



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

DOTTORATO di RICERCA in
MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE
XXXII CICLO

UO GASTROENTEROLOGIA ED ENDOSCOPIA DIGESTIVA

**MARCATORI SPECIFICI NELLE IBD E
PERSONALIZZAZIONE DELLE STRATEGIE
TERAPEUTICHE ATTRAVERSO
L'APPROCCIO PROTEOMICO**

SETTORE SCIENTIFICO E DISCIPLINARE: MED/12

Tesi di

Sara Vavassori

Matricola R11679

Tutor: Prof. Maurizio Vecchi

Coordinatore del Corso: Prof. Emilio BERTI

Anno Accademico 2018-2019

SOMMARIO

1. INTRODUZIONE.....	3
1.1 Malattie infiammatorie croniche intestinali	3
1.2 Epidemiologia	4
1.3 Eziologia.....	6
1.4 Patogenesi	11
2. LA MALATTIA DI CROHN	15
2.1 Presentazione clinica	17
2.2 Diagnosi	20
2.3 Classificazione e indici di valutazione di malattia	21
2.4 Trattamento.....	24
3. PROTEOMICA NELLE IBD.....	35
3.1 Biomarcatori nelle IBD.....	35
3.2 Proteomica come approccio nell'identificazione di biomarcatori nelle IBD....	37
3.3 Proteomica nello studio della patogenesi delle IBD	38
3.4 Proteomica nello studio della risposta alle terapie nelle IBD	40
4. SCOPO DELLO STUDIO	42
5. MATERIALI E METODI	43
5.1 Popolazione in studio	43
5.2 Ionizzazione a desorbimento laser assistito da matrice (MALDI Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization).	44

6. RISULTATI.....	46
7. DISCUSSIONE	51
8. BIBLIOGRAFIA	54

1. INTRODUZIONE

1.1 Malattie infiammatorie croniche intestinali

Con il termine malattie infiammatorie croniche intestinali, o IBD (Inflammatory Bowel Diseases) si intende un gruppo di patologie caratterizzate dallo sviluppo di processi infiammatori ad andamento cronico recidivante, con localizzazione prevalente a livello del tratto gastrointestinale, ad eziologia ancora sconosciuta e patogenesi multifattoriale. Si distinguono due entità nosologiche prevalenti ovvero la malattia di Crohn (MC) e la rettocolite ulcerosa (CU), due patologie comuni sotto alcuni aspetti, ma con caratteristiche peculiari che ne permettono la distinzione. Nel 5-10% dei casi, non è possibile definire con certezza se si tratti di MC piuttosto che di CU. Questi quadri, in passato descritti col termine di “coliti indeterminate”, vengono oggi meglio definiti come “IBD non classificate” (1).

1.2 Epidemiologia

Studi epidemiologici hanno stimato come circa 2.5 milioni di persone in Europa e oltre 1 milione di soggetti negli USA siano affetti da IBD (2). In Nord America il tasso di incidenza varia da 2.2 a 14.3 casi su 100000 abitanti-anno per la CU e da 26 a 199 casi su 100000 abitanti-anno per la MC. Nel 2010 il tasso d'incidenza medio annuo registrato nell'Europa Occidentale è stato di 6.5 (*range* 0-10.7) per 100000 abitanti nella MC e di 10.8/100000 (*range* 2.9-31.5) per la CU; si è evidenziato inoltre come il tasso d'incidenza per le IBD in Europa presenti un gradiente ovest-est, con valori decrescenti nei paesi più orientali (3). Per quanto riguarda l'Italia al nord viene stimata un'incidenza delle IBD di 10.6 per 100000 abitanti (7 casi su 100000 abitanti per la CU e di 3.4 casi su 100000 abitanti per la MC) (4).

L'incidenza presenta un picco bimodale per fasce di età con un primo picco, il maggiore, tra i 20 e i 40 anni, e un secondo picco, minore, tra i 50 e i 70 anni; ciò nonostante possono essere colpiti soggetti di qualsiasi età. Per la MC si registra una prevalenza lievemente maggiore nel sesso femminile (M: F = 1:1.35) (5), mentre nella CU non sembrano esserci differenze epidemiologiche legate al genere (6).

