

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”



Dottorato di ricerca in

Terapie Avanzate Medico-Chirurgiche

Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia

Coordinatore Prof. G. Di Minno

CICLO XXIX

**GUARIGIONE TRANSMURALE IN PAZIENTI AFFETTI DA MALATTIA
DI CROHN IN TERAPIA DI MANTENIMENTO CON FARMACI
ANTI-TNF α**

Tutor

Chiar.ma Prof.ssa
Fabiana Castiglione

Candidata

Dott.ssa Maria Diaferia

Anno Accademico 2016/2017

INDICE

<i>Introduzione</i>	3
<i>Caratteristiche generali della malattia di Crohn</i>	3
<i>Patogenesi</i>	4
<i>Anatomia patologica, clinica e diagnosi</i>	6
<i>Ileo-colonscopia</i>	9
<i>Ecografia intestinale</i>	10
<i>Entero-RMN</i>	12
<i>Terapia</i>	13
<i>Terapia biologica con anti TNF α</i>	14
<i>La guarigione mucosale nella M. di Crohn</i>	16
<i>La guarigione transmurale nella M. di Crohn</i>	17
<i>Scopo dello studio</i>	19
<i>Pazienti e metodi</i>	20
<i>Risultati</i>	25
<i>Discussione</i>	29
<i>Figure e tabelle</i>	32
<i>Bibliografia</i>	43

INTRODUZIONE

Caratteristiche generali della malattia di Crohn

La malattia di Crohn (MC) è una malattia infiammatoria cronica ad etiologia sconosciuta, che può colpire qualsiasi tratto del canale alimentare, dalla bocca all'ano. Ha un decorso cronico-recidivante, caratterizzato dall'alternanza di periodi di remissione e di riacutizzazione; tipicamente coinvolge tutti gli strati della parete intestinale e presenta una distribuzione segmentaria, con alternanza di aree di mucosa lesa ed aree indenni. La localizzazione più frequente è a carico dell'ileo terminale, seguita dal colon, in particolare a livello del cieco e dell'ascendente ⁽¹⁻⁴⁾.

Globalmente la sua incidenza è di 5 casi su 100.000 abitanti per anno, e presenta un doppio picco: il primo in età giovanile (tra i 15 ed i 25 anni) ed il secondo in età senile (dopo i 60 anni) ^(5,6). Non è stata riscontrata differenza significativa tra i due sessi, ma la localizzazione colica isolata sembra essere più frequente nelle femmine ⁽⁴⁾. Presenta una distribuzione ubiquitaria, anche se la sua prevalenza (in media 30-50 casi su 100.000) risulta essere maggiore nei paesi del Nord-Europa e del Nord-America ⁽⁷⁾. E' da sottolineare come, in particolare nei Paesi Occidentali, il tasso d'incidenza mostri una tendenza all'aumento. Questo dato può essere in parte spiegato dal miglioramento delle tecniche diagnostiche e dalla maggiore conoscenza della malattia da parte dei medici, ma è verosimile che esso sia anche espressione di un reale incremento epidemiologico ⁽⁸⁾.

La malattia sembra essere multifattoriale, caratterizzata da un'anomala risposta intestinale locale ad antigeni sconosciuti ⁽⁹⁾. Al riguardo sono state avanzate numerose ipotesi, che spaziano dalla ricerca di possibili agenti infettivi scatenanti (es. virus del morbillo, micobatteri atipici, etc.), a fattori ambientali, ad alterazioni del sistema immunitario ^(10,11). Allo stato attuale, tra i fattori ambientali solo il fumo di sigaretta sembra avere un ruolo definito ⁽¹²⁾, con un RR=2.5-3. Anche fattori genetici sono stati presi in considerazione, soprattutto in ragione dell'evidenza di una positività all'anamnesi familiare per IBD nel 10-20% dei casi. Nei soggetti con un parente di primo grado affetto, questo si traduce in un rischio di sviluppare la malattia fino a dieci volte maggiore rispetto a quello della

popolazione generale; il rischio può poi superare il 30% se ambedue i genitori sono malati ⁽¹³⁾. Va sottolineato che non va considerata una malattia genetica in senso stretto, in quanto questi geni *predispongono*, ma non causano la malattia, come dimostrato dal fatto che la concordanza in gemelli monozigoti affetti da MC non raggiunge il 100%.

Il gene più significativo sin ad ora identificato è NOD2/CARD15, coinvolto nella cascata di NF-κB. La sua mutazione sarebbe alla base di un'inappropriata risposta a stimoli batterici fisiologici (flora microbica residente) e patologici (infezioni intestinali) (Figura 1, ^{11,14-16}). Molte citochine, come il TNFα, IFNγ, IL-2, IL-10 e IL-12, sono coinvolte nella genesi della MC. Proprio sull'azione pro-infiammatoria del TNFα - prodotto da macrofagi e linfociti T – si è concentrata, negli ultimi anni, la ricerca farmacologica, che ha portato così allo sviluppo di anticorpi anti-TNFα (Infliximab, Adalimumab), usati attualmente con successo per la terapia delle forme più aggressive di MC ⁽¹⁷⁾.

Patogenesi

Non è ancora chiaro quali siano i fattori scatenanti la MC, sebbene numerose ipotesi siano state formulate. Le più accreditate sono:

1. Presenza di uno specifico agente infettivo patogeno, ipotizzato ma mai individuato. Oggi si pensa che siano le modificazioni globali della flora batterica intestinale a provocare il danno mucosale ⁽¹⁸⁾;
2. Presenza di un difetto della barriera difensiva mucosale, anomalie della secrezione del muco, alterazione della permeabilità dell'intestino o della capacità di riparazione dell'epitelio ⁽¹⁹⁾;
3. Presenza di una risposta impropria del sistema immunitario mucosale a stimoli normalmente presenti ⁽²⁰⁾;

In linea di massima si ritiene che possa esistere uno squilibrio tra l'azione di fattori aggressivi e di fattori protettivi per la mucosa, con un incremento della secrezione di citochine pro-infiammatorie rispetto a quelle anti-infiammatorie, (sinonimo di squilibrio tra attività T helper 1 e controregolatoria T helper 2 e suppressor). La disponibilità di modelli sperimentali animali ha reso possibile la chiarificazione del ruolo giocato da numerosi mediatori dell'infiammazione e la genesi di molecole con specifica attività inibitoria ⁽²¹⁾.

L'attivazione delle cellule T-helper (Th) tipo 1 e 17, avviene in risposta alla produzione di interleuchina IL-12, IL-18, IL-23 e TGF beta dalle cellule presentanti l'antigene (APC) e dai macrofagi. A loro volta le cellule Th1 e Th17 aumentano la secrezione delle citochine pro-infiammatorie IL-2, IL-17, interferone (IFN)- γ e TNF α . Queste citochine stimolano, in un ciclo autosufficiente, le cellule endoteliali, APC, macrofagi, e fibroblasti, nella produzione di TNF α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e IL-18 ⁽²²⁻²³⁻²⁴⁾. La maggior parte delle nuove biomolecole per il trattamento delle malattie infiammatorie croniche, in fase sperimentale, hanno l'obiettivo di ridurre l'attivazione delle cellule T inibendo l'azione di citochine pro-infiammatorie, aumentando la produzione di citochine anti-infiammatorie, bloccando la co-stimolazione o inducendo l'apoptosi delle cellule T (Figura 2).

Tra i più studiati mediatori dell'infiammazione vi è il TNF α prodotto dai macrofagi e dai linfociti T, una citochina che si presenta in due forme, solubile e di membrana. Svolge un ruolo di grande importanza nel sistema immunitario: la sua azione infiammatoria locale è mediata dal legame con recettori situati sulla superficie di macrofagi, cellule endoteliali, fibroblasti e cellule epiteliali, tale da indurre l'espressione di citochine e molecole di adesione, perpetuando ed esacerbando la flogosi intestinale. Tale ipotesi è stata supportata da evidenze sperimentali in topi transgenici trattati con acido sulfonicotrinitrobenzenico nei quali la gravità della colite indotta è correlata ai livelli di espressione di TNF α , mentre l'inattivazione del gene del TNF α previene la comparsa dell'infiammazione intestinale.

Diversi studi hanno dimostrato che la somministrazione di anti-TNF α determina una down-regulation dello stato infiammatorio della mucosa intestinale grazie all'eliminazione del TNF α solubile ed al blocco transmembrana della funzione del TNF α ⁽²⁵⁾. Una singola somministrazione di infliximab, un anticorpo chimerico contro il TNF α , riduce a lungo il numero di cellule T attivate nella mucosa e riduce la produzione locale di TNF α ed IFN γ .

Anatomia patologica, clinica e diagnosi della malattia di Crohn

Dal punto di vista anatomico-patologico la MC è caratterizzata da lesioni infiammatorie che interessano in modo discontinuo la mucosa intestinale, potendosi così visualizzare segmenti infiammati che si alternano a tratti di mucosa indenne (skip lesions). Tipicamente, l'infiammazione coinvolge a tutto spessore la parete intestinale, interessando spesso anche il mesentere e i linfonodi regionali. Con il passare del tempo essa tende alla cronicizzazione, con conseguente progressiva stenosi del lume intestinale. La mucosa può presentare lesioni aftoidi isolate, franche ulcerazioni, fino al tipico aspetto "ad acciottolato romano", evidenziabile soprattutto nelle fasi più avanzate, risultante dalla presenza di ulcere lineari e dalla contemporanea imbibizione edematosa della sottomucosa. Le ulcere possono inoltre confluire, andando a compromettere gli strati più profondi della parete e dando così luogo alla formazione di tramiti fistolosi e/o ascessi. Il quadro microscopico è prevalentemente caratterizzato da infiltrato infiammatorio cronico e distorsione dell'architettura ghiandolare. Solo nel 20-30% dei casi, all'esame bioptico si può rilevare un granuloma non caseoso, considerato un reperto patognomico ^(4,26).

L'andamento della malattia è caratterizzato da un decorso cronico-intermittente in cui fasi di remissione si alternano a fasi di riacutizzazione, durante le quali è possibile il verificarsi di un'estensione delle lesioni.

Il quadro clinico è piuttosto eterogeneo, in quanto fortemente influenzato sia dalla localizzazione della malattia, sia dal pattern, sia dalle complicanze.

Si può suddividere il comportamento della MC in in *tre patterns* ⁽²⁷⁾:

- *Stenosante*, caratterizzato da riduzione del lume intestinale dovuto all'infiammazione che può progredire sino alla fibrosi della parete. Clinicamente si associa ad una sintomatologia dolorosa addominale di tipo sub-occlusivo (prevalentemente post-prandiale), distensione addominale, nausea e/o vomito.
- *Penetrante*, caratterizzato dall'estensione della flogosi verso gli strati più esterni della parete, che dà luogo alla formazione di ascessi (più spesso localizzati) e fistole (che possono essere, in ordine di frequenza, perianali, entero-enteriche, entero-cutanee, entero-vescicali, retto-vaginali, etc.). Le fistole, in particolare quelle perianali, possono precedere anche di anni l'esordio della malattia, costituendone così il primo segno.
- *Infiammatorio (non stenosante/non penetrante)*, in cui prevale la componente infiammatoria, con sintomi clinici quali dolore addominale (specie in corrispondenza della fossa iliaca destra), diarrea, febbre e calo ponderale.

Ai segni clinici, nella maggior parte dei casi, si accompagnano quelli laboratoristici, tra cui l'aumento degli indici infiammatori (PCR, VES, fibrinogeno, piastrine, leucociti neutrofili, alfa₂-globuline) e l'ipoalbuminemia.

L'esordio può essere insidioso, ed il paziente può presentare anche solo vaghi sintomi addominali. Al momento della diagnosi la diarrea cronica è il sintomo più comune, seguito dal dolore addominale (70%) e dal calo ponderale (60%); circa il 10% può presentare già all'esordio delle complicanze (es. fistole peri-anali) ⁽⁴⁾.

