).

Il 5-ASA esiste in commercio in preparazioni diverse in cui tale molecola è associata a õvettoriö che ne consentono la liberazione a vari livelli delløintestino per cui nella scelta si dovrà tener conto della localizzazione ed estensione della malattia: olsalazina, dimero di acido 5-aminosalicilico; mesalazina, in cui il 5-ASA è legato a resine che ne determinano la liberazione a diverso pH oppure è associato a granuli di acetil-cellulosa con rilascio tempo-dipendente. Nelle forme lievi può essere sufficiente løuso della salazopirina o di 5-ASA, mentre nelle forme moderate/gravi, specie in fase acuta, si dovrà fare ricorso ai corticosteroidi (dosaggio variabile fino ad 1 mg/kg/die di prednisone), che andranno somministrati per diverse settimane fino alla risoluzione dei segni e sintomi di maggiore attività della malattia per continuare poi con la salazopirina o il 5-ASA (7). Non ci sono prove che i corticosteroidi influenzino la durata dei periodi di remissione né di diminuire la frequenza delle recidive (di qui il loro impiego limitato nel tempo), mentre qualche beneficio in tal senso sembra venire dalløuso prolungato della salazopirina o delløacido 5-aminosalicilico, anche se la letteratura non è al riguardo univoca.

Nella MC con interessamento rettale e/o del colon sinistro è utile il ricorso ai corticosteroidi e/o alla salazopirina per via rettale sotto forma di clisteri. La mesalazina è disponibile anche in supposte. Specie in presenza di ascessi e/o di fistole, potrà essere necessario lømpiego di antibiotici (metronidazolo, chinolonici, aminoglicosidi), mentre nelle forme cortico-resistenti o -dipendenti si utilizzano immunosoppressori come azatioprina, 6-mercaptopurina, ciclosporina A o metotrexate (8,9). In quei casi che non rispondono alla terapia oconvenzionaleo, la prognosi è, naturalmente, più sfavorevole (10,11).

Nelle forme che non beneficiano delle cure mediche, è opportuno il ricorso alla terapia chirurgica, specie in presenza di complicanze (stenosi, fistole, perforazione, ascessi) e ciò si verifica nei 2/3 dei casi in cui la malattia ha sede colica o ileocolica.

CAPITOLO 2

ETIOLOGIA E PATOGENESI DELLE IBD: CONVERGENZA DI PREDISPOSIZIONE GENETICA, IRREGOLARITAØ IMMUNITARIA E FATTORI AMBIENTALI

Si è detto che la causa delle IBD è sconosciuta. Si suppone che le malattie infiammatorie croniche colpiscano individui geneticamente predisposti, presumibilmente sulla base di un difetto immunitario intrinseco. Inoltre, si crede che fattori ambientali tuttora non identificati giochino un ruolo importante.

Un concetto piuttosto simile è loinduzione di autoaggressività per mezzo di un agente esogeno in individui geneticamente malattie autoimmunitarie. Nella malattia di Crohn e nella colite ulcerosa, il tessuto danneggiato sembra essere il risultato di una risposta infiammatoria impropria ed autodistruttiva (12); døaltra parte, cœ una sorprendente somiglianza tra IBD ed un certo numero di malattie infettive intestinali. Løazione scatenante primaria dellainfiammazione nelle IBD è sconosciuta. Lainfiammazione cronica può non essere iniziata da un singolo fattore ma sembra richiedere la combinazione di parecchi fattori. Eø possibile che nelle IBD lœvento iniziale aumenti semplicemente õløinclinazioneö di un Paziente a sviluppare IBD in una fase successiva della propria vita, mentre lœvoluzione clinica della malattia richiede alcuni fattori stimolanti non specifici. Ed è per questo che lœvento trigger delle IBD non è stato ancora identificato.

In assenza di uno specifico patogeno aggressivo e mancando la prova a conferma del meccanismo patogenetico autoimmunitario, løunica alternativa sembra essere quella che fattori ambientali non specifici siano la causa di ungesagerata risposta infiammatoria nelle IBD. Questa potrebbe essere launica ipotesi attendibile dal momento che løidentificazione di una anomalia specifica come target di una terapia causale potrebbe, quindi essere impossibile. Esistono in verità prove crescenti che in particolare la normale flora batterica intestinale contribuisca in modo significativo allo sviluppo delleinfiammazione, sebbene ciò non porta necessariamente alla triste conclusione che la predisposizione a sviluppare IBD è semplicemente il prezzo da pagare per la complessità dei meccanismi che permettono l\(\precassorbimento di una grande varietà di nutrienti e allo stesso tempo la protezione contro vari patogeni. Le IBD colpiscono con una certa predilezione parti dell'antestino ad elevato contenuto endoluminale di batteri come l'aleo terminale ed il colon. Nella MC, la riduzione del contenuto dei batteri luminali mediante decontaminazione, riposo dellaintestino, lavaggio o nutrizione parenterale totale, ha effetti benefici sulløattività infiammatoria. Inoltre, vi è la prova che nella MC la composizione antibiotici come il metronidazolo in alcuni Pazienti con MC, è stato attribuito alla riduzione a lungo termine di *Bacteroides* spp nel lumen. I Bacteroides sembrano responsabili della infiammazione intestinale in modelli di ratti transgenici HLA B27. Gli anaerobi sarebbero infatti la sorgente di PG-PS nel suddetto modello di overgrowth batterico nel piccolo intestino (13). Allo stesso modo, la presenza di una normale flora intestinale è il pre-requisito per lo sviluppo di malattia intestinale nei modelli animali di disregolazione immunitaria. Nella RCU, è stata produzione di tossine da parte della normale flora batterica (14). Løadesione batterica alle cellule epiteliali in vitro induce la secrezione di mediatori pro-infiammatori, come IL1, IL8 e IL6, che potrebbero essere responsabili della massiva trasmigrazione di neutrofili attraverso lepitelio nelle cripte del colon (ascessi criptici) tipica della RCU. Di solito, la flora endogena non induce risposte immunitarie. La composizione della flora intestinale è un tratto individuale piuttosto stabile e questi batteri sono considerati una estensione del self da parte del sistema immunitario. Comunque, nelle IBD, studi recenti hanno dimostrato unginterruzione di questa tolleranza che si correla con løattività infiammatoria. Senza considerare la tolleranza delløospite, alcuni antigeni batterici, come løLPS, il maggiore costituente della parete cellulare dei batteri gram negativi, sono potenti molecole proinfiammatorie. Mentre le cellule mononucleate della normale mucosa non sono reattive alleLPS, i macrofagi tissutali appena reclutati nelle IBD esprimono elevata affinità per il recettore delløLPS, il CD14. Løattivazione di queste cellule tramite il CD14 porta al rilascio di mediatori pro-infiammatori quali TNF, IL1, IL6, IL8, fattore tissutale pro-coagulante e componenti del complemento. Nel topo knockout per IL2, l\(espressione di CD14 da parte di cellule epiteliali precede lønsorgere dellønfiammazione (15). Il possibile ruolo delle macromolecole batteriche pro-infiammatorie nelle IBD è stato recentemente dimostrato. In breve, alcune prove suggeriscono che i costituenti della parete cellulare come LPS e PG-PS, come pure gli oligopeptidi formilati, quali FMLP, possono essere rintracciati nel siero dei Pazienti con IBD, che sembrano avere aumentati titoli di anticorpi contro queste molecole. Tutte queste molecole, da sole o in modo sinergico, inducono fortemente il rilascio di mediatori proinfiammatori attraverso recettori specifici (FMLP, LPS) e non specifici (LPS, PG-PS) da parte di macrofagi e neutrofili. FMLP e PG-PS possono entrare nella circolazione enteroepatica e pertanto essere correlati alle malattie infiammatorie delle vie biliari intraepatiche associate alle IBD.

Nonostante i molti recenti progressi nella comprensione del sistema immunitario mucosale, il ruolo dei fattori ambientali coinvolti nella patogenesi delle IBD rimane un mistero. Osservazioni cliniche ed evidenze sperimentali suggeriscono sempre più che la natura degli agenti responsabili sia piuttosto non specifica. Comunque, in futuro løsservazione che la normale flora batterica intestinale induca infiammazione della mucosa solo in modelli animali con unøintrinseca disregolazione del sistema immunitario potrà spiegare come i fattori ambientali ubiquitari e non specifici inducano una flogosi severa solo in alcuni individui, ma lasciano la maggior parte degli altri individui sani (16). Inoltre, potrebbe esserci anche la possibilità che la rilevazione di questi meccanismi patogenici possa portare ad una migliore comprensione delle artriti reattive, delle spondiliti anchilosanti e delle malattie autoimmunitarie.

2. ASPETTI GENETICI DELLE IBD

La prima segnalazione che almeno una componente dell'epitelio intestinale possa avere la funzione specifica di presentazione antigenica risale al 1981. Gli antigeni di superficie che giocano il maggior ruolo nel rigetto dei trapianti di tessuti allogenici sono chiamati Antigeni del Sistema Maggiore di Istocompatibilità. Questi antigeni sono il prodotto di un gruppo di geni strettamente correlati, conosciuti come geni del sistema MHC. Questo sistema, denominato HLA nell'auomo, dirige la sintesi di tre classi di peptidi antigenici denominati di classe I, II e III. I linfociti T, sia del tipo T helper1 che T helper2 con il recettore CD4⁺ riconoscono i peptidi legati alle

molecole di classe II, mentre i linfociti T con il recettore CD8⁺ riconoscono i peptidi legati alle molecole della classe I.

La differenza tra questi due sistemi è che prima che l\(\psi \) antigene presente nelleambiente extracellulare possa legarsi alle molecole del sistema HLA di classe II deve essere sottoposto ad un processo di degradazione a livello endosomiale e poi trasportato in superficie dove è possibile il suo riconoscimento da parte dei linfociti T CD4⁺. Al contrario, per gli antigeni di classe I è possibile subito il legame diretto con antigeni non-self. Gli antigeni di classe II sono normalmente presenti sui macrofagi che funzionano come cellule che presentano l\(\pi\)antigene. I peptidi estranei all\(\pi\)organismo trattati dalle APC, sono esposti sulla superficie cellulare del macrofago in associazione con le molecole di classe II. In questo modo l\(\varphi\)antigene estraneo può essere riconosciuto. Løepitelio intestinale è regolarmente esposto ad antigeni estranei e løintestino contiene numerose cellule che sono dotate del sistema di recettori di classe II. Gli enterociti e non solo i macrofagi presenti a livello intestinale esprimono le molecole di classe II. Il fatto che gli enterociti possano servire come APC può avere importanti conseguenze funzionali. La risposta infiammatoria può infatti variare, almeno in parte, dal tipo di presentazione a cui l\(\presentazione \) è sottoposto. Se nei soggetti sani la presentazione da parte degli enterociti porta alla tolleranza, al contrario nelle IBD la stessa presentazione comporta l\(extivazione T \) cellulare. Infatti, sebbene le normali cellule epiteliali preferenzialmente attivino i linfociti T CD8⁺ soppressor, funzione che può contribuire ad indurre la tolleranza locale, nelle IBD le cellule epiteliali attivano i linfociti T CD4⁺ helper portando all@amplificazione della reattività immunitaria locale e all\(antiammazione (17). Si ritiene comunemente che il riconoscimento antigenico e l\(\alpha\) attivazione dei linfociti T CD4⁺ siano i meccanismi di azione della zione della ciclosporina. Espossibile, invece, che antibiotici come ciprofloxacina e metronidazolo nella MC, possano agire sulla presentazione degli antigeni batterici da parte dei macrofagi.

Løattivazione T cellulare avviene attraverso la mediazione di un secondo segnale non antigene specifico con la secrezione di citochine come løIL2. Senza questo secondo segnale la risposta infiammatoria decade (immuno-tolleranza) oppure si ha løapoptosi cellulare.

I dati epidemiologici sostengono laidea che lo sviluppo delle IBD richieda una predisposizione ereditaria. I parenti di I grado dei Pazienti con IBD sono più predisposti a sviluppare la malattia rispetto ai parenti di II grado. Lanalisi della associazione genica ha portato ad identificare i loci genetici associati alle IBD. Così come per le malattie autoimmuni (18), potrebbe esserci un legame tra IBD ed alcuni alleli HLA (19). Le molecole HLA contribuiscono direttamente alla patogenesi delle malattie immuno-mediate per il loro ruolo nel modellare il repertorio immunitario e nella presentazione della antigene peptidico. La associazione con alleli HLA ne riflette la intima vicinanza ai geni realmente responsabili. Il gene per il TNF, importante sia nelle malattie autoimmunitarie che nelle IBD è adiacente al complesso HLA. I Pazienti affetti da IBD sono ad alto rischio di sviluppare disturbi autoimmunitari come la anemia emolitica autoimmune, a conferma della disposizione genetica comune per queste malattie.