È stata inoltre osservata una differenza nella distribuzione geografica delle IBD: valori di maggior incidenza si registrano nei paesi industrializzati quali nord Europa e Nord America, mentre in Europa meridionale, in Asia ed in gran parte dei paesi in via di sviluppo sono descritti minori valori di incidenza. Si sottolineano però valori di prevalenza e incidenza tendenzialmente stabili nel tempo nelle regioni industrializzate, al contrario di ciò che accade nei paesi in via di sviluppo dove il trend è in incremento costante (7).

Esistono evidenze a supporto di una maggior suscettibilità a sviluppare le IBD di alcuni gruppi etnici piuttosto che altri, a sottendere un ipotetico ruolo genetico nella patogenesi.

Tali evidenze sono contrastate da alcuni studi condotti su gruppi etnici migrati in diverse zone geografiche che sembrano sviluppare la malattia in maniera del tutto sovrapponibile ai gruppi etnici autoctoni. Si può quindi pensare che a fronte di differenze genetiche marcate, siano lo stile di vita e le influenze ambientali a giocare un ruolo di maggior rilevanza nello sviluppo di tali patologie (7). Rimane evidente però la presenza di una familiarità largamente dimostrata in letteratura, con un rischio aumentato di circa 10 volte nei parenti di primo grado dei soggetti affetti (8).

1.3 Eziologia

L'ipotesi che le IBD abbiano eziologia multifattoriale, è supportata da diversi studi. Un ruolo fondamentale è giocato da fattori ambientali e genetici. Per quanto riguarda il contributo genetico, si è già detto come la presenza di familiarità sia un fattore di rischio per lo sviluppo delle IBD; va però riconosciuto come tale correlazione implichi non solo la condivisione di uno stesso patrimonio genetico, ma anche di ambienti ed abitudini di vita che possono rappresentare un fattore di rischio per la malattia. Per poter definire il peso della componente ambientale rispetto a quella genetica, sono stati condotti studi di prevalenza su gemelli monozigoti e dizigoti che hanno evidenziato una concordanza maggiore nei monozigoti, dimostrando quindi un ruolo importante, anche se non univoco e assoluto, dei fattori genetici nello sviluppo delle IBD (9). Esistono differenze tra MC e CU, dove il peso della componente genetica riveste un ruolo di minor importanza secondo alcuni studi (9).

I fattori ambientali identificati come fattori di rischio per lo sviluppo di IBD sono diversi, ma solo per alcuni come il fumo di sigaretta o la appendicectomia, emerge una evidente correlazione con lo sviluppo di queste patologie (10).

L'appendicectomia ha un dimostrato ruolo protettivo nei confronti della CU, soprattutto quando eseguita entro i 20 anni (11). Il fumo invece influisce sullo sviluppo della malattia e sul suo andamento in maniera opposta nelle due entità nosologiche. Identificato come rilevante fattore di rischio per la MC, indipendentemente dal numero di sigarette fumate (12,13) sembra essere un fattore protettivo per la CU (10).

Altri fattori ambientali come le condizioni ambientali igienico-sanitarie e gli agenti infettivi, sono stati studiati per identificare un ruolo nella patogenesi delle IBD, ma con risultati discordanti.

Alcuni studi sottolineano come l'aumento di incidenza delle IBD sia concomitante al miglioramento delle condizioni igienico-sanitarie avvenuto durante il ventesimo secolo (accesso ad acqua pulita e calda, riduzione di condizioni di sovraffollamento, utilizzo di prodotti igienici). Successivo a tale osservazione è lo sviluppo della "teoria dell'igiene", secondo cui la minor esposizione ai microrganismi durante l'infanzia, favorita dal miglioramento delle condizioni igieniche e ambientali, gioca un ruolo importante nel successivo sviluppo di alcune patologie. Il contatto con diversi microrganismi durante le prime fasi della vita è fondamentale per programmare adeguatamente il sistema immunitario del bambino e avere un corretto bilanciamento tra azione infiammatoria dei linfociti Th1 e tolleranza immunitaria, mediata dai linfociti T-regolatori. Quando ciò non avviene, nel momento in cui il soggetto è esposto a microrganismi nelle fasi successive, vi è il rischio di incorrere in una risposta immunitaria inappropriata, che può degenerare in patologia disimmune (14).