La forma infiammatoria di malattia tende ad evolvere nel tempo nelle forme stenosante e penetrante ⁽³⁾. Si possono associare manifestazioni extra-intestinali dermatologiche (eritema nodoso, pioderma gangrenoso, etc.), articolari (artriti periferiche, sacroileite, spondilite anchilosante) ed oculari (uveite, irite, episclerite). Più rare sono le manifestazioni epato-biliari (colangite sclerosante primitiva, pancreatite) e cardiache (miocarditi) ^(3,28).

La diagnosi di MC può essere posta mediante criteri clinici, supportati da evidenze endoscopiche, radiologiche o istologiche ⁽²⁹⁾. Essa è tanto più rapida e agevole quanto più la malattia è localizzata distalmente. Infatti le localizzazioni al colon sinistro (discendente, sigma, retto), seppur rare, si manifestano con rettorragia e/o diarrea ematica ⁽³⁰⁾, imponendo così la programmazione di un esame endoscopico - completato da campionamento bioptico - in tempi brevi. La localizzazione al colon destro e all'intestino tenue, in particolare all'ileo, come accennato, presenta invece una sintomatologia più subdola e non sempre la diagnosi viene posta in tempi brevi. Il solo riscontro, ad esempio, di diarrea e dolore addominale ricorrente, può infatti far propendere verso una diagnosi di sindrome del colon irritabile, ritardando la diagnosi di MC.

La frequente presenza però di segni e sintomi suggestivi di patologia organica deve indurre ad un'indagine più approfondita. In particolare la diarrea notturna, il calo ponderale ingiustificato, la febbre, la familiarità per malattie infiammatorie croniche intestinali e l'aumento degli indici di flogosi devono essere considerati spie d'allarme.

Dal punto di vista delle indagini strumentali, l'ileocolonscopia è l'esame fondamentale consentendo la visione diretta della mucosa del colon e dell'ileo terminale (sede più frequente di malattia) e il campionamento bioptico. Solo negli ultimi anni l'introduzione dell'enteroscopia a doppio pallone ha consentito l'esplorazione diretta di tutto il piccolo intestino, altrimenti non visualizzabile, ma l'esame è gravato da un'alta invasività nonché dalla difficoltà tecnica (anche in considerazione della frequenza di tratti intestinali stenotici nei soggetti affetti da MC). Di contro, per lungo tempo lo studio dell'intestino tenue si è basato su metodiche radiologiche, il clisma del tenue e lo studio seriato del tenue per os, che forniscono informazioni indirette sullo stato mucosale.

Negli ultimi anni sono state proposte numerose tecniche di imaging alternative per lo studio di questo tratto del canale alimentare. Specie in Europa, l'utilizzo dell'ecografia ha guadagnato sempre maggior diffusione ⁽²⁹⁾, consentendo infatti di indagare in modo non invasivo sia la parete intestinale che le strutture extra-parietali. Allo stesso tempo lo sviluppo di nuovi componenti

hardware e software per la TC e la RMN, hanno consentito a queste due tecniche di affermarsi nello studio delle malattie intestinali e delle loro complicanze intra-addominali ⁽³¹⁾.

E' importante sottolineare che, a differenza della TC, l'ecografia e la RMN non utilizzano radiazioni ionizzanti, con l'enorme vantaggio di poter essere utilizzate di frequente sia in fase diagnostica che nel monitoraggio della malattia e delle complicanze.

Tra le altre tecniche utilizzate vanno menzionate anche la video-endoscopia capsulare e la scintigrafia con granulociti marcati (quest'ultima con prevalente indicazione nello studio di una sospetta MC in età pediatrica) ⁽³¹⁻³³⁾.

Ileo-colonscopia

Tuttora la colonscopia con ileoscopia retrograda resta il gold standard per la diagnosi di MC. Essa, infatti, rappresenta l'unico strumento con cui si può visualizzare direttamente la mucosa intestinale, permettendo inoltre il prelievo di frammenti biotipici per la successiva analisi istopatologica.

Purtroppo, per motivi tecnici, non sempre si riesce ad eseguire. Questo può essere messo in relazione con la possibile presenza di una valvola ileo-cecale infiammata o stenotica che non consente l'intubazione ileale. L'ileo, dunque, riesce ad essere raggiunto solo nel 75-90% delle colonscopie eseguite in centri di alta specializzazione (65% nella popolazione pediatrica) ^(32,34-36).

Va inoltre tenuto presente che la localizzazione ileale di MC può anche non coinvolgere l'ultima ansa, bensì l'ileo pelvico o il digiuno distale. In questi casi dunque anche l'intubazione retrograda (in grado di esplorare pochi centimetri a monte della valvola) può non essere in grado di mostrare lesioni. Inoltre per tale manovra è indispensabile avere una buona pulizia intestinale, condizione raggiunta al massimo nell'85% delle colonscopie ^(37,38).

Macroscopicamente possono essere osservati i quadri sottoelencati, che corrispondono poi al progressivo avanzamento della malattia:

- *Eritema diffuso*, di riscontro piuttosto raro, accompagnato o meno da friabilità della mucosa. E' considerato un reperto molto precoce di malattia ed è verosimile che questo tipo di aspetto sia conseguente a microemorragie intramucose e a microascessi criptici, che portano a distruzione dell'epitelio.
- *Lesioni aftoidi*, sono un iniziale ma specifico segno di malattia. Si presentano piatte o lievemente incavate, con bordo eritematoso e fondo grigio-giallastro. Solitamente non superano i 5 mm di diametro e, caratteristicamente, tra di esse si osservano segmenti di mucosa indenne.
- *Ulcere*, che variano da piatte a profonde ed incavate, a margini netti e forma irregolare. Possono essere tortuose o serpiginose, e spesso mostrano una peculiare tendenza a disporsi longitudinalmente, creando un'immagine "a binario". Le ulcere longitudinali - parallele - interponendosi ad ulcerazioni trasversali creano il caratteristico aspetto ad acciottolato romano.

Ecografia intestinale

A partire dalla fine degli anni '90 l'ecografia intestinale ha iniziato ad essere estesamente eseguita nei pazienti con MC. E' una tecnica non invasiva ed economica che è in grado di mostrare con grande sensibilità (circa 90%) e specificità (circa 95%) sia gli aspetti tipici della malattia che le sue complicanze come fistole, ascessi e stenosi ⁽³⁹⁾.

Per l'esecuzione vengono di solito preferite sonde ad alta frequenza (5 MHz e 7,5 MHz), che consentono di ottenere una migliore risoluzione delle immagini.

I principali parametri ultrasonografici che vanno presi in considerazione sono lo spessore della parete intestinale (normalmente ≤ 3 mm) e la sua stratificazione, in cui si osservano - dall'interno verso l'esterno - cinque strati a diversa ecogenicità: mucosa (iperecogena), muscolaris mucosae (ipoecogena), sottomucosa (iperecogena), muscolare propria (ipoecogena), sierosa (iperecogena).

I vasi iliaci ed il muscolo psoas sono i punti di repere utilizzati per individuare l'ileo terminale, che è posto anteriormente ad essi. Può invece essere arduo stabilire con precisione la sede dei restanti

tratti del piccolo intestino, dal momento che non ci sono punti di repere fissi. Il colon, al contrario, è più facilmente visualizzabile grazie alla sua austratura (spesso sede di accumulo di gas) ed alla sua relativa fissità.

Nella MC l'aspetto ecografico tipico, nonché più frequente, è un ispessimento della parete intestinale coinvolgente tutti gli strati. Questo reperto viene visualizzato in sezione trasversale come un'immagine "a bersaglio" o "pseudokidney" ecografico (Fig.3.1). Spesso con la funzione Power-Doppler si può dimostrare anche un'ipervascolarizzazione dei segmenti interessati.

La metodica ecografica è applicabile anche per lo studio della recidiva post-chirurgica di MC, dove ha mostrato una buona sensibilità ed un'alta specificità; inoltre lo spessore della parete intestinale superiore a 5 mm si correla bene alla presenza di recidiva endoscopica severa per cui l'ecografia potrebbe rappresentare l'esame alternativo all'endoscopia nei pazienti scarsamente complianti ⁽⁴⁰⁾.

Un valore > 7 mm è invece stato associato ad un elevato rischio di andare incontro a resezione intestinale entro un anno ⁽⁴¹⁾.

Oltre allo studio della parete intestinale, l'ecografia consente anche di visualizzare lo stato degli altri organi addominali, nonché le complicanze della malattia. E' frequentemente osservabile, ad esempio, l'ipertrofia del mesentere ("alone iperecogeno" che circonda i segmenti intestinali colpiti) o la distensione di una o più anse a monte di una stenosi (Fig.3.2). In presenza di sintomi ostruttivi l'ecografia intestinale è addirittura stata proposta da alcuni autori come esame di scelta in pazienti con MC ⁽⁴²⁾. Anche fistole entero-enteriche (tragitti ipoecogeni che mettono in comunicazione due anse contigue) (Fig. 3.3), ed ascessi (aree ipoecogene, spesso rotondeggianti e ad ecostruttura finemente disomogenea) possono essere ben evidenziati ⁽⁴³⁻⁴⁶⁾.

L'utilizzo di un mezzo di contrasto per os incrementa l'accuratezza diagnostica dell'ecografia consentendo una migliore visualizzazione delle anse del tenue prossimale ed una più precisa definizione dell'estensione di malattia ⁽⁴⁷⁾.

Entero-RM

La entero-RM è un esame non invasivo e molto accurato che si basa sull'impiego di un potente campo magnetico e di radiofrequenze - non facendo ricorso quindi a radiazioni ionizzanti. Purtroppo il suo impiego è limitato dalla scarsa disponibilità sul territorio e dai costi elevati. Per lo studio dell'intestino tenue sono necessari due tipi di mezzo di contrasto: uno per os (neutro, allo scopo di distendere le anse) ed uno paramagnetico per via endovenosa (che potenzia il segnale dei segmenti intestinali interessati da flogosi) ⁽⁴⁾ (Fig. 3.4-6). Per evitare artefatti da movimenti peristaltici si induce di solito anche una ipotonia del piccolo intestino usando N-butilbromuro di joscina. L'accuratezza di questa metodica per la diagnosi delle complicanze della MC è molto elevata, con una sensibilità > 90% ed una specificità > 95%.

La ECCO (European Crohn's and Colitis Organization), data la sovrapposibilità di accuratezza diagnostica di entero-TC ed entero-RM, ha recentemente proposto quest'ultima quale procedura di scelta nella diagnosi della MC del piccolo intestino, essendo essa priva dei rischi correlati all'utilizzo delle radiazioni ionizzanti ^(48, 49).

Il suo utilizzo non si limita solo allo studio del tenue, ma è applicata con grande successo (in aggiunta alla visita chirurgica e all'ecografia trans-rettale) anche nello studio della malattia perianale.

Sino ad oggi sono stati condotti numerosi studi per comparare l'accuratezza diagnostica dell'entero-RM con quella di altre metodiche convenzionali, in primis entero-TC, ma ancora nessuno l'aveva comparata direttamente all'ecografia intestinale. Un recente studio condotto dal nostro team si è concentrato sul confronto diagnostico diretto tra ecografia intestinale ed entero-RM e ha dimostrato che l'ecografia intestinale non è inferiore alla risonanza magnetica in termini di accuratezza per la diagnosi della MC del piccolo intestino, con i vantaggi della disponibilità e i costi contenuti ⁽⁵⁰⁾.

Terapia

La terapia della MC si avvale della stretta collaborazione tra medico e chirurgo. In particolare la terapia chirurgica gestisce le complicanze della malattia: stenosi, fistole e ascessi.

In considerazione dei meccanismi patogenetici la terapia medica si è orientata principalmente sul trattamento antinfiammatorio ed immunomodulante ⁽³⁴⁻³⁸⁾.

La terapia medica fino a qualche anno fa si proponeva di:

- favorire la remissione clinica durante una fase di acuzie
- mantenere la remissione clinica
- prevenire le recidive intestinali dopo l'intervento chirurgico.

Oggi come nuovo end point si propone anche di:

- ottenere la guarigione mucosale.

Recenti studi hanno mostrato che la guarigione mucosale può essere raggiunta principalmente attraverso la somministrazione di farmaci biologici e che questo rappresenta un endpoint cruciale nei pazienti con MC, essendo un predittore di ridotta necessità di steroidi, minore ospedalizzazione e ricorso alla chirurgia negli anni successivi al trattamento ⁽⁵¹⁻⁵²⁾.