Alcune MEI delle IBD (artrite assiale, infiammazione delle vie biliari intraepatiche) riflettono l\(\text{associazione} \) con la spondilite anchilosante idiopatica e la colangite sclerosante, che si crede siano malattie autoimmuni. Analogamente alla colangite sclerosante idiopatica ed alla spondilite anchilosante, la colangite sclerosante e l\(\text{gartrite} \) associate com l\(\text{gHLA} \) B8/DR3

e HLA B27, rispettivamente, laddove le IBD stesse non lo sono (20). I geni posti allæsterno del complesso MHC predispongono sia alle malattie autoimmuni che alle IBD. Per esempio, una debolezza ereditaria della barriera mucosale permette la penetrazione di antigeni nel lume intestinale e di molecole pro-infiammatorie che danno avvio al susseguente sviluppo di IBD, allæartrite cronica o ad altre malattie autoimmuni dalle quali dipende un ulteriore contributo alla predisposizione di geni specifici per la malattia. La permeabilità intestinale è aumentata sia nei Pazienti con MC che in una percentuale rilevante dei loro parenti sani oltre che nei Pazienti con artrite assiale idiopatica. La predisposizione specifica a sviluppare IBD potrebbe essere rappresentata da una anormalità ereditaria nella regolazione immunitaria locale della mucosa intestinale.

La scoperta recente che CARD15/NOD2 sia coinvolto nella predisposizione genetica alla MC, è la dimostrazione finale che la MC è una malattia genetica. Il gene spiega il 20% della suscettibilità genetica. Le mutazioni di CARD15 sono presenti nel 30-50% dei Pazienti con MC, in confronto al 7-20% dei controlli sani. I Pazienti con MC spesso presentano mutazioni in questi due cromosomi, a conferma di un effetto dipendente dalla mutazione stessa. Anche se løassociazione tra le tre principali mutazioni di CARD15 (R702W, G908R e 1007fs) con la MC è stata definitivamente chiarita, non è di alcuna utilità indagare di routine il genotipo dei Pazienti affetti da IBD nè di soggetti asintomatici a rischio. Piuttosto CARD15 centra il ruolo nello specifico meccanismo coinvolto nella MC. Siccome CARD15 è attivato dai componenti della parete batterica e quindi induce løattivazione di NFkB, una molecola proinfiammatoria, la scoperta di CARD15 spiega il legame, a livello molecolare, tra i batteri e løinfiammazione del tratto gastro-intestinale (21).

2.1 SISTEMA IMMUNITARIO E IBD

La distruzione del tessuto nelle IBD è causata da una risposta infiammatoria cronica inappropriata mediata da cellule immunitarie effettrici specifiche e non specifiche, in particolare linfociti T e macrofagi. Løattivazione di queste cellule porta ad un aumento della produzione di citochine e mediatori pro-infiammatori. Le cellule T mucosali dei Pazienti con IBD mostrano unøaccresciuta responsività alløL2 ed una capacità citotossica aumentata. Normalmente, le cellule T CD8⁺ predominano nelløpitelio, funzionando da cellule *suppressor*, ma nelle IBD le cellule epiteliali attivano in modo preferenziale le cellule T CD4⁺ che si comportano da *helper*. Una variazione nelløquilibrio tra i meccanismi pro ed anti-infiammatori nelle IBD è indicata dalløaumentata produzione di IgG nella lamina propria, in contrasto con la normale prevalenza di IgA. Le IgA bloccano la risposta infiammatoria (esclusione delløantigene) a causa della mancata attivazione del complemento, mentre le IgG la promuovono.

Nella mucosa normale, il sistema immunitario è costantemente esposto ad antigeni ambientali e prodotti batterici pro-infiammatori. Tali antigeni sono processati da strutture specializzate della mucosa (cellule M nelløepitelio, tessuto linfoide specializzato nelle placche di Peyer). Løespressione di marcatori di attivazione e la produzione essenziale di piccole quantità di citochine da parte di cellule T e macrofagi riflette questa costante attivazione di meccanismi immunitari nella mucosa normale. Di solito, una risposta immunitaria specifica nella mucosa porta alla tolleranza verso løantigene che non rimane circoscritta alløintestino ma si ripercuote a livello sistemico. La tolleranza dipende dal fatto che løantigene è processato dalle cellule dendritiche intimamente associate con le cellule M nonchè da una barriera mucosale intatta. Løassorbimento quantitativo di antigeni

batterici non avviene attraverso il normale epitelio, il quale, a differenza delle cellule M, è coperto da uno strato mucoso che previene løadesione batterica. Comunque, tracce di una certa quantità di macromolecole pro-infiammatorie che penetrano attraverso lœpitelio, come løLPS, contribuiscono a quello stato di infiammazione õfisiologicaö della mucosa. La prevenzione del danno tissutale dipende da una rigida regolazione del complesso equilibrio tra i meccanismi pro e anti-infiammatori. La normale down-regolazione della risposta immunitaria mucosale, è per esempio mostrata dalløassenza delløespressione del recettore per løIL2 delle cellule T mucosali e dallæspressione di CD14 (un recettore ad alta affinità per løLPS comunemente espresso da cellule mieloidi) sui macrofagi nonostante l\(\alpha\) ttivazione costitutiva di queste cellule (22). Nelle IBD avverrebbe il fallimento nella contenzione di questa infiammazione fisiologica in risposta ad agenti pro-infiammatori ubiquitari e non specifici. Anche se løinfiammazione nelle IBD sembra piuttosto non specifica, un germe specifico potrebbe essere il responsabile della disinibizione dei meccanismi immunitari della mucosa.

Alcuni topi con una disregolazione intrinseca del sistema immunitario, causata dalla mancanza di alcune citochine, sviluppano una flogosi intestinale spontanea. I topi con deficit di IL2 sviluppano coliti accompagnate da un¢aumentata produzione di citochine da parte di Th1 apparentemente condotta da IL12. In topi TCRαβ mutanti, l¢aumento di IL1 contribuisce allo sviluppo della colite. La capacità di IL10 di ridurre le citochine pro-infiammatorie come IFNγ e TNFα può spiegare l¢enterocolite in topi IL10 deficienti. Topi SCID ricostituiti con CD45RB^{high} che sono una sottopopolazione di cellule T CD4⁺ sviluppano enterocolite granulomatosa simile alla MC umana causata

dalla produzione di citochine da parte dei Th1. In questo modello, lømportanza di un equilibrio tra i mediatori pro e anti-infiammatori spontaneamente prodotti è sorprendentemente dimostrata da un trasferimento simultaneo delle cellule T CD45RB low CD4 $^+$. In presenza di queste cellule regolatrici che apparentemente producono TGF β , le cellule T CD45RB high CD4 $^+$ bloccano lønfiammazione (23).

Sebbene non sia stata trovata una totale assenza di nessuna citochina in Pazienti con IBD, è stato osservato uno squilibrio tra i mediatori pro e anti-infiammatori, come per esempio ungaccresciuta produzione di citochine e ungaumento del rapporto tra la L1 ed il suo antagonista recettoriale (IL1-RA). La MC e la RCU differiscono nel profilo delle citochine prodotte nella mucosa. Al momento si deve capire se le differenze geneticamente determinate ancora nellæspressione delle citochine, dovute a varianti alleliche nelle regioni del gene promotore, possano spiegare la tendenza a sviluppare IBD. Mentre potrebbe non essere trovata alcuna associazione tra gli alleli microsatelliti IL2 ed IBD, sembra esserci ungassociazione della MC con gli alleli microsatelliti del TNF.

In recenti studi clinici è stato dimostrato che il trattamento con IL10r umana e/o con anticorpo umanizzato anti-TNF, riduce lα infiammazione nei Pazienti con IBD presumibilmente attraverso il ripristino dellα equilibrio delle citochine. La possibilità che il blocco delle citochine pro-infiammatorie IL12 e IFNγ possa dare beneficio è suggerita da studi in cui la colite sperimentale, indotta dallα gente aptenizzante TNBS, si può prevenire tramite anticorpi anti-IL12 o anti-IFN. Lα assunzione orale di antigeni colon-derivati previene lo sviluppo di flogosi nel modello animale di IBD inducendo tolleranza orale verso questi auto-antigeni. Ciò suggerisce che una simile

strategia, attualmente esaminata in Pazienti con sclerosi multipla e artrite reumatoide, dà prova di essere realizzabile anche nel trattamento di IBD umana.

Il sistema immunitario intestinale è sicuramente importante perché esiste una relazione tra i linfociti intestinali e quelli di altri tessuti come polmoni, mammella. La migrazione delle cellule linfomonocitarie tra questi siti ha portato al concetto di sistema mucoso immune comune (24). Løaumentato numero di linfociti T cellulari nelle IBD suggerisce unøazione patogena mediata per via cellulare e nelløintestino infiammato vi è un massivo incremento del numero di plasmacellule rispetto a quello sano. Løincremento plasmacellulare fa quindi ritenere possibile il coinvolgimento anche dei meccanismi della immunità anticorpale oltre quella cellulo-mediata. Tuttavia sapere che nelle IBD (specialmente nella MC), l\(\alpha\)intestino sia infiltrato da cellule con caratteristiche immunitarie anche in assenza di evidenti lesioni endoscopiche, cliniche o morfologiche, non esaurisce il problema poiché sarebbe necessario conoscere come e quando queste cellule immunitarie diventino tossiche.

Løinfiammazione della mucosa nelle IBD, deriva da una cascata di eventi e processi iniziati dal riconoscimento di un antigene. Questa risposta antigene-mediata è diretta in modo appropriato contro un agente patogeno non ancora individuato oppure può essere una risposta inappropriata ad un antigene (batterico? virale?) non patogeno. Løepitelio intestinale inizia la risposta immune in linea generale attraverso due meccanismi: trasportando løinfiammazione attraverso løepitelio con il rilascio di citochine, chemiochine e altre sostanze proinfiammatorie oppure riconoscendo direttamente løantigene con unøazione simile a quella dei macrofagi (APC).

2.2 FATTORI AMBIENTALI

Læpidemiologia delle IBD non è facilmente conciliabile con lapotesi che fattori endogeni da soli siano la causa della malattia. Lævento iniziale e/o la promozione dellainfiammazione possono essere correlati ad una certa quantità di fattori esogeni. Per esempio, unalterata regolazione della risposta immunitaria può essere il risultato di unainfezione acuta. La possibilità che unalterazione sottile della regolazione immunitaria possa persistere a lungo anche dopo la risoluzione dellainfezione acuta, è sostenuta da studi recenti che mostrano come laincidenza dellatopia sia minore in individui che hanno avuto infezioni durante la prima infanzia. Patogeni o materiale microbico possono persistere nei tessuti, attivando in modo cronico il sistema immunitario. Il lume intestinale è un grande serbatoio di agenti microbici. Questi batteri commensali non sono patogeni e apparentemente non sono riconosciuti come estranei dal sistema immunitario (simili ad antigeni del self o del oself-estesoo) (25).

Tuttavia, i costituenti della parete cellulare e i prodotti rilasciati anche dalla normale flora batterica, possono avere una forte attività pro-infiammatoria. I cambiamenti della barriera mucosa, permettendo la traslocazione di batteri e macromolecole infiammatorie derivate dalla parete cellulare attraverso la mucosa, danno luogo alla infiammazione, nonostante løassenza di fattori aggressivi di patogenicità in questi batteri. Quindi, microbi di solito innocui potrebbero guadagnare virulenza con løacquisizione di fattori patogeni da altri batteri attraverso i plasmidi.

Possiamo considerare un certo numero di scenari in merito al ruolo dei fattori microbici nella immuno-patologia delle IBD. Un germe insolitamente aggressivo può causare løinfiammazione cronica grazie alla sua capacità di penetrare nella mucosa inducendo il rilascio

di mediatori pro-infiammatori e di persistere nel tessuto. Di solito gli organismi che causano infezioni intestinali acute come shigella, salmonella e campylobacter, vengono eliminati velocemente. Altri germi come Entameba Histolytica o Mycobacterium Tuberculosis, possono persistere a livello intracellulare, in particolare macrofagi, anche dopo la risoluzione dell\(\rho\)infiammazione acuta. Per esempio, il verificarsi di artriti reattive dopo parecchi mesi dalla risoluzione dellainfiammazione intestinale è stato attribuito alla distribuzione dei macrofagi nelle giunzioni, con microrganismi intracellulari vivi o materiale microbico. Un germe aggressivo può causare uno squarcio nella barriera mucosale, permettendo la penetrazione dei batteri della normale flora. Allo stesso modo unginfezione acuta può esacerbare un difetto della permeabilità, ereditato ma precedentemente subclinico. Un difetto intrinseco del sistema immunitario può diventare ovvio nel decorso di una infezione e determina løincapacità di risolvere løinfiammazione una volta che il patogeno è stato eliminato. I fattori microbici potrebbero alterare qualitativamente la risposta immune, per esempio inducendo una variazione nel bilancio tra citochine di tipo Th1 e Th2. Una inappropriata infiammazione può essere il risultato di un difetto della normale tolleranza verso la flora batterica intestinale. Fattori nelløintestino, in analogia a quanto accade nelle malattie autoimmuni.