La teoria dell'igiene pone quindi l'attenzione su alcuni agenti infettivi la cui diffusione è legata alle condizioni igienico-ambientali e che potrebbero avere un ruolo nello sviluppo di patologie disimmuni, quali ad esempio le IBD. Alcuni studi individuano una minor prevalenza dell'infezione da *Helicobacter pylori* (HP) nei pazienti con IBD rispetto ai controlli, standardizzati per sesso ed età (15). Tra i pazienti sieronegativi per l'infezione da HP si è osservato nello studio riportato, un solo picco di insorgenza delle IBD tra i 20-40 anni, mentre i pazienti sieropositivi per HP conservano la tipica distribuzione bimodale a due picchi (16). L'infezione da Hp potrebbe quindi svolgere un ruolo, protettivo in questo caso, rispetto allo sviluppo di IBD, specialmente nei pazienti appartenenti alle fasce d'età più giovani (15).

Gli elminti anche sembrano svolgere una azione protettiva, essendo infatti in grado di innescare nell'organismo ospite una forte risposta immunitaria mediata dai linfociti Th 2, che prevarrebbe quindi rispetto a quella Th1 mediata, associata quest'ultima alle malattie autoimmuni e alla MC (17). L' infezione cronica da elminti sembrerebbe inoltre in grado di attivare anche i linfociti T-regolatori, che, mediante transforming growth factor β (TGF- β) e interleuchina (IL)-10, regolano entrambi i tipi di risposte Th1/Th2 (18).

La "cold chain hypothesis" vede protagonisti il gruppo dei cosiddetti batteri psicofili (*Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium botulinum* e *Bacillus cereus*) che contribuirebbero allo sviluppo di IBD quando il soggetto viene esposto alla loro azione. I batteri appartenenti a tale gruppo pur avendo un optimum di temperatura oltre i 30 °C, sono capaci di proliferare, seppur a ritmi più bassi, anche tra -1 e 10°C. La conservazione dei cibi nei refrigeratori diventerebbe quindi un fattore di rischio per la proliferazione di questi batteri all'interno degli alimenti così conservati (19). L'associazione con le IBD si basa sulla concomitanza tra aumento dell'incidenza di malattia e miglioramento delle condizioni di vita, in particolare a diffusione di frigoriferi o più in generale sistemi di refrigerazione domestica.

Il *Mycobacterium avium paratuberculosis*, è stato largamente studiato, quale possibile cofattore nello sviluppo di MC, senza al momento una definizione precisa del ruolo di tale microorganismo. L'infezione sviluppa un quadro di infiammazione transmurale di tipo granulomatoso localizzato a livello ileale nei bovini, per certi versi simile all'ileite osservabile nei soggetti affetti da MC. Tuttavia il ruolo di questo microorganismo nello sviluppo della MC non è ancora chiaro (20).

L'utilizzo di farmaci antibiotici altrettanto sembra svolgere un ruolo nello sviluppo di tali patologie. In generale studi epidemiologici hanno osservato come l'aumento dell'incidenza delle IBD sia avvenuto di pari passo con una maggior diffusione dell'utilizzo degli antibiotici. Inoltre, alcuni studi retrospettivi hanno mostrato come nei soggetti con IBD si riscontri un maggiore uso di antibiotici durante l'infanzia rispetto ai controlli. Tuttavia, non è mai stato dimostrato un vero e proprio nesso causale tra questo e lo sviluppo di malattia (21). Anche l'abuso di FANS e di contraccettivi orali sembra possano alterare l'omeostasi immunitaria a livello della mucosa intestinale innescando una risposta infiammatoria con tendenza alla cronicizzazione, contribuendo allo sviluppo della patologia.

Negli ultimi anni sono stati condotti inoltre vari studi sul ruolo del "Microbiota" nella genesi delle IBD. Con il termine di Microbiota s'intende l'insieme dei microrganismi simbiotici che si trovano lungo tutto il tratto digerente dell'uomo, la cui composizione in ogni soggetto è fortemente influenzata da fattori individuali, dall'ambiente fin dalle prime fasi della vita. Alcuni considerano il Microbiota come un vero e proprio organo che svolge la funzione omeostatica dell'intero organismo. Diversi studi hanno dimostrato infatti come la composizione del Microbiota adeso alla mucosa intestinale sia diverso da quella dei batteri presenti nelle feci e come questo vada a costituire una sorta di barriera vivente che protegge l'organismo dalla colonizzazione da parte di altri batteri esogeni. Se tale barriera viene danneggiata, il contatto dei batteri fecali con l'epitelio può alterare l'omeostasi della mucosa e causarne un aumento di permeabilità, portando a uno stato di infiammazione ed eventualmente, infine, a fibrosi. Si è visto infatti come nei soggetti affetti da IBD a livello della mucosa intestinale vi sia un'augmentata densità di batteri commensali immuno-aggressivi e una quota diminuita di quelli immuno-modulanti. Tali alterazioni del microbiota