I principali farmaci in uso per il trattamento della MC sono:

- salicilati: nelle forme ad interessamento prevalentemente colico è ancora utilizzata la salazopirina (3 g/die);
- l'uso di corticosteroidi alla dose di 0.8-1 mg/Kg/die induce la remissione nell'80% dei casi; la dose giornaliera viene progressivamente ridotta fino alla sospensione nell'arco di 7-10 settimane. Tuttavia il limite dei corticosteroidi è rappresentato dagli effetti collaterali nel lungo termine (incremento ponderale, facies lunaris, strie rubre, cataratta, irritabilità, acne, ipertensione, iperglicemia, osteoporosi, necrosi ossea, ritardo di crescita nei bambini); inoltre la riduzione/sospensione degli steroidi si associa ad una riacutizzazione di malattia nel 30% dei casi;

- immunosoppressori: nelle condizioni di cortico-dipendenza (tendenza alla recidiva non appena si riduce o si sospende il trattamento steroideo) e di cortico-resistenza (la terapia steroidea non è in grado di indurre una completa remissione). I farmaci più utilizzati sono l'azatioprina (2-2.5 mg/Kg/die) e la 6-mercaptopurina (1.5 mg/Kg/die); una recente meta-analisi ha evidenziato un'efficacia di questi due farmaci nel mantenimento della remissione. L'effetto terapeutico di queste molecole è lento ed in genere si rende evidente dopo qualche mese di trattamento.
- antibiotici: utilizzati nelle riacutizzazioni lievi-moderate della sintomatologia intestinale (in particolare nei pazienti con malattia colica), in pazienti con malattia perianale e nel trattamento della contaminazione batterica dell'intestino tenue. I farmaci maggiormente utilizzati sono il metronidazolo e la ciprofloxacina.

Terapia biologica con farmaci anti-TNF alpha

Si tratta di molecole anticorpali di sintesi con attività anti-infiammatoria legata all'azione inibente il TNF α . Attualmente i farmaci commercializzati per il trattamento della MC comprendono l'infliximab e l'adalimumab, farmaci utilizzati da anni con successo anche in ambito reumatologico (es. artrite reumatoide, spondilite anchilosante, artrite psoriasica, etc).

Infliximab

L'infliximab è un anticorpo monoclonale chimerico del tipo IgG1 (p. m.= 149.000 D), costituito per il 25% da una regione variabile di origine murina in grado di legare specificamente l'antigene e per il 75% da una regione costante umana che conferisce scarsa immunogenicità all'anticorpo (Figura 4). L'anti-TNF α è in grado di legarsi sia al TNF α libero che a quello legato alle membrane con alta affinità ($K_a=10^{10}M^{-1}$).

L'Infliximab è stato introdotto per il trattamento delle forme più aggressive della malattia che scarsamente rispondono ai presidi terapeutici comunemente in uso: la malattia perianale e quella steroideo-resistente o dipendente ^(17, 53,54,55).

Il farmaco va somministrato per via endovenosa a 0, 2, 6 settimane e ripetuto ogni 8 settimane nel mantenimento della remissione.

Studi in doppio cieco hanno dimostrato che dosi di 5 mg/kg e 10 mg/kg determinano effetti terapeutici sovrapponibili. Quindi, a parità di effetti clinici è stata scelta come standard la dose di 5 mg/kg somministrati per via endovenosa dopo diluizione in 250 cc di soluzione fisiologica.

Adalimumab

L'adalimumab è un anticorpo (IgG1) monoclonale interamente umanizzato che neutralizza specificamente il TNF- α (Figura 4). Il farmaco, strutturalmente identico agli anticorpi umani, ha il vantaggio di determinare una risposta immune dell'organismo inferiore a quella che si osserva dopo infusione di infliximab (anticorpo chimerico umano-murino). L'adalimumab ha un'emivita di 12-14 giorni e prevede la somministrazione per via sottocutanea.

Il farmaco ha dimostrato elevata efficacia in campo reumatologico, essendo stato registrato ed utilizzato nel trattamento di patologie quali l'artrite reumatoide, la spondilite anchilosante e l'artrite psoriasica, con oltre 180.000 pazienti trattati in tutto il mondo. In campo gastroenterologico l'adalimumab è stato registrato prima nel trattamento della malattia di MC steroideo-dipendente e steroideo-resistente non responsiva alla terapia convenzionale, e successivamente anche nella Colite Ulcerosa.

La terapia con adalimumab prevede un trattamento di induzione con 160 mg ed 80 mg a tempo 0, 2 settimane, con un successiva terapia di mantenimento basata sulla somministrazione di 40 mg a settimane alterne.

La guarigione mucosale nella M. di Crohn

La guarigione mucosale (mucosal healing) è diventato un importante obiettivo terapeutico nella gestione delle malattie infiammatorie intestinali.

Crescenti evidenze indicano che il suo ottenimento può cambiare il corso della malattia riducendo la necessità di ricorrere all'intervento chirurgico, abbassando il tasso di ospedalizzazione e prevenendo le complicanze a lungo termine⁽⁵⁶⁾.

Gli strumenti più idonei per valutare la guarigione mucosale sono rappresentati sostanzialmente dalla ileo-colonscopia.

Per la guarigione mucosale del piccolo intestino gli esami che in teoria offrono maggiore accuratezza diagnostica sono la enteroscopia con video-capsula e la enteroscopia (push o double ballon). In realtà, in considerazione di importanti limitanti pratiche in termini di safety (rischio di impatto in stenosi della video capsula e l'invasività della enteroscopia) si utilizzano, quali markers surrogati di "guarigione" del piccolo intestino la tomografia computerizzata (TC) e la risonanza magnetica (RM).

I sistemi di classificazione e grading dell'attività endoscopica di malattia attualmente in uso sono il CDEIS (Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity)⁽⁵⁷⁾ e il SES-CD (Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease)⁽⁵⁸⁾ (Tabella 1); tali scores risultano altamente riproducibili (eccellente l'accordo inter-osservatore) e sono stati validati mediante diversi studi prospettici. Nonostante ciò, essi risultano piuttosto complicati, pertanto il loro impiego è limitato alle sperimentazioni cliniche mentre risulta raro nella pratica clinica quotidiana⁽⁵⁹⁾.

Nella valutazione endoscopica della recidiva post-chirurgica della MC si utilizza lo score di Rutgeerts, ampiamente utilizzato in diversi trials. Il suo valore prognostico è stato confermato da numerosi studi clinici^(60, 61, 62, 63).

Molteplici sono le definizioni di guarigione endoscopica in associazione con un miglior outcome clinico attualmente disponibili⁽⁵⁹⁾:

- assenza di ulcerazioni della mucosa in tutti i tratti intestinali esplorati mediante endoscopia (64,65,66,67),
- CDEIS ≤ 2 (68),
- SES-CD ≤ 5 ,
- uno score di Rutgeerts pari o inferiore a 1.

La guarigione transmurale nella M. di Crohn

La MC è un patologia caratterizzata da infiammazione transmurale, pertanto, l'obiettivo terapeutico dovrebbe essere l'eradicazione dell'infiammazione in tutti gli strati della parete intestinale (59) (Figura.5): una guarigione limitata al solo strato più superficiale, infatti, costituirebbe un risultato incompleto. Tuttavia, ad oggi, non sono stati pubblicati studi che utilizzino la guarigione transmurale come endpoint terapeutico principale nel trattamento di pazienti con MC, mentre la guarigione della mucosa sta acquistando sempre più rilievo in tal senso.

Negli ultimi anni, è stato proposto il concetto di "deep remission" per i pazienti con MC trattati con farmaci biologici e/o immunosoppressori (69,70). Benché manchi ancora un consenso sulla terminologia, allo stato attuale, la definizione di "remissione profonda" viene applicata a pazienti con MC in remissione clinica stabile senza l'utilizzo di terapia steroidea, senza segni rilevabili di infiammazione intestinale (sia endoscopica che laboratoristica) (64-70).

Recenti studi hanno documentato che la remissione profonda è un fattore prognostico fondamentale che può anche orientare il processo decisionale rispetto alla sospensione della terapia biologica nel lungo termine (71).

Non è chiaro se la guarigione mucosale corrisponda alla guarigione dell'intera parete intestinale. Il verificarsi di quello che abbiamo identificato come "guarigione transmurale" - il miglioramento transmurale valutato attraverso l'ecografia intestinale - nei pazienti con MC trattati con anti-TNF- α (e/o altri farmaci), a nostra conoscenza, è stato esaminato in un numero limitato di pazienti (72-73).

Numerose sono le tecniche di imaging in grado di diagnosticare la malattia e di definirne il grado di attività (entero-RM, entero-TC o enteroclisi, ecografia intestinale), ma nessuna di esse è stata validata per definire la guarigione transmurale. La ricerca futura, pertanto, dovrebbe essere focalizzata ⁽⁵⁹⁾:

- sulla standardizzazione delle tecniche diagnostiche dei criteri di imaging utilizzati per valutare le lesioni nella MC;
- su una definizione standardizzata di guarigione transmurale;
- sull'impatto della guarigione transmurale nell'evoluzione a lungo termine della malattia.

SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo di questo studio è valutare il tasso di guarigione transmurale nei pazienti con malattia di Crohn trattati con farmaci anti-TNF α usando due metodiche di imaging: l'ecografia intestinale e l'entero-RM.

PAZIENTI E METODI

L'esame endoscopico, l'ecografia intestinale e l'entero-RM sono strumenti utilizzati di routine presso la AOU "Federico II" di Napoli per la diagnosi e la valutazione dell'attività di malattia nei pazienti con MC dal 2005.

In questo studio, abbiamo valutato il tasso di remissione clinica senza terapia cortisonica, il tasso di guarigione mucosale e di guarigione transmurale nei pazienti seguiti presso l'Ambulatorio delle malattie infiammatorie croniche intestinali da gennaio 2013 a giugno 2015, dopo il completamento di almeno 2 anni di terapia di mantenimento con i farmaci anti-TNF α .

La diagnosi di MC è stata fatta in accordo alle attuali linee guida della European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO) ^(74,48); l'indicazione all'utilizzo dei farmaci biologici nei pazienti con MC (infliximab ed adalimumab) è in linea con le linee guida della ECCO e le linee guida italiane ^(48, 75).

Tutti i pazienti coinvolti nello studio sono stati sottoposti ad endoscopia, ecografia intestinale ed entero-RM prima e due anni dopo l'inizio della terapia; le tre procedure sono state eseguite entro due settimane. Una valutazione sierologica dei parametri infiammatori (VES, PCR) è stata eseguita in tutti i pazienti ogni 6 mesi, e/o in caso di riacutizzazione clinica.

Inoltre, è stato calcolato il Crohn's Disease Activity Index (CDAI) prima dell'inizio del trattamento e dopo i due anni (Tabella 2).

Terapie concomitanti sono state consentite quando chiaramente indicate.

Remissione clinica libera da steroidi

In accordo con gli statements della ECCO ^(74,48), la remissione clinica è stata definita dalla presenza di un CDAI < 150 in pazienti che non assumevano steroidi sistemici o budesonide.

Ileocolonscopia e guarigione mucosale

L'ileocolonscopia è stata eseguita da un operatore esperto, non a conoscenza dei risultati delle altre procedure diagnostiche, utilizzando un colonscopio standard (Olympus Exera CV-190) dopo pulizia intestinale standard ottenuta con l'impiego di una soluzione orale di 4-L di polietilenglicole (PEG) il giorno prima della procedura. La diagnosi endoscopica di MC veniva posta in accordo alle attuali linee guida della ECCO ⁽⁴⁸⁾. L'attività endoscopica della MC e la presenza della guarigione mucosale dopo 2 anni di trattamento sono state valutate utilizzando il Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease SES-CD ⁽⁵⁸⁻⁶⁴⁾. Il range dello score SES-CD va da 0 a 30, con punteggi maggiori che indicano un'attività di malattia più severa. La guarigione mucosale è stata definita dall'assenza di ulcerazioni in tutti i segmenti esaminati (SES-CD < 2) ⁽⁶⁴⁾.