Queste possibilità non sono necessariamente esclusive in modo reciproco ed è possibile che una malattia eterogenea come løBD possa includere una varietà di combinazioni di tali meccanismi ipotetici.

Una moltitudine di altri fattori esogeni non microbici quali fumo, antigeni del cibo o farmaci, sono stati tutti implicati nella patogenesi delle IBD. Ricerche future chiariranno la relativa importanza di queste influenze. Per quanto riguarda gli alimenti, nei sieri dei Pazienti affetti da MC, sono stati trovati anticorpi diretti contro vari antigeni alimentari, quali proteine del latte, della farina e del lievito di pane. Anche questo riscontro potrebbe essere conseguente al fatto che la mucosa intestinale infiammata presenta una permeabilità alterata che favorisce una più ampia esposizione dellørganismo agli antigeni alimentari, con successiva formazione di anticorpi. Tuttavia, il ruolo degli alimenti nelloindurre una flogosi della mucosa è stato avvalorato da studi che hanno evidenziato l

gefficacia della dieta elementare e polimerica nell

gindurre la remissione della malattia, e secondo alcuni autori løefficacia di tale dieta sarebbe paragonabile o addirittura superiore a quella della terapia steroidea. Un altro fattore che avvalora la tesi che gli alimenti possono indurre la flogosi nelle IBD è la crescente incidenza e prevalenza di tali malattie nei Paesi Occidentali, dove modificazioni dietetiche sostanziali introdotte negli ultimi anni, quali un maggior consumo di zuccheri raffinati a scapito di alimenti ricchi di fibre e la presenza sul mercato di prodotti sofisticati con additivi, indubbiamente fanno ipotizzare un ruolo degli alimenti nella patogenesi delle IBD, che tuttavia non è stato a tuttoggi documentato.

Relativamente al rapporto con il fumo, studi epidemiologici hanno documentato per la MC un aumento del rischio di insorgenza della malattia e un decorso clinico più impegnativo per i fumatori di sigarette. Nella RCU i soggetti più a rischio sono gli ex fumatori e i non fumatori. Løassociazione inversa in questo caso tra fumo e malattia ha tuttavia meccanismi complessi, legati ai possibili effetti della nicotina sulla secrezione di muco, sulla risposta immunitaria, sulløattività meccanica e sulla regolazione del circolo ematico locale.

Unøaltra associazione inversa fra colite ulcerosa e pregressa appendicectomia è un ulteriore elemento a favore della partecipazione di meccanismi immunitari, dato il ruolo dei follicoli linfatici delløappendice nella regolazione delløomeostasi immunitaria delløapparato digerente.

Anche fattori psicologici sembrano legati allainsorgenza delle IBD, infatti si ipotizza che i Pazienti affetti da queste malattie abbiano una personalità suscettibile ad eventi stressanti sul piano emotivo (26).

2.3 LA MALATTIA DI CROHN È UNA MALATTIA AUTOIMMUNE?

Nelle IBD il danno al tessuto è causato da una reazione infiammatoria impropria ed autodistruttiva, mantenuta anche in assenza di un patogeno specifico. Løinfiammazione auto-contenuta ed auto-distruttiva potrebbe essere considerata il segno caratteristico delloautoimmunità nel senso più ampio. Studi recenti hanno evidenziato meccanismi immuni autoantigene specifici, suggerendo la possibilità che le IBD possano essere veramente malattie autoimmuni. Alcuni anticorpi generati nelle IBD riconoscono antigeni del self, per esempio enterociti, cellule mucipare e caliciformi (27,28). La citotossicità dipendente dagli autoanticorpi contro le cellule epiteliali del colon è stata dimostrata *in vitro*, e nella RCU sono stati descritti fattori del complemento attivati localizzati con anticorpi anti-colon sulla superficie luminale delloepitelio.

Gli anticorpi antimucina e anti-cellule caliciformi mucipare potrebbero causare alterazioni allo strato mucoso protettivo di mucina determinando un aumento di aderenza dei batteri al lume intestinale. I pANCA sono molto comuni nella RCU. Comunque, løidentificazione di autoantigeni rivela che i pANCA nella colite ulcerosa e quelli

trovati nelle vasculiti autoimmuni riconoscono antigeni diversi. Sebbene i pANCA possano legarsi a proteine battericide che aumentano la permeabilità intestinale, l\(\phi\) assenza di pANCA in una significativa frazione di Pazienti con RCU, indica che essi non giocano un ruolo fondamentale nella patogenesi della malattia. Dal momento che simili pANCA si possono trovare in Pazienti con colangite sclerosante senza malattia intestinale e persino in alcuni individui sani, la produzione di questi autoanticorpi non pu\(\phi\) essere la causa della malattia, sebbene, come epifenomeno, essi possono essere indicativi del disturbo immunitario intrinseco nella colite ulcerosa. Pertanto, per la RCU, il significato dei pANCA \(\phi\) quello di marcatori di malattia, anche se la prova diretta che vi siano meccanismi autoimmuni nelle IBD rimane scarsa e controversa.

In condizioni normali il sistema immunitario non reagisce contro se stesso, sebbene cellule potenzialmente autoreattive vengono generate durante la maturazione timica. Cellule T auto-reattive che sono sfuggite alla delezione clonale nel timo esprimono un TCR con una affinità molto bassa per gli auto-antigeni immuno-dominanti oppure sono cellule *naive* che non possono penetrare attraverso causare il danno (ignoranza immunitaria). Le cellule che raggiungono il tessuto possono essere distrutte perifericamente attraverso la produzione della molecola Fas-ligando nel tessuto o attraverso un meccanismo TNF-dipendente. Løattivazione di cellule auto-reattive non si verifica normalmente poiché queste cellule di solito sono prive dei meccanismi IL2-dipendenti, essenziali per l\(\paramplificazione \) delle risposte T-cellulari (anergia). La maggior parte dei tessuti periferici è priva di tessuti linfoidi organizzati necessari per indurre una forte risposta infiammatoria qualora l\(\phi\) auto-reattivit\(\alpha\) sia attivata localmente. Il microambiente sembra anche determinare løattivazione di cellule auto-reattive: laddove lo sviluppo di una risposta di tipo Th1 sembra che dia løavvio ad alcune malattie autoimmuni, le cellule Th2 sono protettive. Pertanto, il normale equilibrio tra citochine Th1 e Th2 sembra deviare le cellule autoreattive dal loro antigene mutandole in cellule con attività õsoppressivaö (29) che deviano appunto le risposte auto-reattive piuttosto che causare danno (deviazione immunitaria).

Nelløintestino, alcuni di questi meccanismi possono non essere presenti. La normale mucosa intestinale contiene tessuto linfoide secondario. Løapoptosi mediata dal Fas non sembra ridurre il danno intestinale da attivazione di cellule T. Løespressione costitutiva del Fas-L e la resistenza alla apoptosi Fas-mediata tipica dei tessuti periferici õimmunologicamente privilegiatiö, è contrastata dalla espressione costitutiva di alti livelli di Fas e dall

gassenza di produzione di Fas-L da parte delle cellule epiteliali. Così, i meccanismi Fas-mediati possono causare danno tissutale nelleintestino piuttosto che prevenirlo (30). Nelle IBD, è plausibile che lo squilibrio osservato tra mediatori pro ed anti-infiammatori potrebbe invertire l

anergia delle cellule T auto-aggressive e potrebbe anche interferire con la õdeviazione immunitariaö, spingendo le cellule autoreattive verso un fenotipo più aggressivo. Inoltre, la normale induzione della õtolleranza oraleö ad antigeni esogeni sembra dipendere dallæquilibrio tra IL12 e TGF\u00e3. L\u00fannullamento della tolleranza, dovuta alla eccessiva produzione di IL12, aumenta la possibilità che un antigene esogeno che condivide i determinanti immunogenici con autoantigeni, non venga più a lungo ignorato, ma stimoli l\(autoimmunit\) à (õmimetismo molecolareö). Mentre cellule T non stimolate di solito adesione endoteliale permette in modo crescente il reclutamento di cellule T naive nella mucosa. Alcune di queste cellule T possono riconoscere autoantigeni che normalmente rimangono sequestrati nella mucosa, non sono presenti nel timo durante la maturazione e pertanto sono incapaci di indurre tolleranza. Løaumentata espressione di molecole MHC di classe II da parte di cellule epiteliali e l\(attivazione di cellule B nelle IBD probabilmente conduce ad una aumentata presentazione degli antigeni da parte di APC õnon professionaliö. quello delle APC õprofessionaliö presentando differenti peptidi precedentemente non immunodominanti (presentazione di antigeni õcripticiö). Ouindi. løassociazione delle IBD con malattie autoimmunitarie note e la frequenza di quelle omanifestazioni extraintestinaliö che condividono tutte le caratteristiche essenziali delle loro controparti idiopatiche e che sono esse stesse malattie autoimmuni, possono essere considerate prove indirette per il verificarsi di meccanismi autoimmuni nel contesto delle IBD. Riassumendo, lo autoimmunità e le IBD sembrano verificarsi insieme, sebbene la ragione della loro relazione causale non sia tuttora chiara. Per il momento il concetto che le stesse IBD possano essere malattie autoimmuni rimane ungipotesi.

2.4 LA MALATTIA DI CROHN COME MALATTIA INFETTIVA

Fin dal momento in cui la MC e la RCU furono descritte per la prima volta decenni fa, aveva ricevuto molta attenzione la potesi che le IBD potessero essere causate da un agente infettivo. Sebbene decenni di sforzi continui per isolare o quanto meno scoprire un microrganismo nel tessuto affetto da IBD siano falliti, il riconoscimento tardivo della Helicobacter Pylori come causa di malattia nella ulcera peptica, dimostra chiaramente che una relazione

tra i microrganismi noti e la malattia può eludere løattenzione dei ricercatori nonostante i considerevoli sforzi di trovarne le cause. Allo stesso modo un microrganismo non ancora identificato e che non cresce nei terreni di coltura convenzionale, può essere causa di IBD.

I dati epidemiologici che sostengono la trasmissibilità delle IBD, sono piuttosto controversi. I dati riguardanti gruppi di famiglie con riscontro occasionale di IBD, contrastano con l\(\text{\text{assenza}}\) apparente di un aumentato rischio per IBD nei parenti dei Pazienti o nel personale medico che tratta i Pazienti con IBD.

Le manifestazioni acute delle IBD si distinguono a malapena dalle infezioni intestinali. La patologia intestinale nella MC è quasi identica alle malattie infettive da *Yersinia Enterocolitica* o *Mycobacterium Tuberculosis*. Infezioni da *Campylobacter*, *Shigella*, *Amoeba* o Cytomegalovirus possono essere scambiate erroneamente con manifestazioni acute da RCU (31). Fino ad un certo punto ciò può riflettere il repertorio limitato dei meccanismi di difesa nellaintestino. Lo sviluppo di granulomi, caratteristica istologica tipica della MC, può indicare la persistenza di un microbo o di materiale microbico nel tessuto. Nelle artriti reattive è stata proposta la persistenza di fattori microbici per spiegare il protrarsi dellainfiammazione nelle giunture; allo stesso modo lainfiammazione nella MC potrebbe risultare dallattivazione protratta del sistema immunitario in questi granulomi.

Il Paramyxovirus (morbillo) sotto forma di particelle è stato descritto nellændotelio vascolare e nei granulomi della MC. Alcuni studi epidemiologici sembrano candidare il virus del morbillo come responsabile dellænduzione della risposta infiammatoria di tipo granulomatoso e vasculitico nella MC poichè persiste negli endoteli intestinali anche dopo la guarigione dal morbillo. Due studi epidemiologici provenienti dalla Svezia, hanno mostrato che la

presenza della MC prima dei 30 anni era associata con la nascita in zona di recenti epidemie di morbillo e che l'infezione da morbillo della madre durante la gravidanza era associata con l\(\text{gaumentato} \) rischio per il bambino di sviluppare la MC. Un possibile ruolo per i virus nella patogenesi della RCU viene suggerito dal ritrovamento aneddotico di corpi d\(\text{ginclusione} \) intranucleari e citoplasmatici in un tessuto di colon. Il virus di Epstein-Barr pu\(\text{o} \) essere isolato dal 75% dei Pazienti con RCU e i titoli anticorpali anti-CMV sono frequentemente aumentati in questi Pazienti. Inoltre, la lenta replicazione dell\(\text{gEBV} \) sembra capace di causare l\(\text{gattivazione} \) e la proliferazione di cellule T infette. Comunque, un\(\text{galta} \) ta percentuale di popolazione sana presenta l\(\text{ginfezione} \) da Herpes virus in modo latente.