Ecografia intestinale e guarigione transmurale

L'ecografia intestinale è stata utilizzata per rilevare la guarigione transmurale. La metodica è stata eseguita la mattina dopo un digiuno notturno, usando un ecografo Logiq 7 Pro con sonda lineare e convessa (5-7.5 MHz), senza nessuna particolare preparazione. La procedura è stata eseguita da due gastroenterologi esperti in ecografia intestinale, che non erano a conoscenza dei risultati delle altre procedure diagnostiche. In tutti i pazienti è stato sistematicamente valutato l'intero addome. In accordo con lo studio di Maconi et al ⁽³⁹⁾, la presenza delle stenosi è stata valutata in base a: parete intestinale ispessita (> 3 mm) e rigidità percepita quando applicata una pressione moderata, calibro luminale ridotto, anse distese da fluido o a contenuto iperecogeno subito a monte del tratto

intestinale in questione. La presenza di fistole entero-enteriche, entero-cutanee ed entero-mesenteriche è stata determinata quando, rispettivamente, tra due anse intestinali o tra esse e la cute o esse e il mesentere, venivano visualizzate strutture ipoecogene, duttulari, contenenti fluido o aria⁽⁷⁶⁾. La presenza di ascessi è stata definita in accordo all'attuale letteratura⁽⁷⁶⁻⁴³⁾, in presenza di lesioni rotondeggianti, ipoecogene, con echi interni o parete irregolare. L'ispessimento di parete intestinale è stato considerato normale in presenza di valori < 3 mm⁽⁷⁷⁾. L'ecografia intestinale è stata considerata positiva in presenza di incremento concentrico e regolare dello spessore della parete intestinale > 3 mm⁽⁴⁶⁾. La definizione ecografica di malattia complicata è stata definita in accordo alla letteratura. In caso di diagnosi di MC, è stata descritta nel referto la sede e l'estensione della malattia. La guarigione transmurale è stata definita con ecografia intestinale come riduzione dello spessore di parete a valori inferiori/uguali a 3 mm⁽⁴⁶⁻⁵⁹⁾.

Entero-RM e guarigione transmurale

L'entero-RM è stata eseguita da un radiologo esperto che non conosceva i risultati delle altre procedure diagnostiche. Per ottenere la distensione del piccolo intestino, i pazienti hanno digiunato a partire dalle 6 ore precedenti l'esame, e hanno assunto 1500 mL di soluzione di PEG (34.8 g/500 mL) 60 minuti prima della procedura. La somministrazione endovena di 20 mg di N-butilscolamina (Buscopan; Boehringer, Ingelheim, Germania) ha aiutato a ridurre la motilità del piccolo intestino. Gli esami sono stati eseguiti su sistema RM 3T (Siemens, Erlangen, Germania) in accordo con la corrente letteratura, ed è stato utilizzato il seguente protocollo di acquisizione:

- single-shot turbo spin echo assiali e coronali con e senza la soppressione del segnale adiposo (RARE, half-Fourier acquisizioni rapide con relaxation enhancement);
- balanced gradient-echo (True FISP, true fast imaging with steady-state precession) assiali e coronali;

- T1-weighted fat-suppressed 3-dimensional spoiled gradient-recalled echo (VIBE, volume interpolated breath-hold examination) assiali e coronali.

Le immagini VIBE sono state ottenute prima, 30 e 70 secondi dopo la somministrazione e.v. a bolo di (0.2 mmol/kg) di gadopentetate dimeglumine (Magnevist; Berlex Laboratories, Wayne, NJ) a 3 mL/secondo, seguito da soluzione salina (20 mL). Tre minuti dopo l'iniezione del mezzo di contrasto è stata eseguita una ulteriore singola acquisizione tardiva sul piano assiale utilizzando la stessa sequenza T1-3D VIBE ⁽⁷⁸⁻⁸⁰⁾. La parete intestinale è stata considerata ispessita se > 3 mm. L'ispessimento di parete intestinale (> 3 mm), insieme alla ipervascolarizzazione, sono stati considerati i principali parametri nella diagnosi di MC. L'enhancement patologico della parete intestinale è stato definito da una aumentata intensità della parete intestinale dopo la somministrazione di gadolinium endovena ⁽⁷⁹⁾. Una riduzione dell'ispessimento della parete intestinale < 3 mm senza segni di ipervascolarizzazione era indice di guarigione transmurale con la entero-RM.

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando SPSS Software Package (SPSS software v.15.0, Chicago IL, United States) per Windows. Le statistiche descrittive hanno incluso il calcolo dei valori medi e la deviazione standard (SD) delle variabili continue, e il calcolo delle percentuali e proporzioni delle variabili categoriali. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il chi-quadro e il Mann-Whitney U test, quando appropriato. Per testare la concordanza tra ecografia intestinale ed entero-RM circa la guarigione transmurale, e la concordanza tra remissione clinica/guarigione mucosale, remissione clinica/guarigione transmurale e guarigione mucosale/guarigione transmurale, abbiamo applicato il test di Cohen's (k) dopo aver dicotomizzato queste variabili (remissione clinica: si/no; guarigione mucosale: si/no; guarigione transmurale: si/no). Per quanto concerne la correlazione tra ecografia intestinale/entero-RM, in assenza di un gold standard

chirurgico/patologico, abbiamo assunto l'entero-RM come standard di riferimento per la definizione di guarigione transmurale. Un valore di P inferiore a 0,05 è stato considerato statisticamente significativo. La sensibilità, la specificità, il valore predittivo positivo (VPP) e il valore predittivo negativo (VPN) dell'ecografia intestinale e della entero-RM nella valutazione della guarigione transmurale sono stati calcolati utilizzando Stats Direct statistical software.

RISULTATI

Durante il periodo dello studio, 80 pazienti con diagnosi di MC hanno iniziato la terapia con i farmaci anti-TNF α .

Tuttavia, solo 40 pazienti (50%) hanno continuato la terapia per almeno due anni. Infatti, 30 pazienti hanno interrotto il trattamento con biologici, 15 per eventi avversi (7 casi di infezioni severe; 5 casi di reazioni allergiche; 3 casi di manifestazioni cutanee), 7 di loro per mancata risposta primaria al farmaco, e 8 per complicanze intestinali, che hanno richiesto la chirurgia. I restanti 10 soggetti sono stati esclusi dallo studio per controindicazioni personali alla entero-RM (es. pazienti con impianti metallici o claustrofobici). Per quanto concerne il tipo di farmaco usato, 15 pazienti su 40 (38%) sono stati trattati con infliximab mentre 25 (62%) sono stati trattati con adalimumab. Come da protocollo schedato per l'utilizzo degli anti-TNF α , 3 dei 15 pazienti (18%) in terapia con infliximab hanno richiesto la riduzione dell'intervallo di infusione (da 8 a 6 settimane), mentre 6 dei 25 pazienti (20%) in terapia con adalimumab hanno incrementato il dosaggio (da 40 mg ogni 2 settimane a 40 mg a settimana). Tutti i 40 pazienti sono stati sottoposti ad ecografia intestinale, ileocolonscopia ed entero-RM; in tutti i casi l'endoscopia prevedeva una esplorazione completa del colon e dell'ileo terminale (o neoterminale). Le caratteristiche di base dei pazienti con MC sono riportate nella Tabella 3.

Remissione Clinica

Dopo due anni di terapia con farmaci biologici, 24 dei 40 pazienti trattati (60%) ha raggiunto la remissione clinica libera da steroidi; 10 soggetti (42%) sono stati trattati con infliximab e 14 (58%) con adalimumab. Venti pazienti trattati con biologici (30%) hanno avuto bisogno di un ciclo di steroidi durante il periodo di osservazione. Scarsa concordanza è stata osservata tra remissione clinica e livelli di PCR, dopo 2 anni di trattamento ($k=0.56$; $P=0.02$). Nessun paziente con attività

di malattia clinicamente attiva ha raggiunto la guarigione mucosale e la guarigione transmurale (Tabella 4).

Guarigione mucosale

Quattordici su 40 pazienti (35%) trattati con anti-TNF α hanno raggiunto la guarigione mucosale; 7 soggetti (50%) sono stati trattati con infliximab e 7 (50%) con adalimumab. Il SES-CD medio nella popolazione dello studio è stato 12.1 ± 8.2 prima della terapia con farmaci biologici e 8.6 ± 6.3 dopo il trattamento con anti-TNF α ($P < 0.01$); i pazienti con MC con un SES-CD basale più basso e i pazienti con una durata di malattia più breve (< 2 anni) hanno mostrato una migliore risposta agli anti-TNF α in termini di guarigione mucosale. Tra remissione clinica e guarigione mucosale è stata evidenziata una scarsa concordanza ($k=0.34$; $P < 0.01$), una buona concordanza si è ottenuta invece tra guarigione mucosale e livelli di PCR ($k=0.67$; $P = 0.04$). Conformemente al comportamento della MC, solo 1 dei 6 pazienti con stenosi (16%) e nessun paziente con malattia penetrante ha raggiunto la guarigione mucosale.

Valutazione della guarigione transmurale con l'ecografia intestinale

Dopo 2 anni di trattamento, la guarigione transmurale è stata osservata in 10 pazienti (25%) in terapia con farmaci biologici. Il tipo di anti-TNF utilizzato non ha determinato una significativa differenza in termini di guarigione transmurale ($P=NS$). Lo spessore medio della parete intestinale all'inizio del trattamento si è ridotto significativamente dopo 2 anni di terapia con farmaci biologici ($6.1 \text{ mm} \pm 2.9$ versus $3.9 \text{ mm} \pm 0.7$; $P < 0.01$). Le Figure 6A e 6B mostrano i reperti ecografici prima e dopo il trattamento, rispettivamente. Inoltre, l'estensione della MC del piccolo intestino si è ridotta significativamente (estensione media della MC del piccolo intestino prima del trattamento 35 ± 18 cm versus 20 ± 11 dopo terapia; $P < 0.01$). Analogamente alla guarigione mucosale, i fattori che sembravano essere correlati alla guarigione transmurale sono stati lo score SES-CD precedente al trattamento e la durata media della MC. Infatti, uno score SES-CD basso al basale e una malattia

di breve durata (< 2 anni) sono stati associati alla migliore risposta agli anti-TNF α in termini di guarigione transmurale. I risultati del nostro studio mostrano buona concordanza tra la guarigione transmurale valutata con metodica ecografica e la guarigione mucosale (k=0.63; P < 0.01). In particolare, tutti i casi di guarigione transmurale tranne 4 sono stati associati alla guarigione mucosale. Bassa concordanza è stata trovata tra guarigione transmurale e remissione clinica (k=0.27; P < 0.01), anche se tutti i pazienti che hanno raggiunto la guarigione transmurale erano in remissione clinica. Buona concordanza è stata trovata tra guarigione transmurale e livelli di PCR (k=0.79; P = 0.02). Se consideriamo il comportamento della MC, solo 1 dei 6 pazienti con stenosi (16%) e nessun paziente con MC penetrante ha raggiunto la guarigione transmurale (Tabella 4).

Valutazione della guarigione transmurale con l'entero-RM

Dopo 2 anni di trattamento, la guarigione transmurale è stata osservata in 9 pazienti (23%) con terapia biologica. Non c'è stata differenza significativa in termini di guarigione transmurale in relazione al tipo di anti-TNF α utilizzato (P=NS). Anche in questo caso, lo spessore medio della parete intestinale con la entero-RM si è ridotto significativamente dopo il trattamento con biologici (spessore parietale prima del trattamento 6.4 mm \pm 2.8 versus 3.7 \pm 0.8 dopo due anni di terapia; P < 0.01). Le figure 7A-D mostrano i reperti di entero-RM prima e dopo i due anni del trattamento, rispettivamente. Inoltre, l'estensione media della MC si è ridotta significativamente (estensione media della MC del piccolo intestino prima del trattamento 45 \pm 15 cm versus 18 \pm 12 dopo la terapia; P<0.01). Inoltre, l'enhancement post-contrasto all'entero-RM si è ridotto significativamente in 19 pazienti (47%). Come per la guarigione mucosale, i fattori correlati alla guarigione transmurale sono stati il basso score SES-CD alla valutazione basale e una breve durata di malattia (< 2 anni). Inoltre, è stata trovata una buona concordanza tra la guarigione transmurale valutata con la entero-RM e la guarigione mucosale (k=0.64; P < 0.001). Bassa concordanza è stata trovata tra guarigione transmurale e remissione clinica (k=0.29; P < 0.01); comunque, come per l'ecografia intestinale, tutti i pazienti che hanno raggiunto la guarigione transmurale erano in remissione

clinica. Buona concordanza è stata trovata tra guarigione transmurale e livelli di PCR. ($k=0.77$; $P=0.02$) (Tabella 4).

Ecografia intestinale vs entero-RM

Il confronto in termini di accuratezza diagnostica tra le due tecniche di imaging usate per valutare la guarigione transmurale, ha mostrato un'alta concordanza tra le procedure ($k=0.90$; $P < 0.01$): con l'ecografia intestinale, la normalizzazione dello spessore parietale è stata osservata in 10 pazienti (25%), con l'entero-RM in 9 (23%). È stato rilevato solo un falso positivo con l'ecografia. In particolare, in un paziente con ileite terminale si riscontrava ecograficamente uno spessore della parete intestinale pari a 3 mm rispetto ai 5 mm evidenziati alla entero-RM. La diagnosi finale è stata fatta con l'ileoscopia che mostrava una lieve ileite aftoide.

DISCUSSIONE

In accordo alle attuali linee guida, gli obiettivi della terapia medica nella MC sono la remissione clinica libera da steroidi e la guarigione mucosale ⁽⁴⁸⁾. In questo lavoro, il nostro team ha preso in considerazione un endpoint terapeutico ad oggi mai valutato: la guarigione transmurale.

La guarigione transmurale, intesa come normalizzazione dell'ispessimento infiammatorio della parete intestinale nei tratti coinvolti dalla malattia, valutata da tecniche di imaging, può essere ottenuta in circa il 25% dei pazienti trattati con farmaci anti-TNF α .

In assenza di una procedura *gold standard* per valutare la guarigione transmurale, abbiamo scelto due procedure non invasive e accurate: l'ecografia intestinale e l'entero-RM. La nostra decisione è stata supportata da diverse reviews e meta-analisi sull'utilizzo delle suddette procedure nella diagnosi e follow-up della MC ⁽⁷⁷⁻⁵⁹⁾.

Il nostro gruppo in uno studio condotto nel 2013 ⁽⁵⁰⁾, ha confrontato l'accuratezza dell'ecografia intestinale rispetto all'entero-RM nella diagnosi della MC. Nello studio si concludeva che l'ecografia intestinale è accurata quanto l'entero-RM nella diagnosi della MC del piccolo intestino, ed è una metodica più diffusa, più disponibile, e meno costosa.

Nello studio, utilizzando l'ecografia intestinale, abbiamo osservato che il 25% della nostra popolazione trattata con anti-TNF α ha raggiunto la guarigione transmurale. Questa osservazione conferma i nostri precedenti risultati ⁽⁸¹⁾ e supporta i risultati di Paredes ⁽⁷²⁾, che evidenzia la normalizzazione ecografica in 5 di 24 pazienti con MC (20%) trattati con anti-TNF α . Con l'utilizzo dell'entero-RM, abbiamo osservato la guarigione transmurale in 9 pazienti in terapia con farmaci biologici (23%). Questi dati indicano che c'è un'alta concordanza tra le 2 procedure ($k=0.90$; $P < 0.01$). Per quanto è a nostra conoscenza, questo è il primo lavoro che confronta direttamente l'efficacia delle due procedure nella valutazione della guarigione transmurale. Alcuni studi hanno esplorato il ruolo della entero-RM nella valutazione degli effetti della terapia sulle lesioni transmurali nei pazienti con MC. In una recente pubblicazione, Van Assche et al ⁽⁸²⁾ hanno riportato

un miglioramento dell'entero-RM index nel 44% dei pazienti a 2 settimane dall'inizio della terapia e nell'80% a 26 settimane. Gli autori riportano anche che l'assenza completa delle lesioni infiammatorie è stata osservata in 0/18 pazienti a 2 settimane e nel 13% (2/15) a 26 settimane e concludono che i miglioramenti all'entero-RM si manifestano con maggiore probabilità a partire dalla terza settimana di trattamento con infliximab. I tassi di guarigione riportati da Van Assche sono più bassi di quelli trovati nella nostra ricerca, probabilmente perché nel nostro studio il periodo di trattamento (2 anni) è sensibilmente più lungo.

Nel nostro studio, i fattori maggiormente correlati con la normalizzazione dello spessore parietale sia all'ecografia intestinale che all'entero-RM sono stati lo score SES-CD pre-trattamento e la durata media della MC. I nostri risultati sono conformi con quelli dei trials con i farmaci biologici usati in pazienti con uno stadio precoce di malattia ⁽⁵¹⁻⁶⁸⁾ e suggeriscono che i pazienti con la MC "early" rispondono meglio agli anti-TNF α , anche in termini di guarigione transmurale.

Inoltre, nel nostro studio, abbiamo trovato una buona concordanza tra guarigione mucosale e guarigione transmurale valutata all'ecografia intestinale ($k=0.63$; $P < 0.001$), a conferma dei nostri precedenti risultati ⁽⁸¹⁾; allo stesso tempo, una buona concordanza è stata trovata tra guarigione transmurale e guarigione mucosale valutata con la entero-RM ($k=0.64$; $P < 0.001$), e, tranne in 4 casi, la guarigione transmurale era associata alla sottostante guarigione mucosale.

Sulla base di questi dati, la presenza della guarigione transmurale sia all'ecografia intestinale che alla entero-RM potrebbe essere considerata un forte predittivo di guarigione mucosale e potrebbe potenzialmente ridurre la necessità del follow-up endoscopico.

Inoltre, i nostri risultati sottolineano la scarsa correlazione tra i risultati endoscopici, ecografici, radiologici (entero-RM), biochimici e la remissione clinica nei pazienti con MC. È ben noto che il CDAI non correla significativamente con il riscontro endoscopico ⁽⁵¹⁾. Infatti, abbiamo trovato bassa concordanza tra remissione clinica e i livelli di PCR dopo due anni di trattamento ($k=0.56$; $P=0.02$); bassa concordanza è stata osservata tra remissione clinica e guarigione mucosale, sia utilizzando l'ecografia intestinale che la entero-RM ($k=0.27$ e 0.29 , rispettivamente; $P < 0.01$). Abbiamo

trovato bassa concordanza anche tra guarigione trasmurale e i livelli di PCR, sia usando l'ecografia intestinale che l'entero-RM ($k=0.79$ e 0.77 , rispettivamente; $P=0.02$).

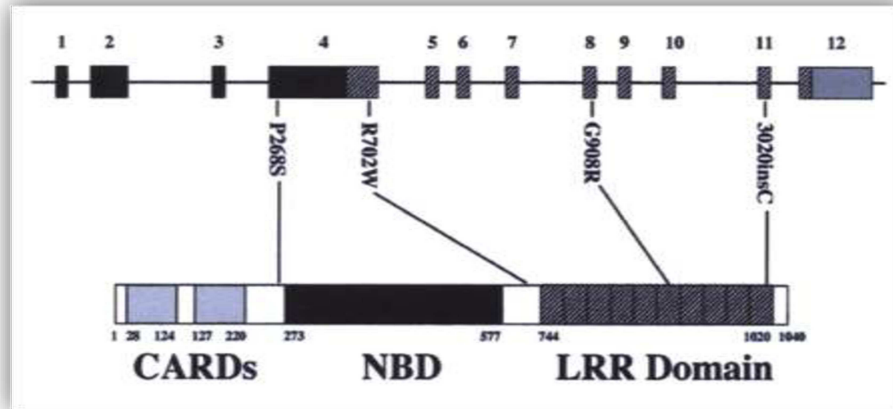
Il nostro lavoro presenta alcuni limiti. Entrambe le procedure, l'ecografia intestinale e l'entero-RM, non prendono in esame alcuni parametri come la stratificazione della parete intestinale, i segnali vascolari, il Power Doppler e il pattern dopo mezzo di contrasto ⁽⁸³⁾. Comunque, nella nostra esperienza, lo studio della stratificazione e della vascolarizzazione è molto difficile quando lo spessore della parete intestinale è < 3 mm, cioè quando lo spessore parietale è considerato nella norma. Inoltre, nei risultati riportati in termini di guarigione trasmurale, abbiamo considerato solo l'ispessimento della parete intestinale piuttosto che le complicanze stenosanti e/o penetranti, perché l'incremento dell'ispessimento della parete intestinale è una "*conditio sine qua non*" per il verificarsi di tali complicanze nella MC. In effetti, tutti i pazienti con stenosi o fistole mostrano un incremento e un ispessimento patologico della parete intestinale e, come conseguenza, sono stati automaticamente esclusi dalla definizione di guarigione trasmurale.

Recentemente, come sopra menzionato, Rimola et al ⁽⁸⁴⁾ hanno riportato uno score per l'entero-RM (i.e. MaRIA index) altamente correlato con i risultati endoscopici nella MC. Poiché lo scopo di tale score non era determinare la guarigione trasmurale, gli autori non definiscono chiaramente questo aspetto ed è questo il motivo per cui si è deciso di non utilizzarlo nello studio.

In conclusione, questo studio conferma i nostri precedenti risultati relativi alla guarigione trasmurale valutata con metodica ecografica e dimostra, confrontando direttamente due procedure di imaging non invasive e sicure, che la guarigione trasmurale può essere raggiunta nel 25 % dei pazienti con MC trattati con farmaci anti-TNF α . La validazione dei dati su casistiche più ampie potrebbe suggerire l'utilizzo dell'ecografia come metodica di scelta per il follow-up dei pazienti con MC con l'obiettivo terapeutico rappresentato dalla guarigione a tutto spessore della parete intestinale.

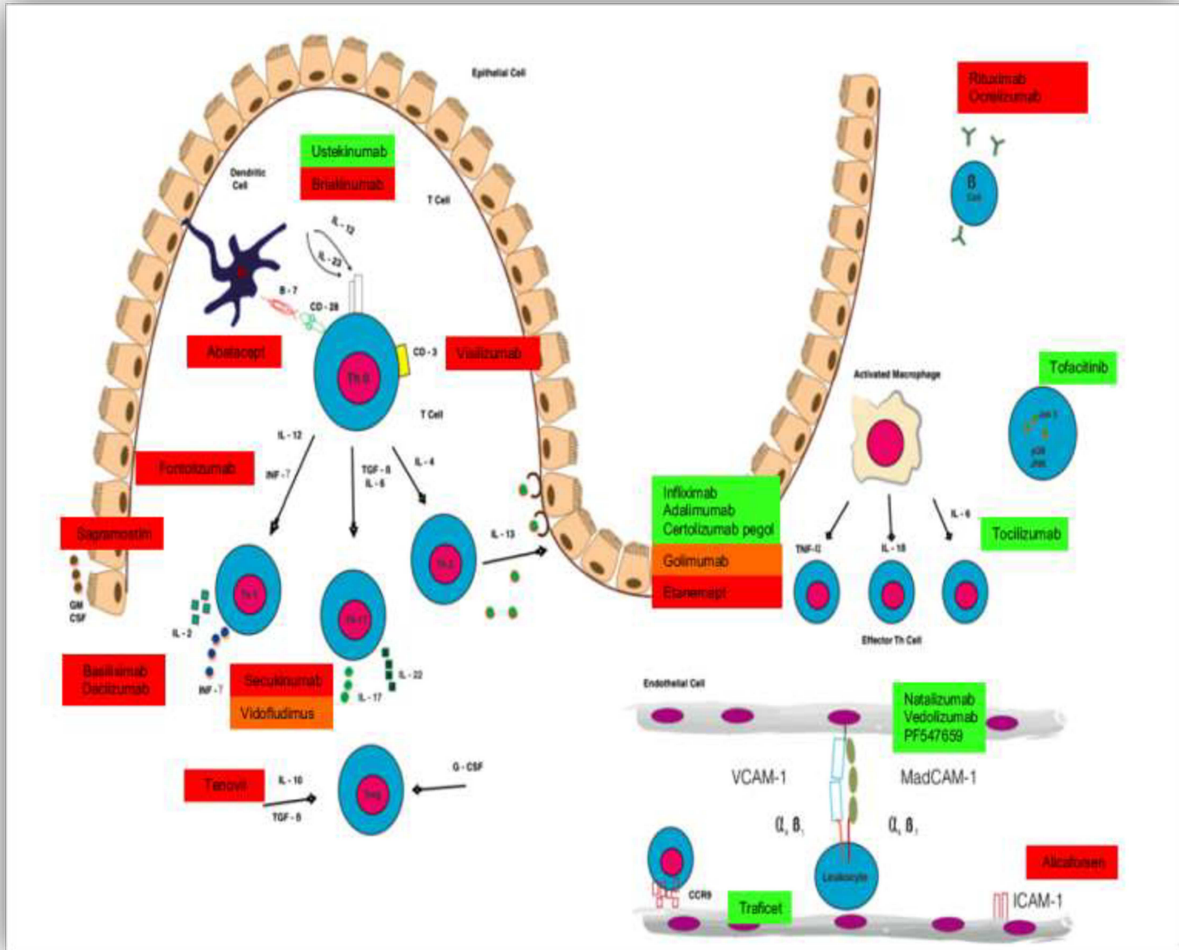
FIGURE E TABELLE

Figura 1. Struttura del gene NOD2/CARD15.