Il *Mycobacterium Paratuberculosis* causa una malattia granulomatosa intestinale nei ruminanti che è molto simile alla MC nellouomo. I micobatteri persistono nei tessuti, causano malattie granulomatose e sono difficili da coltivare. Inoltre, i prodotti micobatterici hanno proprietà immuno-modulatorie (per esempio BCG, adiuvante di Freunds). Come potenziale fonte di infezione, il *Mycobacterium Paratuberculosis* è presente nel latte distribuito commercialmente e nelloacqua potabile. Inoltre, infezioni intestinali da *Mycobacterium Tuberculosis* possono apparire molto simili alla MC, sebbene la loro risposta al trattamento sia del tutto diversa.

Løisolamento di agenti microbici e løidentificazione di materiale microbico occasionalmente ha avuto successo. Comunque, metodi specifici ed altamente sensibili come la PCR non sono stati in grado di isolare nè di identificare un microrganismo come il virus del morbillo o il *Mycobacterium Paratuberculosis*. Pertanto løevidenza a supporto del ruolo di unøinfezione nelle IBD rimane controversa.

2.5 LA MALATTIA DI CROHN EØUNA MALATTIA AUTOIMMUNE INDOTTA DA INFEZIONE?

Sembra siano necessari fattori esogeni per scatenare le IBD. Microrganismi infettivi non specifici sono isolati da tessuti di IBD e lo stesso è vero per i tessuti infiammati nelle malattie autoimmuni. Tuttavia, sembra che alcune malattie autoimmuni siano scatenate da agenti infettivi che non sono più presenti quando la malattia si manifesta clinicamente (32). Le IBD possono avere inizio da un simile meccanismo, poichè i meccanismi autoimmuni risultano coinvolti nella patogenesi. Eø possibile che løinfezione stessa non venga scoperta e si manifesti come malattia autoimmune se il rivestimento della membrana cellulare con peptidi microbici viene riconosciuto da parte del sistema immunitario della cellula ospite come estranea.

I peptidi microbici potrebbero aptenizzare le proteine self sulle cellule ospiti che vengono riconosciute dal sistema immunitario come estranee (ipotesi dell'alterazione del self), una possibilità che è dimostrata dall'anduzione della colite con l'agente aptenizzante TNBS in un modello di IBD nel ratto. I peptidi microbici che condividono determinanti antigenici con proteine self inducono una risposta immunitaria di reattività crociata nel corso di un'anfezione (mimetismo molecolare). Il reclutamento delle cellule T con una aumentata diversificazione di antigeni porta al riconoscimento di altri epitopi sulla stessa proteina microbica, facendo diminuire la soglia di reattività crociata con le proteine ospiti (diffusione degli epitopi). Eø stata ipotizzata, ma non provata, la reattività crociata tra autoanticorpi nelle IBD con antigeni microbici.

 gruppi hanno trovato aumentati livelli di autoanticorpi anti-HSP60, anti-HSP65, cellule T HSP65-reattive nel sangue periferico ed aumentata espressione di HSP60 nelle IBD.

I cambiamenti nel profilo delle citochine osservati nelle IBD che alterano le proprietà funzionali delle cellule autoreattive attivate potrebbero essere indotti da un agente infettivo. Inoltre, le infezioni sono accompagnate da una aumentata espressione di molecole MHC di classe II su cellule epiteliali intestinali ed inducono l

espressione di molecole costimolatorie come osservato nelle IBD (33,34). Dal momento che l\(\text{gassenza} \) di molecole costimolatorie \(\text{è} \) cruciale nel mantenimento dell\(\textit{\rm auto-tolleranza mediante la promozione di anergia,} \) una prolungata alterazione della presentazione della antigene a causa di unginfezione potrebbe essere correlata a fenomeni autoimmuni osservati nelle IBD. Infine, i superantigeni derivati da batteri potrebbero attivare grandi sottopopolazioni di cellule T, inclusi i cloni autoreattivi. Løaumento di alcune sottopopolazioni di cellule T, per esempio TCR Vβ8+, è stata descritta nella MC e l\(\alpha \) lterata attività funzionale di queste sottopopolazioni suggerisce un possibile ruolo dei superantigeni nelle IBD. Alternativamente, se le cellule T regolatorie vengono eliminate in maniera non specifica attraverso l\(\phi\)interazione con i superantigeni, la insufficiente soppressione dei cloni autoreattivi potrebbe portare alla reattività autoimmunitaria.

La relazione tra IBD, infezioni intestinali, infiammazione extraintestinale reattiva e malattie autoimmuni fornisce una prova indiretta
dell'æsistenza di una connessione tra IBD, malattie infettive e malattie
autoimmuni. L'ærtrite reattiva è innescata da infezioni delle mucose
come da Salmonella, Shigella o Yersinia. L'ærtrite reattiva può
occasionalmente diventare cronica e quindi somigliare alla spondilite
anchilosante idiopatica e all'ærtrite assiale nelle IBD. L'æssociazione

genetica di tutte e tre le manifestazioni con lo stesso allele HLA B27 sembra suggerire un meccanismo patogenetico comune. Il ruolo dellaHLA B27 nella spondilite anchilosante è correlato alla capacità della molecola di favorire lainvasione di germi, di modellare il repertorio della cellula T alla presentazione di un peptide del self oartritogenicoo, o alla reattività crociata tra gli epitopi dellaHLA B27 con i peptidi microbici. Alcune famiglie di ratti transgenici per HLA B27 sembra che sviluppino spontaneamente artriti, anche se, in assenza di flora intestinale, negli animali allevati in un ambiente privo di germi, lainfiammazione non si verifica. In contrasto con la BD umana, questi animali sviluppano una infiammazione gastrointestinale che dipende egualmente dalla presenza della flora intestinale.

Sebbene questi dati concordano con il concetto che le IBD possano essere considerate malattie autoimmuni correlate a fattori microbici, la relazione tra løinfiammazione delle giunture e della mucosa intestinale è semplice. Per esempio è stata trovata unœlevata permeabilità intestinale in Pazienti con artrite reattiva e spondilite anchilosante. In un modello animale sperimentale l\(\partrite\) reattiva \(\partrite\) il risultato di un *overgrowth* batterico nel piccolo intestino che sembra portare ad una aumentata capacità di assorbimento di macromolecole peptidoglican-polisaccaridiche (PG-PS) prodotte da batteri anaerobi. La stessa macromolecola, iniettata nella parete intestinale, porta ad una infiammazione intestinale granulomatosa che somiglia alla MC. Løinfiammazione cronica recidivante in questo modello è mediata dalle cellule T, ma dipende dalla persistenza di PG-PS nei tessuti e dal rilascio protratto da parte del fegato, non da un processo autoimmune, nonostante la prova indiretta di una possibile relazione con le malattie autoimmuni.

CAPITOLO 3

CONTRIBUTO CLINICO-SPERIMENTALE

Løinfiammazione della mucosa intestinale nella Malattia di Crohn è lænd point di una cascata di eventi e processi che iniziano da una stimolazione antigenica. La risposta antigene-mediata potrebbe essere quella appropriatamente diretta contro un patogeno non riconosciuto, oppure una risposta inappropriata verso un antigene altrimenti innocuo della normale flora batterica intestinale, in un ospite geneticamente predisposto (35). Løintegrità della mucosa intestinale dipende dalla coordinazione funzionale tra epitelio, germi luminali e locale sistema immune. Il SI è organizzato nel riconoscimento, innato e adattativo, degli antigeni microbici, una capacità di difesa che deve essere in equilibrio con il danno tissutale prodotto dalla attività immunitaria, per preservare la normale funzione intestinale. Le IBD riflettono una anomalia di tale equilibrio, combinata con il tratto genetico delløspite che sbilancia la funzione immunitaria dell'epitelio verso i comuni germi commensali. Vanno dunque presi in considerazione: a) la risposta innata contro i germi, incentrata sul genotipo, come predittore di suscettibilità, prognosi e risposta terapeutica della malattia; b) la risposta adattativa antimicrobica; c) il meccanismo autoimmune delle IBD (36,37).

3.1 INTRODUZIONE

Di recente è stata descritta una mutazione del gene NOD2/CARD15 che sembra responsabile della suscettibilità genetica alla MC. I geni implicati ne determinerebbero il fenotipo clinico, i sintomi gastrointestinali, le MEI, la risposta al trattamento e la

tossicità farmacologica. Le mutazioni del gene NOD2/CARD15 sono associate alla MC ileale con fenotipo fibrosante-ostruttivo, ma non sembrano influenzare la risposta al trattamento con Infliximab. Anche certi aplotipi HLA sono associati a forme di IBD più aggressive ed estese, ivi comprese MEI quali uveiti ed artriti (38,39,40).

Il gene CARD15 codifica per un complesso di molecole che giocano un ruolo importante nella apoptosi cellulare e che agiscono come recettori citoplasmatici delløLPS attraverso løattivazione di NFkB, che è un fattore di trascrizione nucleare ubiquitario. I linfociti Th1 producono TNFα, citochina coinvolta nella flogosi attraverso løinduzione della apoptosi e løattivazione delløNFkB. LøNF-kB è localizzato nel citoplasma delle cellule quiescenti in forma inattiva complessato a specifiche molecole inibitorie ed, løattivazione da parte di svariati stimoli, tra cui il lipopolisaccaride batterico, il TNFα e løL1α, transloca nel nucleo dove promuove la trascrizione di vari geni coinvolti nella risposta infiammatoria immuno-mediata (41,42), nella difesa delløspite nella sopravvivenza cellulare (43). Løattivazione delløNF-kB è stata dimostrata nelle cellule della mucosa gastrica di Pazienti affetti da IBD, ed in particolare nella MC (44) e la sua inibizione è uno dei meccanismi attraverso cui i corticosteroidi (45) ed altri agenti antiinfiammatori (46) esercitano il proprio effetto in questo tipo di patologie.

Molti Pazienti con MC presentano mutazioni in NOD2, una molecola che può sia attivare sia attenuare gli effetti proinfiammatori dellaNFkB. Recenti studi implicano laubiquitinazione NOD2-indotta del complesso regolatore NEMO dellaNFkB come potenziale meccanismo di modulazione del segnale dellaNFkB (47). La

variazione genetica di NOD2 è associata alla suscettibilità alla MC. NOD2 e il suo omologo NOD1, sono membri di una famiglia di fattori citosolici relati al modulatore APAF1 dell'apoptosi. NOD1 e NOD2 conferiscono responsività alløLPS ed interagiscono con RICK, un mediatore dellattivazione dellaNFkB. Essi regolano la risposta delløspite ai patogeni, un processo che può fallire in certe malattie infiammatorie (48). A conferma di quanto detto, la MC sembra essere caratterizzata da un danno a carico delle difensine umane 2 e 3 normalmente espresse nella mucosa del colon. La loro deficiente induzione potrebbe essere dovuta a variazioni nella trascrizione intracellulare da parte delløNFkB e del recettore intracellulare NOD2, dei batteri alla mucosa nelle IBD e con la ricorrenza di altre infezioni. Lápotesi di unattività antibatterica mucosale danneggiata coesiste anche con læffetto benefico derivante dalla terapia antibiotica nelle IBD (49).

Il ruolo della flora enterica interagisce con fattori genetici ed ambientali culminando nell¢attivazione sostenuta della risposta immune mucosale, facilitata anche dal deficit della barriera epiteliale e del SI mucosale. Ciò determina la flogosi attiva e la distruzione tissutale. Di norma, la mucosa intestinale è in uno stato di equilibrio tra citochine proinfiammatorie quali TNFα, IFNγ, IL1, IL6, IL12 ed anti-infiammatorie quali IL4, IL10, IL11. Il SI mucosale è l¢effettore centrale di flogosi e danno e le citochine sono i modulatori (50).

Studi sulla MC hanno dimostrato la predominanza dell'attivazione, nella mucosa intestinale, dei linfociti Th1, attraverso l'aumentata produzione di citochine proinfiammatorie quali IL1β, IL6 e TNFα. Il SI è il maggiore determinante della fisiopatologia delle

IBD e le citochine sono i mediatori del sistema stesso. Le più recenti acquisizioni sulle citochine proinfiammatorie ed il loro ruolo nelle IBD hanno condotto allo sviluppo di un potenziale approccio terapeutico per manipolare queste citochine e quindi inibire løinfiammazione nelle IBD. Tali approcci terapeutici includono gli inibitori del TNFα, della golarizzazione leucocitaria, della polarizzazione Th1-cellulare, dell'attivazione T-linfocitaria e la NFkB, nonchè l\(a\)immunoregolazione di citochine e fattori di crescita. Gli studi su queste terapie hanno documentato variabili risultati e siamo ancora in attesa dellesito di molti trials clinici. Se queste potenziali terapie diventano reali, potranno rivoluzionare løapproccio al Paziente con IBD. Løanalisi della mucosa infiammata di Pazienti con IBD rivela una incrementata espressione di citochine proinfiammatorie. Specie il TNFα è importante nel reclutamento dei neutrofili dai tessuti infiammati, un processo che risulta da tre fisiologici steps: migrazione arruolamento, adesione transendoteliale. comprensione dei meccanismi biologici alla base della infiammazione cronica ha esteso la disponibilità delle terapie per le IBD ed in particolare per la MC. Al momento, le terapie biologiche utilizzate nella pratica clinica delle IBD, sono prevalentemente proteine, di solito somministrate endovena o per via sottocutanea. Le terapie disponibili includono: 1. inibitori del TNFa, quali Infliximab, CDP571, Etanercept, Onercept, CNI-1493 e Talidomide; 2. inibitori delløattivazione linfocitaria: Natalizumab, LPDO2 ed ICAM1; 3. inibitori della polarizzazione Th1: anticorpi monoclonali verso IL12, IFNy ed anti-IFNy; 4. citochine immunoregolatorie quali IL10 ed IL11; 5. inibitori dellaNFkB; 6. fattori di crescita come Epidermal GF e Keratinocyte GF (51, 52).

Di recente, il trattamento con Infliximab è stato introdotto per i Pazienti con MC che non rispondono alle terapie convenzionali (53,54). Løinibizione del TNFα ha dato buoni risultati clinici e rappresenta un promettente approccio terapeutico (55,56). Pur tuttavia, dopo un decennio dalløapprovazione delløInfliximab da parte della FDA nel trattamento della MC, ancora non si conosce il meccanismo attraverso cui esso determina la riduzione della flogosi (57,58,59).

3.1 OBIETTIVI DELLO STUDIO

I targets terapeutici della MC sono basati sui progressi nella comprensione dei meccanismi immunopatogenetici. La MC ha inizio da una risposta della immunità innata, che media processi Th1-dipendenti attraverso la produzione di citochine. Siccome le IBD rappresentano uno stato di infiammazione impropria e de-regolata, i farmaci che aumentano la risposta antinfiammatoria sono in grado di modificare il decorso della malattia. Il TNF α è il principale target della ricerca e della sperimentazione clinica, dato il suo ruolo di effettore pro-infiammatorio nella mucosa intestinale come citochina nella cascata infiammatoria.

Come precedentemente detto, la maggior parte dei casi di IBD risponde favorevolmente ai trattamenti antinfiammatori e/o immunosoppressivi. I composti delløacido 5-amminosalicilico e gli steroidi vengono spesso utilizzati per il trattamento delle IBD. Tuttavia, non tutti i Pazienti rispondono a questo trattamento e gli effetti collaterali dose-dipendente degli steroidi sono sicuramente i principali ostacoli terapeutici.

Agenti immunosoppressivi come Azatioprina e Ciclosporina A esibiscono seri effetti collaterali, mentre l\(\text{ganticorpo anti-TNF} \) \(\text{è usato} \)

con successo nella MC e nella RCU. Questøapproccio, in ogni modo, non è privo di effetti collaterali ed è sicuramente molto costoso. I numerosi e continui studi che si stanno effettuando sono pertanto mirati ad identificare nuovi agenti antinfiammatori e/o immunosoppressivi con minore tossicità, che possano essere utilizzati singolarmente o in combinazione con i farmaci menzionati.

Løacido fusidico e il suo sale sodico (fusidin), sono antibiotici con minima e reversibile tossicità usati per combattere le infezioni da Stafilococco. In vari esperimenti di laboratorio si è mostrato che il fusidin ha potenti effetti immunomodulatori causalmente collegati con la sua capacità di sotto-regolare la produzione di citochine proinfiammatorie come løIFN, løIL2 e il TNF e di sovra-regolare la produzione di citochine antinfiammatorie come løIL6 e løIL10. Il fusidin migliora il decorso di malattie immunoinfiammatorie come løuveite cronica, la malattia di Bechet, il diabete di tipo 1, la sindrome di Guillain-Barré, løepatite, la sepsi, la sclerosi multipla e la sclerodermia in modelli umani e animali. Il suo effetto benefico è stato osservato anche in uno studio pilota condotto sulla MC.

I modelli animali di malattie umane forniscono strumenti utili per una migliore comprensione dei meccanismi patogenetici coinvolti e possono portare a delucidazioni per nuovi approcci terapeutici nellapplicazione clinica sullauomo. Macroscopicamente gli animali presentano danno ulcerativo esteso con rossore, edema, ulcerazioni regionali, aree di lesioni ed aumento del peso del colon che è noto essere in relazione con la severità delle lesioni macroscopiche. Dal punto di vista istologico queste lesioni sono caratterizzate da aree multifocali di necrosi, infiammazione e fibrosi. Così come nella corrispondente patologia umana, la colite indotta nei ratti sembra essere dipendente dalle cellule T e dai macrofagi con massiva

produzione di citochine proinfiammatorie di tipo 1, come ad esempio il TNF, che pare siano implicate nell'etiopatogenesi della malattia.

I modelli animali (60) consentono lo studio della fisiopatologia delle malattie prima delleinsorgenza clinica delle stesse, rendendo possibile la manipolazione genetica ed immunologica di geni presumibilmente coinvolti nella patogenesi della malattia. Eø così possibile testare nuovi approcci terapeutici. Le strategie terapeutiche anti-citochine, incentrate sul TNF, sono state alquanto promettenti. Tuttavia, proprio recenti studi su modelli animali lasciano presupporre il coivolgimento delle citochine gp130 nella resistenza alla apoptosi dei linfociti T CD4⁺ della lamina propria. Il blocco dell'anterazione tra IL6 con la forma solubile del suo recettore (sIL6-R) è stato dimostrato essere efficace quanto il blocco del TNF in modelli sperimentali di IBD. Altre strategie anti-citochine supportate da studi su modelli animali includono il blocco di citochine prodotte dai linfociti Th1, come IFNy, IL12 e IL18. I modelli animali di ratti sono quelli più utili, in quanto il genoma dei ratti è stato totalmente codificato, per cui essi riproducono fedelmente le caratteristiche patogenetiche della malattia umana del Crohn, consentendo lo sviluppo di flogosi intestinale spontanea, senza ricorrere a manipolazioni genetiche nè immunologiche.

In considerazione di quanto detto, obiettivo del nostro studio è valutare le modificazioni di alcuni parametri infiammatori immunomediati, quali la produzione di TNFα da parte delle cellule mononucleate prelevate dal sangue periferico (PBMC) e l\(\textit{gattivazione}\) dell\(\textit{gNFkB}\) nella mucosa intestinale di Pazienti con MC trattati con Infliximab. L\(\textit{gobiettivo}\) finale è quello di identificare le correlazioni biologiche della risposta clinica alla terapia con Infliximab.

3.2 PAZIENTI E METODI

La nostra ricerca sperimentale ha coinvolto 12 Pazienti affetti da MC che sono stati sottoposti a trattamento con Infliximab secondo un protocollo predefinito. La nostra casistica comprende 7 uomini e 5 donne, di età compresa tra 30 e 70 anni (media 49 anni ó tabella I). Di questi, 1 Paziente aveva la malattia solo in sede colica, 6 a livello del piccolo intestino e 5 in ambo le sedi. Dei Pazienti, 2 avevano fistole perianali, 2 entero-enteriche, 1 entero-vescicale ed 1 entero-vaginale. La durata media della malattia prima di iniziare il trattamento con Infliximab era di 10.3 anni, con un range compreso tra 1 e 34 anni.

Per valutare la risposta clinica al trattamento con Infliximab abbiamo utilizzato il Crohnøs Disease Activity Index (CDAI) (61). Tutti i Pazienti coinvolti nello studio avevano la MC in forma attiva con un CDAI > 250 (media: 365; range: 261-492). Sette Pazienti avevano artralgia, con coinvolgimento di parecchie articolazioni.

Prima del trattamento con Infliximab, 10 Pazienti assumevano steroidi (metilprednisolone ad un dosaggio medio di 10 mg per os) ed 1 Paziente mesalazina. Gli steroidi sono stati sospesi con dosaggio a scalare, così pure la mesalazina, prima dell'anizio delle infusioni di Infliximab.

Tutti i Pazienti sono stati sottoposti a screening per la tubercolosi attraverso løanamnesi, lo skin-test alla tubercolina e løRx del torace (62).

In tutti i Pazienti, loInfliximab è stato somministrato ad un dosaggio di 5 mg/kg. I 2 Pazienti con fistola perianale e quello con fistola enterovesciale sono stati trattati con una dose iniziale al tempo T0 e con un successivo timing di infusione a 0-2-6 settimane, mentre gli altri Pazienti a 0-8-12 settimane, senza la dose iniziale. I Pazienti che hanno presentato una risposta clinica favorevole alla infusione

iniziale (definita per una riduzione pari ad almeno 70 punti del CDAI), hanno proseguito il trattamento con Infliximab ad intervalli di 8-10 settimane per 1 anno e sempre allo stesso dosaggio di 5 mg/kg. La risposta clinica è stata valutata durante i primi due mesi di terapia e durante un periodo di follow-up di 10 mesi in media (range: 3-18 mesi). I parametri di laboratorio presi in considerazione ó emocromo, transaminasi, creatinina, VES, PCR, α1-glicoproteina acida, ferritina, fibrinogeno ó sono stati dosati prima e durante il trattamento. I campioni di sangue per lo studio immunologico sono stati prelevati a tempi differenziati prima, durante e dopo la prima infusione di Infliximab (tabella II). Le biopsie sono state ottenute durante colonscopia con ileoscopia retrograda, su aree in fase di attività infiammatoria di colon o ileo terminale, prima del trattamento al tempo T0 e dopo 10-12 settimane al tempo T3. Prima di essere processate, le biopsie sono state congelate e conservate in azoto liquido.

<u>Separazione di PBMC.</u> I campioni di sangue prelevato dai Pazienti sono stati eparinizzati e le cellule mononucleate del sangue periferico sono state ottenute attraverso la centrifugazione in gradiente di densità in Ficoll-Isopaque (Lymphoprep R, Nycomed AS, Norway), secondo il metodo descritto da Boyum *et al*.

Dosaggio del TNFα. Le PBMC sono state poste in coltura in un mezzo completo (RPMI 1640 con FCS al 5%), in atmosfera umidificata al 5% di CO, con PHA-M (GIBCO) al 5% o con LPS (100 ng/ml), ad una concentrazione di 20000 cellule/ml. Dopo 48 ore, sono stati prelevati i sopranatanti delle colture attraverso centrifugazione ed analizzati per il dosaggio del TNFα attraverso l¢ELISA (Endogen, Woburn, MA. USA). Il dosaggio minimo rilevabile di TNFα è stato di

8 pg/ml. Le variazioni di dosaggio e tra un dosaggio e l\(\text{altro sono} \) state < 10%. Tutti i campioni sono stati dosati nello stesso giorno.

Preparazione degli estratti cellulari. Le PBMC sono state lavate due volte ed i pellets sono stati ottenuti attraverso centrifugazione a 200 giri per 10 minuti. Il pellet così ottenuto è stato sospeso di nuovo in 75 ml di un buffer freddo (MgCl 1 mM, NaCl 350 mM, HEPES 20 mM, EDTA 0.5 mM, EGTA 0.1 mM, DTT 1 mM, Na4F2O3 1 mM, PMSF 1 mM, aprotinino 1.5 mM, leupeptina 1.5 mM, inibitore della fosfatasi II 1%, glicerolo 20%, NP-40 1%), vortexato per 10 secondi e, dopo 30 minuti in ghiaccio, centrifugato per 15 minuti a 20000 giri a 4°C. Il sopranatante è stato usato come estratto cellulare. Le biopsie sono state sfaldate e trattate allo stesso modo.

Analisi di NFkB (subunità RelA) e suoi inibitori IkBα ed IkBγ attraverso Western blot. Gli estratti cellulari alla stessa concentrazione proteica, sono stati distesi su gel di poliacrilamide al 7.5%. Le proteine sono state trasferite per elettroforesi su membrane che poi sono state messe ad incubare con anticorpo anti-RelA, Ikbα ed IkBγ. Successivamente alla incubazione con un anticorpo secondario, sono stati sviluppati ed acquisiti gli immunoblots per chemi-fluorescenza con fosforo. Løintensità delle bande è stata quantizzata direttamente attraverso un ImageQuant Software il quale riporta il volume integrando løarea della banda con la sua densità (63).

Studio immunoistochimico. Per il dosaggio immunoistochimico, abbiamo usato la tecnica della immunoperossidasi indiretta con un pannello di anticorpi monoclonali specifici diretti verso CD45 (antigene leucocitario comune), CD8, CD4, CD68 (macrofagi), CD79a (linfociti B), CD138 (plasmacellule). Tutte le biopsie, dello spessore di circa 4 μ , sono state fissate in paraformaldeide 4% per 8

ore ed immerse in paraffina. La procedura è consistita nella reidratazione delle biopsie dopo rimozione della paraffina e successiva applicazione di Perossido di Idrogeno per 5 minuti. L\(\phi\)anticorpo primario (o controllo negativo) è stato incubato per 10 minuti ed i campioni così ottenuti sono stati processati, in successione, con un anticorpo secondario biotinidilato per 10 minuti, streptavidina-HRP per 10 minuti, ed in soluzione per 5-10 minuti. Il conteggio delle cellule positive è stato fatto al microscopio ottico ed i risultati sono stati espressi in numero di cellule positive/mm2.