(modificata da: Bonen et al, Gastroenterology 2003)

Figura 2. Programmi terapeutici di successo e insuccesso nella malattia infiammatoria intestinale.
 Verde: programmi con esito positivo. Arancione: programmi potenzialmente efficaci o in corso.
 Rosso: programmi non riusciti.



(modificata da: Danese, Gut 2012)

Figura 3. Immagini ecografiche e di entero-RM



Fig. 1: MC, ecografia. Ispessimento parietale in sezione trasversale (“pseudokidney”) e longitudinale.

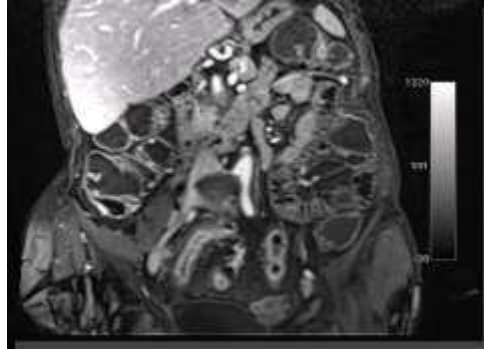


Fig. 4: MC, entero-RM. Ispessimento parietale (freccia) in fase T1 post-mdc.



Fig. 2: MC, ecografia. Stenosi ileale con significativa dilatazione a monte.

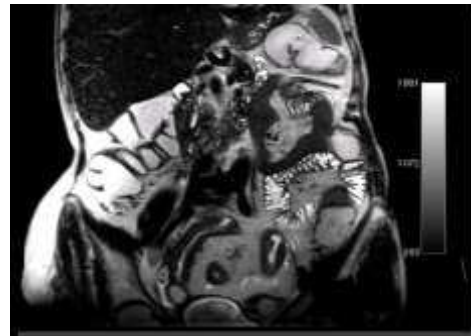


Fig. 5: MC, entero-RM. Ispessimento parietale (freccia) in fase T2.



Fig. 3: MC, ecografia. Fistola entero-enterica con evidente tramite fistoloso tra le due anse.

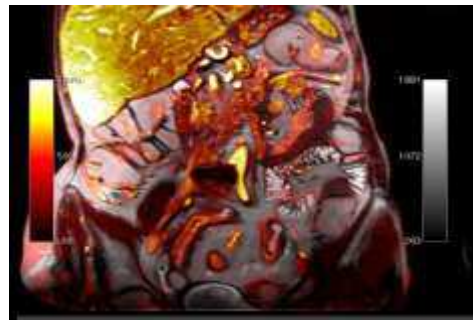


Fig. 6: MC, entero-RM. Ispessimento parietale (freccia). Immagine di fusione T1 con mdc e T2.

Figura 4. Struttura dell'infliximab e dell'adalimumab: Anticorpo monoclonale originale di topo IgG1 (MABS).

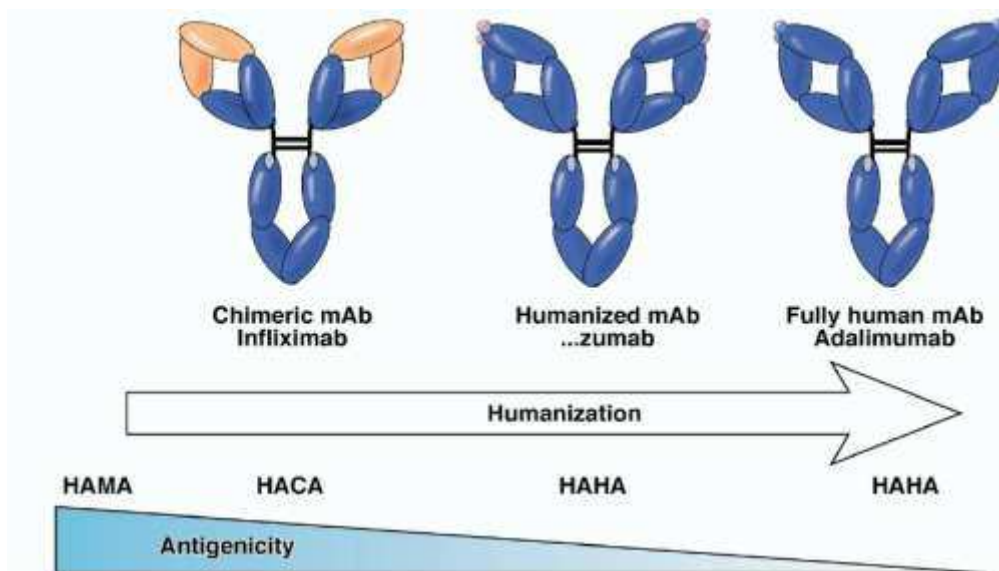
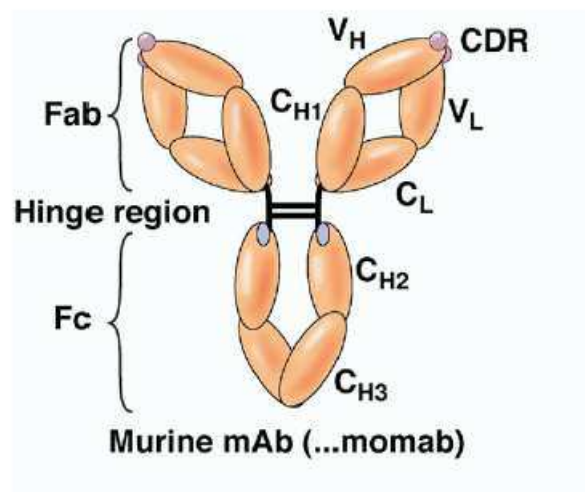


Figura 5. Infiammazione transmurale nella M. di Crohn

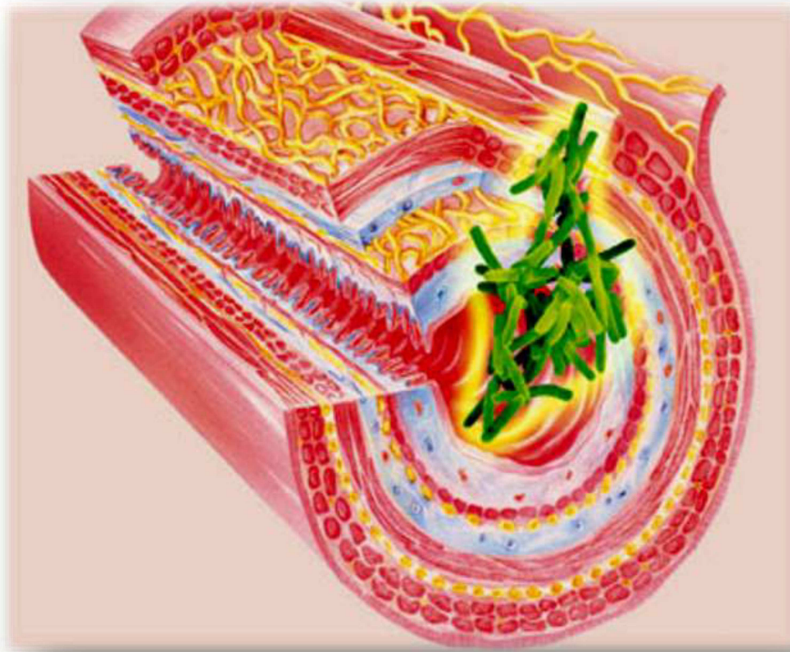


Figura 6. Prima del trattamento, l'ileo terminale mostra un chiaro incremento dello spessore della parete intestinale (A) all'ecografia. Dopo 2 anni di terapia con anti-TNF α si evidenzia la guarigione transmurale (B).

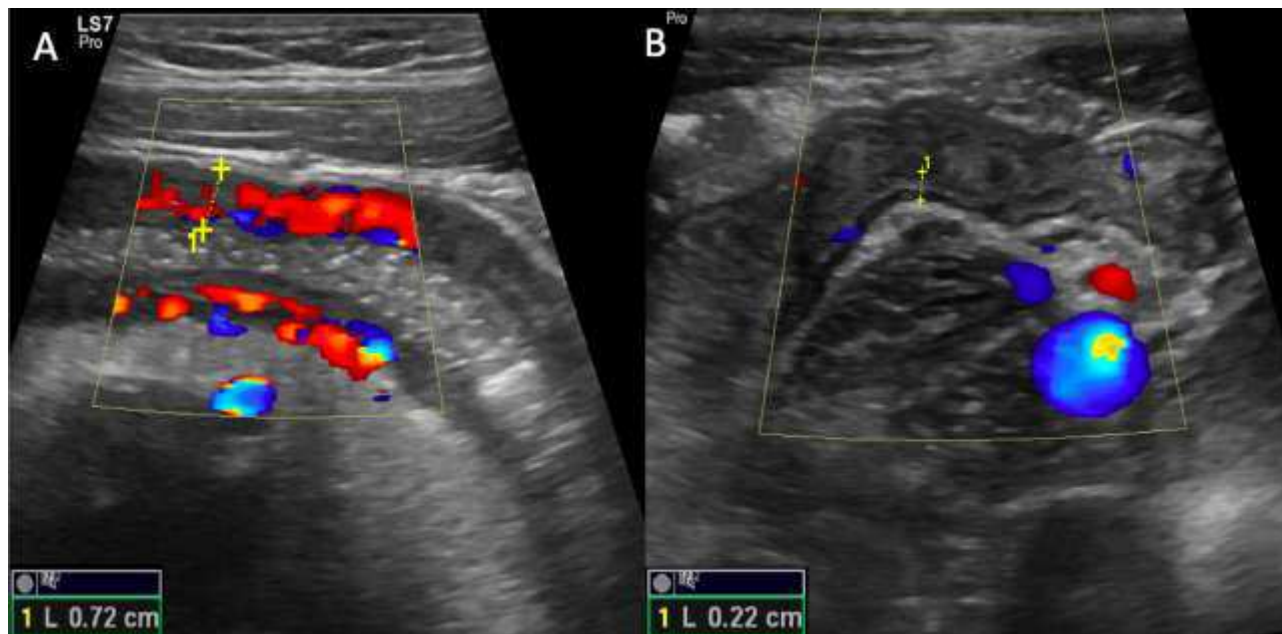


Figura 7. Prima del trattamento, l'ileo terminale mostra l'ispessimento di parete (7 mm) con HASTE T2 coronal image (A) e l'iperenhancement trasmurale con T1 VIBE coronal image (B). Dopo il trattamento con gli anti-TNF il normale aspetto della parete intestinale (C) e dell'enhancement (D) suggeriscono la guarigione trasmurale.