Analisi statistica. Løanalisi statistica è stata fatta con il test T di Student ed il livello di significatività è stato posto per un p < 0.05.

Consenso etico. Tutte le procedure sui Pazienti sono state espletate secondo la Dichiarazione di Helsinki. Il protocollo di studio è stato approvato dalla commissione etica locale (64).

3.3 RISULTATI

Il decorso clinico dei Pazienti è decritto nella tabella III. Dei 12 Pazienti trattati: 1 ha interrotto la terapia a causa di una reazione verificatasi durante la seconda infusione; 2 non hanno mostrato una risposta clinica significativa allainfusione iniziale, e di cui uno è stato poi sottoposto ad intervento chirurgico per fistola entero-vescicale; 10 hanno avuto una buona risposta clinica (83%) ed 8 di questi sono stati sottoposti a terapia infusionale di mantenimento ogni 8 settimane. Di questi 8 Pazienti, solo in 1 si è verificata una ripresa di malattia dopo 11 mesi di terapia di mantenimento, mentre negli altri 7 la remissione clinica si è mantenuta fino alla fine del periodo di follow-up, con un significativo miglioramento anche delle manifestazioni articolari, quando presenti.

Nella maggioranza dei casi løinfusione di Infliximab è stata ben tollerata. Come confermato da Rutgeerts et al (65), nei Pazienti con MC con sede luminale, è stata efficace una singola infusione di 5 mg/Kg; nella forma fistolizzante è stato adottato il protocollo delløinfusione iniziale seguita da altre tre infusioni successive. Siccome i Pazienti presentavano recidiva se non ri-trattati, è stato necessario løimpiego di una strategia a lungo termine. Løapproccio ogni 8 settimane è risultato ottimale. Il protocollo di mantenimento ha ridotto løinsorgenza di complicazioni, ospedalizzazione e chirurgia.

I valori medi di VES, PCR, α1-glicoproteina acida e del CDAI si sono enormemente ridotti ed in maniera significativa già durante i primi mesi di trattamento (figura 1), anche se i valori di PCR sono aumentati a 4 mesi. Valori più alti di PCR durante la fase di attività della malattia sembrano comunque associati ad un decorso clinico più severo, come dimostrato da studi successivi al nostro (66). La PCR ha una breve emivita e quindi è elevata subito dopo loinsorgenza della flogosi e rapidamente decresce dopo la sua risoluzione, per cui è un marker di attività di malattia. Inoltre il suo dosaggio è economico, facile da eseguire e non influenzato da terapia. La VES è di più facile determinazione, anche se il suo valore dipende da età, anemia, fumo e farmaci. Inoltre la sua utilità è limitata dalla lunga emivita e dal periodo di latenza prolungato anche dopo le modificazioni dell'attività di malattia. I marcatori fecali hanno invece il vantaggio di essere più specifici nella diagnosi di IBD, come la maggiore quantità di leucociti nelle feci e la stretta correlazione tra calprotectina fecale e leucociti marcati con 111Indio. Anche la lattoferrina fecale è un utile marcatore, anche se meno utilizzata (67).

Løanalisi delløemocromo (68) ha dimostrato un lento, ma significativo (p<0.02) incremento delløHCT e delløHb (figura 2).

Il numero di cellule infiammatorie nella mucosa intestinale, come dimostrato attraverso lo studio immunoistochimico sulle biopsie ottenute prima e dopo il trattamento, si è notevolmente ridotto (p<0.002) grazie alla terapia con Infliximab (figura 3).

La produzione di TNF α da parte di PBMC stimolate con LPS ha subito minori variazioni durante il trattamento, mentre la stimolazione con PHA ha indotto un incremento nella produzione di TNF α dopo la prima somministrazione, fino a valori molto più alti rispetto al tempo di pre-trattamento (figura 4A-B). Tuttavia, analizzando solo i Pazienti che hanno ricevuto anche una dose iniziale, è stato riscontrato un decremento nella produzione di TNF α dopo stimolo con LPS già durante la terapia con Infliximab (figura 4C).

Nei Pazienti 1 e 2 i diversi componenti della famiglia delløNFkB sono stati studiati negli estratti citoplasmatici di cellule intestinali prelevate da frammenti bioptici ai tempi T0 e T3 e da PBMC a tutti i tempi (figure 5 e 6). I dati mostrano il paragone tra i livelli individuali di TNFα e i valori di CDAI, VES, PCR ad ogni timing. Løanalisi dei componenti della famiglia delløNFkB dosati su PBMC ha mostrato in entrambi i Pazienti un pattern ad andamento simile al trend del TNFα prodotto dalle stesse cellule, mentre nelle biopsie, i valori di IkBα e IkBγ sono incrementati al tempo T3 solo nel Paziente 1 (figura 5).

In altri 4 Pazienti, løanalisi del Western blot per i componenti della famiglia delløNFkB è stata effettuata solo sugli estratti cellulari delle biopsie intestinali ai tempi T0 e T3. RelA non si è modificato in maniera significativa dopo il trattamento. Døaltro canto, løincremento dei livelli di IkBα ed IkBγ è stato osservato in 5 Pazienti (figura 7).

Uno studio successivo al nostro ha quantificato la produzione di citochine di fase acuta T-dipendenti in biopsie di Pazienti con RCU ed in PBMC trattate con PHA *in vitro*, nonchè lønfluenza *in vitro* dellønfliximab su PBMC trattate con PHA. LøL6 è stata la citochina maggiore riscontrata nelle biopsie intestinali di mucosa infiammata e nelle PBMC stimolate, seguita dal TNFα, IL1β ed INFγ. TNFα non è stato trovato nelle biopsie dopo trattamento con Infliximab. Lønfliximab non induce riduzione di TNFα nè di IL1β, ma riduce IFNγ, IL6 e IL2. Il modello *in vitro* di PBMC stimolate con PHA riproduce il processo infiammatorio osservato *in vivo* (69).

Questi risultati suggeriscono che il trattamento con Infliximab riduce i segnali che conducono alla distruzione degli inibitori della NFkB, nonchè la infiammazione in vivo attraverso la inibizione della attivazione sia dei monociti che dei linfociti T.

3.4 DISCUSSIONE

Løanalisi della risposta clinica in questo gruppo di Pazienti conferma løfficacia del trattamento con Infliximab in Pazienti affetti da MC in fase attiva ed in forma fistolizzante, nonchè della terapia di mantenimento con infusioni ad intervalli di 8 settimane.

Il trattamento con Infliximab è uno stimolo molto potente alla induzione ed al mantenimento della remissione della malattia di Crohn in fase di attività da moderata a severa, nonchè per la riduzione del numero di fistole (70). Comunque, la durata della risposta è variabile ed in molti Pazienti può essere solo di poche settimane, richiedendo ripetute infusioni. Inoltre, sebbene il farmaco non sembri avere tossicità per somministrazioni a breve e medio termine, anche løincidenza degli effetti collaterali a lungo termine non è conosciuta.

Lanfliximab è efficace nella indurre remissione e risposta clinica, riparazione della mucosa e riduzione della colectomia a breve termine anche nei Pazienti con RCU da moderata a severa, refrattaria alle terapie convenzionali con steroidi ed immunosoppressori (71).

La rilevanza dei meccanismi etiopatogenetici sugli effetti clinici della terapia con Infliximab deve ancora essere chiarita, in quanto alcune MEI come artrite, pioderma gangrenoso, uveite, colangite sclerosante primaria, seguono un decorso clinico indipendente dalla attività di malattia. Tuttavia i dati preliminari sul follow-up dei Pazienti ne hanno mostrato comunque il netto miglioramento (72).

Come studiato da Siemanowski B et al (73), le MEI con decorso parallelo alla flogosi intestinale quali artrite periferica, pioderma gangrenoso, eritema nodoso ed episclerite, generalmente rispondono alla infliximab, mentre quelle indipendenti dalla attività di malattia sono più difficili da trattare. Spondilite anchilosante, uveite e colangite sclerosante primaria hanno una risposta variabile. La infliximab è efficace per la veite ed è stato approvato dalla FDA per la spondilite anchilosante. Non si sa se la terapia a lungo termine è necessaria per mantenere la remissione delle MEI. La FDA ha inoltre approvato una terapia anti-cellule B, il Rituximab ed un modulatore della costimolazione T-cellulare, la Abatacept, da impiegare nella artrite e nella psoriasi (74).

Sebbene l\(\textit{gavvento dell\(\textit{d}\)Infliximab abbia modificato i termini ed i canoni di trattamento delle IBD, esso non costituisce comunque una cura per la malattia stessa e l\(\textit{gimmunogenicit\)\(\textit{a}\) dell\(\textit{ganticorpo}\) chimerico anti-TNFα \(\textit{e}\) associata alla secondaria perdita di risposta ed intolleranza. Nella RCU, l\(\textit{gefficacia dell\(\textit{gInfliximab}\)\)\(\textit{e}\) stata dimostrata in due trials clinici, ma i dati sull\(\textit{gefficacia nel mantenimento a lungo termine sono ancora carenti. Sebbene il rapporto beneficio/rischio per

lønfliximab sia più che positivo, lønmunogenicità ascritta alle proprietà chimeriche del farmaco rimane un problema. La formazione di anticorpi anti-Infliximab nel siero è associata a reazioni allergiche e perdita di risposta. Il trattamento immunosoppressivo con steroidi prima dellønfusione di Infliximab ne ottimizza la risposta, prevenendo la formazione di anticorpi. Forse la migliore strategia per evitare lønmunogenicità è mantenere la terapia e, in caso di recidiva, lønfliximab andrebbe ri-somministrato come terapia di mantenimento a lungo termine (75).

Riguardo la sicurezza a lungo termine, è incluso il rischio di sviluppo del cancro, in particolare di linfoma, che potrebbe essere dovuto a cronicizzazione o severità di malattia, terapie concomitanti come gli immunomodulatori o lanfliximab stesso. Al momento, i dati disponibili non forniscono una chiara evidenza della associazione causale tra Infliximab ed aumentato rischio di cancro. In Pazienti appropriatamente selezionati con MC severa e refrattaria, i benefici della terapia biologica superano il rischio di cancro, anche se sono ancora necessari studi multicentrici e caso-controllo su vasta scala con un follow-up a lungo termine per definire lavoluzione dei Pazienti affetti da MC trattati con Infliximab (76).

Nuovi agenti biologici sono entrati nella pratica clinica: nella MC sono in fase di sperimentazione con promettenti risultati in trials controllati, løAdalimumab (IgG1 umano monoclonale anti-TNF α), il Natalizumab (IgG4 umano anti-integrina4) ed il Certolizumab (frammento Fab peghilato umanizzato) (77), nonchè altri agenti che inibiscono il feed-back IL12/IFN γ , løanticorpo monoclonale anti-RIL6, gli inibitori delle molecole di adesione e GF, anche se la

capacità immunomodulatoria di questi agenti biologici necessita di un rigoroso follow-up (78,79).

Il preciso meccanismo attraverso cui agisce questo antagonista del TNFα per il tramite di una down-regolazione sulla infiammazione della mucosa intestinale, non è chiaro. Si è pensato alla neutralizzazione del TNFα solubile e legato alle membrane cellulari oppure alla induzione della apoptosi di linfociti e monociti attivati. Il deficit della apoptosi delle cellule mucosali svolge un ruolo patogenetico rilevante e laInfliximab induce apoptosi nei linfociti T effettori e nei monociti attivati. Questo meccanismo richiede il blocco del TNFα che, attraverso una cascata di segnali di trasduzione, conduce alla morte cellulare programmata, anche se altri meccanismi contribuirebbero alla effetto clinico della anti-TNFα. Laidentificazione dei meccanismi che prevengono lapoptosi nella mucosa con IBD è ancora il target della strategia terapeutica (80).

Le variazioni della capacità di produrre TNF α da parte delle PBMC in Pazienti trattati con Infliximab lasciano spazio a non poche controversie in merito. Cornillie *et al* (81) hanno descritto l\(\text{\text{assenza}} \) della soppressione del SI in Pazienti trattati con Infliximab, ed in particolare nessuna variazione nella produzione di TNF α da parte di PBMC stimolate con Concanavalina A ed acetato forbolo miristato. Al contratio, Nikolaus *et al* (82) hanno riportato un notevole decremento della produzione di TNF α da parte di PBMC stimolate con LPS, già dopo 24 ore dalla singola infusione dell\(\text{\text{anno tratio}} \) monoclonale.

I nostri risultati, ottenuti in Pazienti sottoposti a trattamento convenzionale e ripetuto, suggeriscono che $| \alpha |$ Infliximab potrebbe interferire con la produzione di TNF α da parte delle PBMC. I dati ottenuti con il nostro studio, sebbene differenti a seconda della

stimolazione impiegata in grado di attivare selettivamente linfociti (PHA) o monociti (LPS), ed a seconda che i Pazienti siano stati trattati o meno con una dose iniziale, confermano i risultati di Nikolaus *et al* evidenziando che løincrementata produzione di TNFα da parte di PBMC dopo 10-12 settimane di terapia, potrebbe precedere la ricorrenza clinica dei sintomi.

Il Fattore di trascrizione NFkB gioca un ruolo cruciale nella infiammazione mucosa dei Pazienti con MC. Eøun fattore ubiquitario presente nel citoplasma di cellule non stimolate in forma inattiva: un complesso formato dalla subunità RelA (p65) e la subunità p50 (la forma più comune) con la famiglia degli inibitori denominati IkBs (83). Diversi IkBs sono stati descritti: IkBα, β, γ, ε, Bcl3, p105, p100.

Attraverso løattivazione di uno stimolo, quale TNFα, LPS, IL1 o molti altri, la IkB-chinasi fosforila IkBs in specifici siti, con successiva degradazione di Ikbs, e løNFkB migra nel nucleo dove induce løattivazione di geni che codificano per citochine proinfiammatorie. Eø stato evidenziato che molti farmaci impiegati nel trattamento delle malattie infiammatorie come la MC interferiscono con løattivazione delløNFkB proprio a questo livello. Una induzione di IkBα è stata dimostrata nelle cellule delløendotelio intestinale di Pazienti con MC trattati con glucocorticoidi. La mesalazina inibisce la degradazione di IkBα (84), mentre løIL10 sopprime løattività di IKK bloccando la degradazione di IkBs (85).

Per quanto concerne la infliximab, è evidente la riduzione dei livelli nucleari della subunità p65 nelle biopsie intestinali di Pazienti con MC, già dopo una settimana dalla singola infusione (86,87,88,89). Non ci sono dati a disposizione riguardo i livelli di IkBs o IKK.

I nostri risultati preliminari, mostrando un incremento di IkBα e IkBy negli estratti cellulari di biopsie intestinali prelevate dopo la prima infusione di Infliximab, suggeriscono che løup-regolazione di questi inibitori potrebbe essere uno dei meccanismi che conducono delløNFkB, alla diminuita attività nonchè allæffetto antiinfiammatorio del trattamento con anticorpo monoclonale anti-TNFα. Altri studi saranno necessari per confermare questi risultati e per chiarire se, per effetto delloInfliximab, sia bloccata la degradazione degli IkBs inibendo l\u00e9attivazione di IKK indotta dal TNFα oppure sia indotta la trascrizione degli IkBs come accade anche per effetto dei glucocorticoidi.

3.5 CONCLUSIONI

Løesatta comprensione dei meccanismi etiopatogenetici, farmacologici, farmacocinetici e farmacodinamici, in aggiunta delle alløimpatto concomitanti immunomodulazione ed immunogenicità, consentirà di ottimizzare loutilizzo dello Infliximab e degli agenti biologici nel trattamento della MC, attraverso una più opportuna selezione dei Pazienti da trattare ed una migliore definizione dei tempi di trattamento e dei protocolli di infusione (90,91). Løattenta selezione dei Pazienti da trattare con Infliximab migliora la sua efficacia. Devono essere candidati al trattamento solo quei Pazienti con malattia in fase attiva e nei quali è fallito il controllo con la terapia convenzionale. La remissione clinica è evidente dopo induzione con almeno tre dosi di Infliximab e nella forma attiva e fistolizzante della malattia (92).

La Israeli Gastroenterological Association, sulla base di esperienze cliniche pubblicate e problemi inerenti vari aspetti pratici

delløuso dellønfliximab, ha suggerito delle linee-guida che includono:
a) protocolli di trattamento; b) terapia di mantenimento; c)
prevenzione delle infezioni; d) potenziale terapeutico (93).

La combinazione di Infliximab ed immunosoppressori è migliore in termini di induzione e mantenimento della remissione. Løapproccio ostep-upo si riferisce alla terapia classica, quello otopdowno alla terapia intensiva ab initio di agenti biologici ed immunosoppressori per evitare complicazioni e migliorare la qualità di vita. Løuso dello Infliximab in prima linea è ancora limitato: løosservazione epidemiologica che >50% dei Pazienti con MC non richiede una terapia aggressiva è contro løuso della strategia otopdowno. La mancanza di marcatori per identificare i Pazienti ad alto rischio, le discussioni inerenti la sicurezza a lungo termine e gli alti costi dello Infliximab, sono ancora fattori a supporto di un più attento approccio al Paziente con MC (94).

LøInfliximab è stato inizialmente usato in Pazienti con MC da moderata a severa o fistolizzante, comunque refrattaria alla terapia medica convenzionale. Allo stato attuale viene utilizzato anche come terapia in prima linea per la sua netta efficacia. Esso induce rapidamente la remissione della MC e delle recidive, la chiusura delle fistole entero-cutanee e perianali, previene le recidive e quando somministrato in cronico determina il mantenimento della remissione a lungo termine. Il suo impiego è supportato anche nel trattamento delle MEI e per ridurre il dosaggio degli steroidi.

LøInfliximab rappresenta una terapia clinicamente utile ed efficace, anche se richiede løattento monitoraggio del Paziente onde evitarne la tossicità, rara ma significativa. La speranza è che esso, insieme ad altri agenti biologici, ci consentirà di modificare il decorso clinico delle IBD, evitando complicazioni quali stenosi ed ascessi,

nonchè riducendo la necessità di ricorso al trattamento chirurgico (95,96).

Paziente Età Sesso Durata malattia Sede Fistole 43 \mathbf{M} 17 Colon Perineale 63 Ileo-colica 2 34 \mathbf{M} Perineale 3 37 5 Ileo-colica M Entero-vescicale 5 4 45 M Ileo Entero-enterica 5 39 F 8 Ileo-colica 6 77 F 3 Ileo 7 38 M 1 Ileo F 8 Entero-vaginale 61 13 Ileo-colica 9 52 \mathbf{M} 34 Ileo-colica 10 58 2 M Ileo Entero-enterica 11 30 3 F Ileo 12 41 F 2 Ileo

Tabella I. Pazienti arruolati nello studio.

Pazienti trattati	Pazienti trattati
con dose iniziale (1-3)	senza dose iniziale (4-12)

T0	Prima della I infusione	Prima della I infusione	
T1	A 2 settimane prima della II infusione	A 8 settimane prima della II infusione	
T2	A 6 settimane prima della III infusione	A 24 ore dopo la II infusione	
T3	A 10 settimane durante il follow-up	A 12 settimane durante il follow-up	

Tabella II. Timing dello studio.

Paziente Risposta iniziale Mantenimento Risposta durante follow-up

1	SI	SI	SI
2	SI	NO	SI
3	NO	NO	-
4	SI	SI	SI
5	SI	SI	SI (recidiva a 11 mesi)
6	SI	SI	SI
7	SI	SI	SI
8	SI	SI	SI
9	SI	SI	SI
10	SI	SI	SI
11	SI	NO	-
12	NO	NO	-

Tabella III. Decorso clinico ed evoluzione durante e dopo il trattamento.

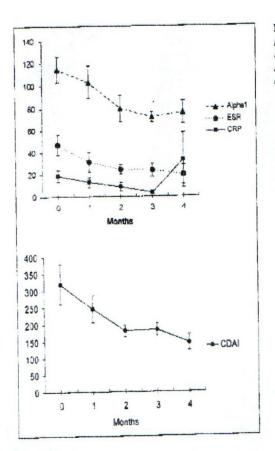


Fig. 1. A) Mean values of alpha I ocid glycoprotein(mg/dl) ESR(mm), and CRP(mg/ L) during the first 4 months of treatment. B) Mean values of CDAI during the first 4 months of treatment (all patients).

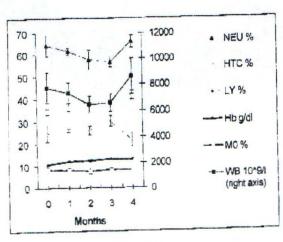
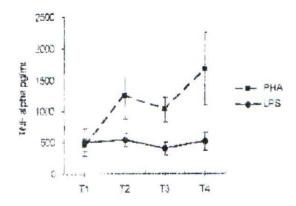
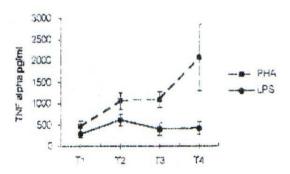


Fig. 2. Mean haemogram values during the first 4 months of treatment, all patient (NEU: neutrophils, LY: lymphocytes M0 monocytes).





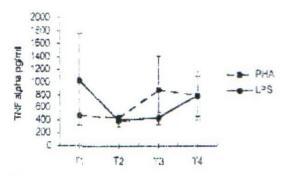


Fig. 4.TNF alpha in supernatants of PBMC cultured in the presence of PHA ar LPS, A) All patients, B) Patients treated without loading dose schedule. C) Patients treated with loading dose schedule.

Fig. 5. Patient 1. Upper left: Western blot for RelA, IkB alpha and gamma in cytoplasmatic extracts of biopsie, and of PBMC at T0 and T3; Upper right: densitometric analysis of the same assays: Lower left: TNF alpha in supernatants of PBMC cultured in the presence of PHA or LPS: Lower right: CDAI, ESR (num) and CRP (mg/L, values during the first 4 months of treatment.

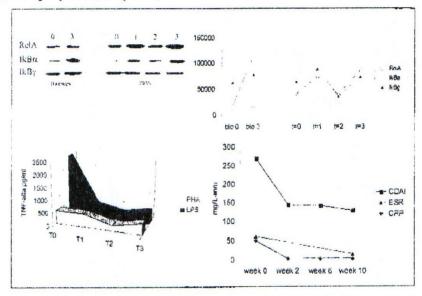


Fig. 6. Patient 2. Upper left: Western blot for RelA. IKB alpha and zamma in cytoplasmatic extracts of biopsies and of PBMC at T0 and T3. Upper right: densilometric analysis of the same assays; Lower left: TNF alpha is supernatants of PBMC cultured in the presence of PHA or LPS; Lower right: CDAI, ESR (mm) and CRP (mg/L, values during the first 4 months of treatment.

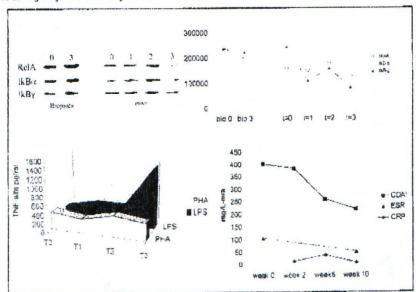
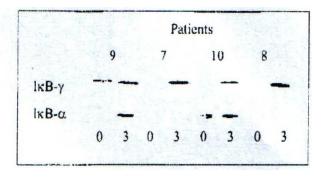


Fig. 7. Western blot for InB alpha and gamma in cell extracts of biopsies taken at T0 and T3.



BIBLIOGRAFIA

- 1. Rhodes JM et al. Lessons for inflammatory bowel disease from rheumatology. Dig Liver Dis 2006;38:157-162.
- 2. Calkins BM et al. The epidemiology of idiopathic inflammatory bowel disease. Inflammatory Bowel Disease. Kirsner JB, Shorter RG, eds 1995;31-68.
- 3. Retsky JE et al. The extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. Inflammatory Bowel Disease. Kirsner JB, Shorter RG, eds 1995;474-491.
- 4. Barrie A et al. Biologic therapy in the management of extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis 2007;13(11):1424-9.
- 5. Valentini G et al. An update on the medical treatment of Crohnøs disease. Panminerva Medica 2003;45(1):15-22.
- 6. Schölmerich J et al. Treatment of inflammatory bowel disease. Schweiz Rundsch Med Prax 2007;96(9):337-43.
- 7. Farrel RJ et al. Glucocorticoid resistance in inflammatory bowel disease. J Endocrinol 2003;178:339-346.
- 8. Bastida PAG et al. Optimization of immunomodulatory treatment with azathioprine or 6-mercaptopurine in inflammatory bowel disease. Gastroenterol Hepatol 2007;30(9):511-6.
- 9. Flasar MH et al. Disparities in the use of immunomodulators and biologics for the treatment of inflammatory bowel disease: A retrospective cohort study. Inflamm Bowel Dis 2008;14(1):13-9.
- 10. Nguyen GC et al. Insights in immunomodulatory therapies for ulcerative colitis and Crohn's disease. Curr Gastroenterol Rep 2006;8(6):499-505.
- 11. Katz JA. Advances in the medical therapy of inflammatory bowel disease. Curr Opin Gastroenterol 2002;18(4):435-40.