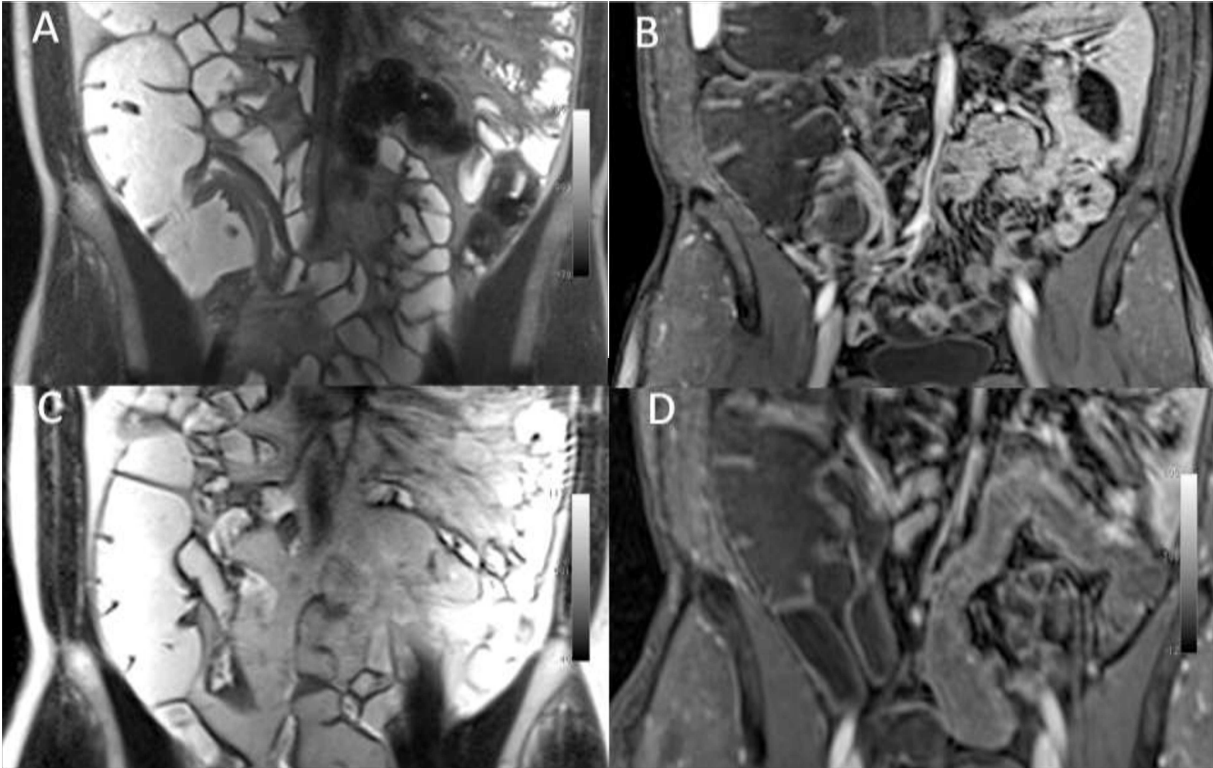


Tabella 1. SES-CD (Simple Endoscopic Index for Crohn's disease)

SEVERITY	0	1	2	3
ULCERE	Assenza di ulcere	Ulcere aftoidi <0.5 cm	Ulcere grandi 0.5-2 cm	Ulcere vaste >2 cm
Estensione della superficie ulcerata	Superficie non ulcerata 0%	Ulcere che coinvolgono < 10% del segmento	Ulcere che coinvolgono il 10-30% del segmento	Ulcere che coinvolgono > 30% del segmento
Estensione della superficie coinvolta da malattia	Nessuna superficie coinvolta 0%	Lesioni di malattia che coinvolgono < 50 % del segmento	Lesioni di malattia che coinvolgono il 50-75% del segmento	Lesioni di malattia che coinvolgono >75% del segmento
Presenza di restringimento/ stenosi del lume	Nessun restringimento	Singolo restringimento superabile	Restringimenti multipli, superabili	Restringimento non valicabile (stenosi)

Tabella 2. Crohn's Disease Activity Index (CDAI)

Variabili	Fattori di moltiplicazione
Numero di evacuazioni*	X 2
Dolore addominale * (0=no; 1=lieve; 2=moderato;3=severo)	X 5
Benessere generale* (bene: 0;accettabile: 1; male:2; molto male:3; terribile:4)	X 7
Numero di manifestazioni cliniche	
Artrite/artralgia	X 20
Irite/Uveite	
Eritema nodoso/pioderma/afte	
Fistola anale/ascessi	
Altre fistole	
Febbre > 38.5 ° C nella settimana precedente	
Assunzione di anti-diarroici (no:0; si: 1)	X 30
Ematocrito	X 6
(47: maschi)	
(43: femmine)	
% al di sotto del peso ideale	X 1
* nei giorni precedenti	
Punteggio ≤ 150 remissione	
151-219 attività lieve	
220- 450 attività moderata	
> 450 attività grave o molto grave	

Tabella 3. Caratteristiche dei pazienti con M. di Crohn

Numero	40	-	
Maschi/femmine	24/16	-	
Media dell'età	32 (17 – 64)	-	
Durata di MC (mesi)	36 (4 – 66)	-	
Crohn's Disease Activity Index	324 (172 – 430)	-	
Infliximab/Adalimumab	15/25	-	
Terapia con azatioprina (%)	2 (13)	-	
Ciclo di steroidi (%)	12 (30)	-	
5-ASA (%)	11 (27)	-	
Incremento della PCR (%)	35 (88)	-	
Localizzazione, L1-L2-L3-L4	19 – 12 – 9 – 0	-	
Behaviour, B1-B2-B3	33 – 6 – 1	-	
Estensione MC del piccolo intestino, media + SD (cm)	45 + 15	-	
Malattia perianale (%)	12 (30)	-	
Manifestazioni extra-intestinali (%)	14 (35)	-	
SES-CD, media ± SD	12.1 ± 10.2 *	8.6 ± 2.3 †	< 0.01
Ispessimento di parete EUS ± SD	6.1 ± 2.9 *	3.9 ± 0.7 †	< 0.01
Ispessimento di parete entero-RM ± SD	6.4 ± 2.8 *	3.7 ± 0.8 †	< 0.01

* Prima di iniziare gli anti-TNF

† Dopo l'inizio con gli anti- TNF

Tabella 4. Principali risultati derivanti dalla concordanza (Cohen's k) tra i differenti outcomes

Outcomes	k	p
GT con ECOI vs GT con entero-RM	0.84	< 0.01
GT con ECOI vs GM	0.63	< 0.001
GT con ECOI vs RC	0.27	< 0.01
GT con ECOI vs PCR	0.79	0.02
GT con entero-RM vs GM	0.64	< 0.01
GT con entero-RM vs RC	0.29	< 0.01
GT con entero-RM vs PCR	0.77	0.02

GT: guarigione transmurale

ECOI: ecografia intestinale

GM: guarigione mucosale

RC: remissione clinica

PCR: proteina C reattiva

BIBLIOGRAFIA

1. Peyrin-Biroulet L, Loftus EV Jr, Colombel JF, Sandborn WJ. The natural history of adult Crohn's disease in population-based cohorts. *Am J Gastroenterol* 2010; 105:289-297.
2. Peyrin-Biroulet L, Cieza A, Sandborn WJ, et al. Disability in inflammatory bowel disease: developing ICF Core Sets for patients with inflammatory bowel diseases based on the International Classification of Functioning, Disability and Health. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16:15-22.
3. Pariente B, Peyrin-Biroulet L, Cohen L, et al. Review and Perspective: The Role of Cross-Sectional Imaging in Evaluating Bowel damage in Crohn Disease. *AJR Am J Roentgenol* 2011 Jul;197(1):42-9.
4. Sinha R., P. Murphyb, P. Hawker, S. Sandersd, A. Rajeshe, R. Verme. Role of MRI in Crohn's disease. *Clinical Radiology* 2009;64:341-352
5. Ekblom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, population-based study in Sweden. *Gastroenterology* 1991;100:350-8.
6. Garland CF, Lilienfeld AM, Mendeloff AI. Incidence rates of ulcerative colitis and Crohn's disease in 15 areas of the United States. *Gastroenterology* 1981;81:1115-24.
7. Maglente D, Gourtsoyiannis N, Rex D, et al. Classification of small bowel Crohn's subtypes based on multimodality imaging. *Radiol Clin North Am* 2003; 41:285-303.
8. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW, Kaplan GG. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 2012 Jan; 142(1):46-54.
9. Przemioslo RT, Ciclitira PJ. Pathogenesis of Crohn's disease. *Q J M* 1995;88:525e7.

10. Ekblom A, Wakefield AJ, Zack M, Adami HO. The role of perinatal measles infection in the aetiology of Crohn's disease: a population based epidemiological study. *Lancet* 1994;344:508-10.
11. Sanderson JD, Moss MT, Tizard MLV, Hermon-Taylor J. Mycobacterium paratuberculosis DNA in Crohn's disease tissue. *Gut* 1992;33:890-6.
12. Benoni C, Nilsson A. Smoking habitus in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1984;29:824-30.
13. Bonen D, Cho J. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2003;124:521-36.
14. Elson CO. Genes, microbes, and T cells – New therapeutic targets in Crohn's disease. *N Engl J Med* 2002;346:614-16.
15. Barreiro-de Acosta M, Pena Amado S. Clinical applications of NOD2/CARD15 mutation in Crohn's disease. *Acta Gastroenterol Latinoam* 2007; 37:49-54.
16. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603-6
17. Targan SR, Hanauer SB, Van Deventer SJ, et al. A short term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. *N Engl J Med* 1997;337:1029-35.
18. Shanahan F. Crohn's disease. *Lancet* 2002;359:62-9.
19. Irvine EJ, Marshall JK. Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk. *Gastroenterology* 2000;119:1740-4.
20. Podolsky DH. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002;347:417-29.
21. Pallone F, Del Vecchio Blanco G, Valvassori P, et al. Genetic and pathogenetic insights into inflammatory bowel disease. *Curr Gastroenterol Rep* 2003;5:487-92.

22. Engel MA, Neurath MF. New pathophysiological insight sandmodern treatment of IBD. *J Gastroenterol* 2010;45:571e83.
23. Fuss IJ, Becker C, Yang Z, et al. Both IL-12p70 and IL-23 are synthesized during active Crohn's disease and are down regulated by treatment with anti-IL-12p40 monoclonal antibody. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:9e15.
24. MacDonald TT, Monteleone I, Fantini MC, et al. Regulation of homeostasis and inflammation in the intestine. *Gastroenterology* 2011;140:1768e75.
25. Waetzig GH, Schreiber S. Mechanisms of infliximab: the reverseside of a drug effect. *Inflamm Bowel Dis* 2004;s10:38-43.
26. Tanaka M, Riddell RH. The pathological diagnosis of Crohn's disease. *Hepato gastroenterology* 1990;37:18-31.
27. Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J, D'Haens G, Hanauer SB, Irvine EJ, Jewell DP, Rachmilewitz D, Sachar DB, Sandborn WJ, Sutherland LR. A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congress of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis* 2000;6:8-15.
28. Kirshner JB. The local and systemic complications of inflammatory bowel disease. *JAMA* 1979;242:1177-83.
29. MacKalski B A, Bernstein C N. New Diagnostic Imaging Tools for Inflammatory Bowel Disease. *Gut* 2006; 55:733-741.
30. Sinha R, Verma R, et al. MR Enterography of Crohn Disease: Part I, Rationale, Technique, and Pitfalls. *AJR* 2011; 197:76-79.
31. Saibeni S, Condotti E, et al. Imaging of the Small Bowel in Crohn's disease: A Review of New and Old Tecniques. *World J Gastroenterol* 2007 June 28; 13(24):3279-3287
32. Rispo A, Imbriaco M, Celentano L, Cozzolino A, Camera L, Mainenti PP, Manguso F, Sabbatini F, D'Amico P, Castiglione F. Non-invasive diagnosis of small bowel Crohn's

- disease: combined use of bowel sonography and Tc-99m-HMPAO leukocyte scintigraphy. *InflammBowel Dis* 2005;11:376-82.
33. Desmond AN, O'Regan K, Curran C, McWilliams S, Fitzgerald T, Maher MM, Shanahan F. Crohn's disease: factors associated with exposure to high levels of diagnostic radiation. *Gut* 2008 Nov;57(11):1524-9.
 34. Malchow H, Eng K, Brandes W, et al. European Cooperative Crohn's Study (ECCDS): results of drug treatment. *Gastroenterology* 1984;86:249-66.
 35. Jeong SH, Lee KJ, Kim YB et al. Diagnostic value of terminal ileum intubation during colonoscopy. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008;23:51-5.
 36. Soyer P, Boudiaf M, Dray X et al. Crohn's disease: multi-detector row CT-enteroclysis appearance of the appendix. *Abdom Imaging.* 2010;35:654-60.
 37. Summers RW, Swirz DH, Sessions JT, et al. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 1979;77:847-69.
 38. Pearson DC, May GR, Fick GH, et al. Azathioprine and 6-Mercaptopurine in Crohn's disease. A meta-analysis. *Ann Inter Med* 1995;123:132-42.
 39. Maconi G, Bollani S, Bianchi Porro G. Ultrasonographic detection of intestinal complications in Crohn's disease. *Dig Dis Sci*1996;41:1643-8
 40. Rispo A, Bucci L, Pesce G, Sabbatini F, de Palma GD, Grassia R, Compagna A, Testa A, Castiglione F. Bowel sonography for the diagnosis and grading of postsurgical recurrence of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2006 Jun;12(6):486-90.
 41. Castiglione F, de Sio I, Cozzolino A, Rispo A, Manguso F, Del Vecchio Blanco G, Di Girolamo E, Castellano L, Ciacci C, Mazzacca G. Bowel wall thickness at abdominal ultrasound and the one-year-risk of surgery in patients with Crohn's disease. *Am J Gastroenterol.* 2004 Oct; 99(10):1977-83.

42. Kohn A, Cerro P, Milite G, De Angelis E, Prantera C. Prospective evaluation of transabdominal bowel sonography in the diagnosis of intestinal obstruction in Crohn's disease: comparison with plain abdominal film and small bowel enteroclysis. *Inflamm Bowel Dis*. 1999 Aug;5(3):153-7.
43. Fraquelli M, Sarno A, Girelli C, Laudi C, Buscarini E, Villa C, Robotti D, Porta P, Cammarota T, Ercole E, Rigazio C, Senore C, Pera A, Malacrida V, Gallo C, Maconi G. Reproducibility of bowel ultrasonography in the evaluation of Crohn's disease. *Dig Liver Dis*. 2008 Nov;40(11):860-6.
44. Gasche C, Moser G, Turetschek K, et al. Transabdominal bowel sonography for the detection of intestinal complications in Crohn's disease. *Gut*. 1999;44:112-117.
45. Parente F, Maconi G, Bollani S, Anderloni A, Sampietro G, Cristaldi M, Franceschelli N, Bianco R, Taschieri A M, Bianchi Porro G. Bowel ultrasound in assessment of Crohn's disease and detection of related small bowel strictures: a prospective comparative study versus x ray and intraoperative findings. *Gut* 2002;50:490-495
46. Parente F, Greco S, Molteni M, Anderloni A, Maconi G, Bianchi Porro G. Modern imaging of Crohn's disease using bowel ultrasound. *Inflamm Bowel Dis*. 2004 Jul;10(4):452-61.
47. Parente F, Greco S, Molteni M, et al. Oral contrast enhanced ultrasonography in the assessment of small intestine Crohn's disease. A prospective study with conventional ultrasound, x ray studies and ileocolonoscopy. *Gut*. 2004;53:1652-1657.
48. European Crohn's and Colitis Organization (ECCO). The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Current management. *Journal of Crohn's and Colitis* 2010;4:28-62
49. Rieber A, Wruk D, Potthast S, Nüssle K, Reinshagen M, Adler G, Brambs HJ. Diagnostic imaging in Crohn's disease: comparison of magnetic resonance imaging and conventional imaging methods. *Int J Colorectal Dis*. 2000 Jun;15(3):176-81.

50. Castiglione F, Mainenti PP, De Palma GD, et al. Non-invasive diagnosis of small bowel Crohn's disease: direct comparison of bowel sonography and MR-enterography. *Inflamm Bowel Dis*. 2013 Aug 19(9):1928-34.
51. D'Haens G, Baert F, van Assche G, et al. Early combined immunosuppression or conventional management in patients with newly diagnosed Crohn's disease: an open randomised trial. *Lancet*. 2008;371:660–667.
52. Ordás I, Feagan BG, Sandborn WJ. Early use of immunosuppressives or TNF antagonists for the treatment of Crohn's disease: time for a change. *Gut*. 2011;60:1754–1763.
53. Present DH, Rutgeerts P, Targan SR, et al. Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *N Engl J Med* 1999;340:1398-1405.
54. Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, et al. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet* 2002;359:1541-9.
55. Sands BE, Anderson FH, Bernstein CN, et al. Infliximab maintenance therapy for fistulising Crohn's disease. *N Engl J Med* 2004;350:934-6.
56. Peyrin-Biroulet L., Ferrante M., Magro F. et al. Results from the 2nd Scientific Workshop of the ECCO (I): Impact of mucosal healing on the course of inflammatory bowel disease. *JCC* (2011) 5, 477-483.
57. Mary JY, Modigliani R. Development and validation of an endoscopic index of the severity for Crohn's disease: a prospective multicentre study. Groupe d'Etudes Therapeutiques des Affections Inflammatoires du Tube Digestif (GETAID). *Gut* 1989;30:983
58. Daperno M, D'Haens G, Van Assche G, Baert F, Bulois P, Maunoury V, et al. Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD. *Gastrointest Endosc* 2004;60:505-12.

59. Daperno M., Castiglione F., De Ridder L. et al. Results of the 2nd part Scientific Workshop of the ECCO (II): Measures and markers of prediction to achieve, detect, and monitor intestinal healing in inflammatory bowel Disease. *JCC* (2011) 5, 484-498.
60. Cellier C, Sahmoud T, Froguel E, Adenis A, Belaiche J, Bretagne JF, et al. Correlations between clinical activity, endoscopic severity, and biological parameters in colonic or ileocolonic Crohn's disease. A prospective multicentre study of 121 cases. The Groupe d'Etudes Therapeutiques des Affections Inflammatoires Digestives. *Gut* 1994;35:231-5.
61. Ardizzone S, Maconi G, Sampietro GM, Russo A, Radice E, Colombo E, et al. Azathioprine and mesalamine for prevention of relapse after conservative surgery for Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004;127:730-40.
62. Hanauer SB, Korelitz BI, Rutgeerts P, Peppercorn MA, Thisted RA, Cohen RD, et al. Postoperative maintenance of Crohn's disease remission with 6-mercaptopurine, mesalamine, or placebo: a 2-year trial. *Gastroenterology* 2004;127:723-9.
63. Marteau P, Lemann M, Seksik P, Laharie D, Colombel JF, Bouhnik Y, et al. Ineffectiveness of *Lactobacillus johnsonii* LA1 for prophylaxis of postoperative recurrence in Crohn's disease: a randomised, double blind, placebo controlled GETAID trial. *Gut* 2006;55:842-7.
64. Rutgeerts P, Van Assche G, Sandborn WJ, et al. Adalimumab induces and maintains mucosal healing in patients with Crohn's disease: data from the EXTEND trial. *Gastroenterology* 2012; 142:1102-11.e2.
65. Reinisch W, Angelberger S, Petritsch W, Shonova O, Lukas M, Bar-Meir S, et al. Azathioprine versus mesalazine for prevention of postoperative clinical recurrence in patients with Crohn's disease with endoscopic recurrence: efficacy and safety results of a randomised, double-blind, double-dummy, multicentre trial. *Gut* 2010;59:752-9.
66. Rutgeerts P, Diamond RH, Bala M, Olson A, Lichtenstein GR, Bao W, et al. Scheduled maintenance treatment with infliximab is superior to episodic treatment for the healing of

- mucosal ulceration associated with Crohn's disease. *Gastrointest Endosc* 2006;63:433-42; quiz 464.
67. Baert F, Moortgat L, Van Assche G, Caenepeel P, Vergauwe P, De Vos M, et al. Mucosal healing predicts sustained clinical remission in patients with early-stage Crohn's disease. *Gastroenterology* 2010;138:463-8; quiz e10-1.
68. Colombel JF, Sandborn WJ, Reinisch W, et al. Infliximab, azathioprine, or combination therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med* 2010; 362:1383-95.
69. Hommes D, Colombel JF, Emery P, et al. Changing Crohn's disease management: need for new goals and indices to prevent disability and improve quality of life. *J Crohns Colitis*. 2012;6:S224–S234.
70. Travis S, Feagan BG, Rutgeerts P, et al. The future of inflammatory bowel disease management: combining progress in trial design with advances in targeted therapy. *J Crohn's Colitis*. 2012;6:S250–S259.
71. Louis E, Mary JY, Vernier-Massouille G, et al. Maintenance of remission among patients with Crohn's disease on antimetabolite therapy after infliximab therapy is stopped. *Gastroenterology*. 2012;142:63–70.
72. Paredes JM, Ripolles T, Cortes X, et al. Abdominal sonographic changes after antibody to tumor necrosis factor (anti-TNF) alpha therapy in Crohn's disease. *Dig Dis Sci*. 2010;55:404–410.
73. Ripolles T, Martinez MJ, Barrachina MM. Crohn's disease and color Doppler sonography: response to treatment and its relationship with long-term prognosis. *J Clin Ultrasound*. 2008;36:267–272
74. Van Assche G, Dignass A, Panes J, et al; European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO). The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis*. 2010;4:7-27.

75. Orlando A, Armuzzi A, Papi C, et al. The Italian Society of Gastroenterology (SIGE) and the Italian Group for the study of Inflammatory Bowel Disease (IG-IBD) Clinical Practice Guidelines: the use of tumor necrosis factor-alpha antagonist therapy in inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis*. 2011;43:1–20.
76. Oberhuber G, Stangl PC, Vogelsang H, et al. Significant association of strictures and internal fistula formation in Crohn's disease. *Virchows Arch*. 2000;437:293–297.
77. Fraquelli M, Colli A, Casazza G, et al. Role of US in detection of Crohn disease: meta-analysis. *Radiology*. 2005;236:95–101.
78. Maccioni F, Viscido A, Marini M, et al. MRI evaluation of Crohn's disease of the small and large bowel with the use of negative superparamagnetic oral contrast agents. *Abdom Imaging*. 2002;27:384–393.
79. Maccioni F, Bruni A, Viscido A, et al. MR imaging in patients with Crohn disease: value of T2- versus T1-weighted gadolinium-enhanced MR sequences with use of an oral superparamagnetic contrast agent. *Radiology*. 2006;23:517–530.
80. Siddiki HA, Fidler JL, Fletcher JG, et al. Prospective comparison of state-of-the-art MR enterography and CT enterography in small-bowel Crohn's disease. *AJR Am J Roentgenol*. 2009;193:113–121.
81. Castiglione F, Testa A, Rea M, et al. Transmural healing evaluated by bowel sonography in patients with Crohn's disease on maintenance treatment with biologics. *Inflamm Bowel Dis*. 2013; 19:1928-34.
82. Van Assche G, Herrmann KA, Louis E, et al. Effects of infliximab therapy on transmural lesions as assessed by magnetic resonance enteroclysis in patients with ileal Crohn's disease. *J Crohns Colitis*. 2013;12:950–957
83. Kiss LS, Szamosi T, Molnar T, et al. Early clinical remission and normalisation of CRP are the strongest predictors of efficacy, mucosal healing and dose escalation during the

first year of adalimumab therapy in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011;34:911-22.

84. Rimola J, Rodriguez S, García-Bosch O, et al. Magnetic resonance for assessment of disease activity and severity in ileocolonic Crohn's disease. *Gut* 2009;58:1113-20.