- 12. Elson CO et al. The immunology of inflammatory bowel disease. Inflammatory Bowel Disease. Kirsner JB, Shorter RG, eds 1995;203-251.
- 13. Elson CO et al. Experimental models of inflammatory bowel disease. Gastroeterology 1995;109:1344-1367.
- 14. Lobo AJ et al. Carriage of adhesive Escherichia Coli after restorative proctocolectomy and pouch anal anastomosis: relation with functional outcome and inflammation. Gut 1993;34:1379-1383.
- 15. Meijssen MAC et al. Altered cytokine and CD14 expression by intestinal epithelial cells of interleukin-2 deficient mice. Gastroenterology 1996;110:A966.
- 16. Elson CO. Genes, microbes and T-cells ó new therapeutic targets in Crohnøs disease. N Engl J Med 2002;346:614-616.
- 17. Pena AS et al. Genetic susceptibility and regulation of inflammation in Crohn¢s disease. Relationship with the innate immune system. Rev Esp Enferm Dig 2002;94:351-360.
- 18. Theofilopoulos AN. The basis of autoimmunity: part II. Genetic predisposition. Immunol Today 1995;16:150-159.
- 19. Morise K et al. Expression of adhesion molecules and HLA-DR by macrophages and dendritic cells in aphthoid lesions of Crohnøs disease: an immunocytochemical study. J Gastroenterol 1994;29:257-264.
- 20. Veys EM et al. Spondylarthropathies: from gut to target organs. Baillereøs Clinical Rheumatology 1996;10(1):123-146.
- 21. Hugot JP et al. Lessons to be learned from the NOD2 gene in Crohnøs disease. Eur J Gastroenterol Hepatol 2003;15:593-597.
- 22. Rugtveit J et al. Cytokine profiles differ in newly recruited and resident subsets of mucosal macrophages from inflammatory bowel disease. Gastroenterology 1997;112:1493-1505.
- 23. Powrie F et al. A critical role for transforming growth factor-b but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RBlow CD4+ T cells. J Exp Med 1996;183:2669-2674.

- 24. Mowat AM et al. The anatomical basis of intestinal immunity. Immunol Rev 1997;156:145-166.
- 25. Duchmann R et al. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). Clin Exp Immunol 1995;102:448-455.
- 26. Okamura-Oho Y. Perturbation due to environmental stress. Tanpakushitsu Kakusan Koso 2004;49:2850-2854.
- 27. Folwaczny C et al. Globet cell autoantibodies in patients with inflammatory bowel disease and their first degree relatives. Gastroenterology 1997;113:101-106.
- 28. Biancone L et al. Production of immunoglobulin G and G1 antibodies to cytoskeletal protein by lamina propria cells in ulcerative colitis. Gastroenterology 1995;109:3-12.
- 29. Kroemer G et al. Differential involvement of Th1 and Th2 cytokines in autoimmune diseases. Autoimmunity 1996;24:25-33.
- 30. Strater J et al. CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis in colon epithelial cells: a possible role in ulcerative colitis. Gastroeterology 1997;113:160-167.
- 31. Sartor RB et al. Microbial factors in the pathogenesis of Crohnøs disease, ulcerative colitis and experimental intestinal inflammation. Inflammatory Bowel Disease. Kirsner JB, Shorter RG, eds 1995;96-124.
- 32. Aichele P et al. Immunopathology or organ-specific autoimmunity as a consequence of virus infection. Immunol Rev 1996;152:21-45.
- 33. Noguchi M et al. Enhanced intestinal mononuclear cells from patients with Crohnøs disease. J Gastroenterol 1995;8:52-55.
- 34. MacDermott RP et al. Alterations of the mucosal immune system in inflammatory bowel disease. J Gastroenterol 1996;31:907-916.
- 35. Podolski DK et al. Inflammatory bowel disease. N Engl J Med 1991;325:928.

- 36. Braun J et al. Multiparameter analysis of immunogenetic mechanisms in clinical diagnosis and management of inflammatory bowel disease. Adv Exp Med Biol 2006;579:209-18.
- 37. Bickston SJ et al. Future therapies for inflammatory bowel disease. Curr Gastroenterol Rep 2003;5(6):518-23.
- 38. Sartor RB. Clinical applications of advances in the genetics of IBD. Rev Gastroenterol Disord 2003; Suppl1:S9-17.
- 39. Hampe J et al. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohnøs disease in German and British populations. Lancet 2001;357:1925.
- 40. Ogura Y et al. A frameghift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohnøs disease. Nature 2001;411:603.
- 41. Schmid RM et al. NFkB/Rel B: implications in gastrointestinal diseases. Gastroeterol 2000;118:1208.
- 42. Jobin C et al. NFkB signaling proteins as therapeutic targets for inflammatory bowel diseases. Inflamm Bowel Dis 2000;6:206.
- 43. Shetty A et al. Pharmacogenomics of response to anti-tumor necrosis factor therapy in patients with Crohn's disease. Am J Pharmacogenomics 2002;2(4):215-21.
- 44. Schreiber S et al. Activation of NFkB in inflammatory bowel disease. Gut 1998;42:477.
- 45. Thiele K et al. Cell specific effect of glucocorticoid treatment on the NFkBp65/IkappaBalpha system in patients with Crohnøs disease. Gut 1999;45:693.
- 46. Kalser GC et al. Mesalamine blocks TNF growth inhibition and NFkB activation in mouse colonocytes. Gastroenterol 1999;116:602.
- 47. Burns KA et al. Inflammatory diseases: is ubiquitinated NEMO at the hub? Curr Biol 2004;14:R1040-1042.
- 48. Inohara N et al. Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. Curr Opin Microbiol 2002;5:76-80.

- 49. Fellermann K et al. Crohnøs disease: a defensin deficiency syndrome? Eur J Gastroenterol Hepatol 2003;15:627-634.
- 50. Ardizzone S et al. Biologic therapy for inflammatory bowel disease. Drugs 2005;65(16):2253-86.
- 51. Kurtovic J et al. Recent advances in biological therapy for inflammatory bowel disease. Trop Gastroenterol 2004;25:9-14.
- 52. Stokkers PC et al. New cytokine therapeutics for inflammatory bowel disease. Cytokine 2004;28:167-73.
- 53. Present DH et al. Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn¢s disease. N Eng J Med 1999;340:1398.
- 54. Rutgeerts P et al. Efficacy and safety of retreatment with anti-TNF antibody (Infliximab) to mantain remission in Crohnøs disease. Gastroenterol 1999;117:761.
- 55. D'Haens G. Anti-TNF therapy for Crohn's disease. Curr Pharm Des 2003;9(4):289-94.
- 56. Tilg H et al. Antitumour necrosis factor therapy in Crohn's disease. Expert Opin Biol Ther 2002;2(7):715-21.
- 57. Van Assche G et al. Focus on mechanisms of inflammation in inflammatory bowel disease sites of inhibition: current and future therapies. Gastroenterol Clin North Am. 2006;35(4):743-56.
- 58. Lugering A et al. Infliximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic active Crohnøs disease by using a caspase-dependent pathway. Gastroenterol 2001;124:1145.
- 59. ten Hove TC et al. Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes in Crohnøs disease. Gut 2002;50:206. 60. Pizarro TT et al. Mouse models for the study of Crohnøs disease. Trends in Molecular Medicine 2003;9(5):218-222.
- 61. Best WR et al. Development of a Crohnøs disease activity index. National cooperative Crohnøs disease study. Gastroenterol 1976;70:439.

- 62. Mayordomo L et al. Pulmonary miliary tuberculosis in a patient with anti-TNF-alpha treatment. Scand J Rheumatol 2002;31(1):44-5.
- 63. Pioli C et al. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) inhibits CD28-induced IkappaBalpha degradation and RelA activation. Eur J Immunol 1999;29:856.
- 64. van Berge Henegouwen GP. Consensus for infliximab treatment of patients with Crohn's disease. Ned Tijdschr Geneeskd 2000;144(38):1844-5.
- 65. Rutgeerts P et al. Optimizing anti-TNF treatment in inflammatory bowel disease. Gastroenterology 2004;126(6):1593-610.
- 66. Koelewijn CL et al. C-reactive protein levels during a relapse of Crohn's disease are associated with the clinical course of the disease. World J Gastroenterol. 2008 Jan 7;14(1):85-9.
- 67. Gisbert JP et al. Role of biological markers in inflammatory bowel disease. Gastroenterol Hepatol 2007;30(3):117-29.
- 68. Vijverman A et al. Evolution of the prevalence and characteristics of anemia in inflammatory bowel diseases between 1993 and 2003. Acta Gastroenterol Belg 2006;69(1):1-4.
- 69. Moriconi F et al. Quantitative gene expression of cytokines in peripheral blood leukocytes stimulated in vitro: modulation by the anti-tumor nerosis factor-alpha antibody infliximab and comparison with the mucosal cytokine expression in patients with ulcerative colitis. Transl Res 2007;150(4):223-32.
- 70. Sandborn WJ et al. Infliximab in the treatment of Crohnøs disease: a userøs guide for clinicians. Am J Gastroenterol 2002;97:2962.
- 71. Lawson MM et al. Tumour necrosis factor alpha blocking agents for induction of remission in ulcerative colitis. Cochrane Database Syst Rev 2006;3:CD005112.
- 72. Rudwaleit M et al. Ankylosing spondylitis and bowel disease. Best Pract Res Clin Rheumatol 2006;20(3):451-71.
- 73. Siemanowski B et al. Efficacy of infliximab for extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. Curr Treat Options Gastroenterol 2007;10(3):178-84.

- 74. Barrie A et al. Treatment of immune-mediated extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease with infliximab. Gastroenterol Clin North Am 2006;35(4):883-93.
- 75. Baert F et al. Immunogenicity of infliximab: how to handle the problem? Acta Gastroenterol Belg 2007;70(2):163-70.
- 76. Biancone L et al. Treatment with biologic therapies and the risk of cancer in patients with IBD. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol 2007;4(2):78-91.
- 77. Dinesen L et al. Targeting nanomedicines in the treatment of Crohn's disease: focus on certolizumab pegol (CDP870). Int J Nanomedicine 2007;2(1):39-47.
- 78. Van Assche G et al. Emerging biological treatments in inflammatory bowel diseases. Minerva Gastroenterol Dietol 2007;53(3):249-55.
- 79. D'Haens G et al. Advances in biologic therapy for ulcerative colitis and Crohn's disease. Curr Gastroenterol Rep 2006;8(6):506-12.
- 80. Lügering A et al. Apoptosis as a therapeutic tool in IBD? Ann N Y Acad Sci 2006;1072:62-77.
- 81. Cornillie F et al. Infliximab induces potent anti-inflammatory and local immunomodulatory activity but not systemic immune suppression in patients with Crohn¢s disease. Aliment Pharmacol Ther 2001;15:463.
- 82. Nikolaus S et al. Mechanisms of failure of infliximab for Crohnøs disease. Lancet 2000;356:1475.
- 83. May MJ et al. Signal transduction through NFkB. Immunol Today 1998;19:80.
- 84. Weber CK et al. Suppression of NFkB activity by sulfasalazia is mediated by direct inhibition of IkappaB kinases alpha and beta. Gastroenterol 2000;119:1209.

- 85. Schuttelius AJG et al. IL-10 signaling blocks inhibitor of kB kinase activity and NFkB DNA binding. J Biolog Chem 1999;274:31868.
 86. Zorzetto M et al. HLA and hypocomplementemin: the disadvantage of carrying the HLA-b35 and the silent alleles of the C4 complement component. Int J Immunopathol Pharmacol 2004;17:307.
- 87. Prosperi C et al. Comparison between flurbiprofen and its nitric oxide-releasing derivatives HCT-1026 and NCX-2216 on ab(1-42)-induced brain inflammation and neuronal damage in the rat. Int J Immunopathol Pharmacol 2004;17:317.
- 88. Sodin-Semel S et al. Lipoxin A and serum amyloid A elicit opposite IL-8 and NFkB responses via the common ALX receptor. Int J Immunopathol Pharmacol 2004;17:145.
- 89. Appert-Collin A et al. Quantification of neurotrophin mRNA expression in PMN mouse: modulation by Xaliproden. Int J Immunopathol Pharmacol 2004;17:157.
- 90. Kozuch PL et al. General principles and pharmacology of biologics in inflammatory bowel disease. Gastroenterol Clin North Am 2006;35(4):757-73.
- 91. Su CG et al. The role of biological therapy in inflammatory bowel disease. Drugs Today (Barc) 2001;37(2):121-133.
- 92. Pearce CB et al. Careful patient selection may improve response rates to infliximab in inflammatory bowel disease. J Gastroenterol Hepatol 2007;22(10):1671-7.
- 93. Dotan I et al. Infliximab in inflammatory bowel diseases-conference summary and suggested Guidelines. Harefuah 2006;145(11):844-9.
- 94. Baert F et al. Medical therapy for Crohn's disease: top-down or step-up? Dig Dis 2007;25(3):260-6.
- 95. Travassos WJ et al. Infliximab: Use in Inflammatory Bowel Disease. Curr Treat Options Gastroenterol 2005;8(3):187-196.
- 96. Casellas I et al. TNF-alpha inhibitors in inflammatory bowel disease. Med Clin (Barc) 2004;123(16):627-34.