sembrerebbero portare a un'attivazione delle cellule mesenchimali mediata da TLR e da NOD-like receptors e conseguentemente dare vita al fenomeno di fibrogenesi intestinale. Alcuni soggetti possono poi essere geneticamente predisposti a questi meccanismi a causa di una alterata risposta immunitaria, sia innata che adattativa, contro i microrganismi presenti lungo il tratto gastroenterico, che si traduce in un alterata produzione di fattori antimicrobici, muco, IgA e IgM.

1.4 Patogenesi

Diversi studi condotti su modelli animali, studi di genetica umana e trials clinici hanno fornito importanti indicazioni riguardo la patogenesi delle IBD. In particolare, emerge che la MC e la CU siano malattie eterogenee, caratterizzate da predisposizioni genetiche ed epigenetiche che comportano l'instaurarsi di una risposta immunitaria anomala mediata dai Linfociti T contro alcuni batteri commensali dell'intestino. Da questi modelli sembra emergere che l'esordio e la riattivazione di malattia sono innescate da fattori ambientali in grado di alterare la barriera mucosa stimolando quindi la risposta immune o alterando l'equilibrio della flora batterica intestinale. I fattori in gioco in grado di determinare i diversi fenotipi di malattia, sono quindi anomalie genetiche ed epigenetiche che possono determinare difetti di funzione della mucosa nel suo ruolo di barriera, difetti di immunoregolazione e di clearance batterica (22).

Tra i geni maggiormente studiati troviamo il gene Nucleotide-binding Oligomerization Domain containing 2 (NOD2), localizzato sul braccio lungo del cromosoma 16 (23). Si tratta di un gene codificante per una proteina intracellulare che riconosce capace di riconoscere il muramil dipeptide del lipopolisaccaride batterico (LPS) ed altri prodotti della degradazione della parete di diversi batteri mediante la sua estremità C-terminale contenente sequenze ricche in leucina, attivando la risposta immunitaria innata. A livello intracellulare questa proteina interagisce con una serina-treonina chinasi (RICK o RIP2) determinando l'attivazione di Nuclear Factor kB (NF-kB), un importante attivatore della trascrizione di molte citochine pro-infiammatorie, tra cui il TNF- α (24). Il 18-20% dei soggetti con MC presenta una mutazione di questo gene secondo alcuni studi, contro valori di frequenza del 6-7% rilevati invece tra i soggetti

con CU e nella popolazione sana (24). Sono state identificate tre mutazioni differenti, tutte responsabili di modificazioni a livello dell'estremità C-terminale della proteina.

Queste alterazioni portano a una riduzione di funzione della proteina e si associano a una maggiore attivazione di Nf-kB, provocando l'instaurarsi di uno stato di infiammazione persistente a livello della mucosa intestinale. Ad oggi, NOD2 è sicuramente il più importante fattore genetico per la MC: è infatti un fattore predittivo indipendente per localizzazione ileale di malattia probabilmente a causa della sua maggiore espressione nelle cellule di Paneth della porzione terminale dell'ileo, per malattia di tipo stenotante o penetrante e per necessità di ricorso alla chirurgia (25). Esso è risultato anche essere il fattore più fortemente associato a un decorso di malattia gravato da complicanze (26).

Oltre a quelli per indagare il funzionamento della proteina di NOD2, sono numerosissimi gli studi di tipo genome-wide che sono stati condotti e che hanno permesso di riconoscere 163 loci genici (polimorfismi di singoli nucleotidi) significativamente associati con MC (27). Alcuni polimorfismi genici si correlano con un pattern di malattia stenotante, altri con un pattern fistolizzante e d'altri ancora sono stati individuati in quei pazienti affetti da malattia a decorso particolarmente aggressivo e con maggiore necessità di ricorso alla chirurgia. Il valore di questi polimorfismi risulta però essere scarso e ancora lontano dal poter essere utilizzato routinariamente nella pratica clinica, anche se sembra esistere una correlazione tra il numero di queste mutazioni e la severità di malattia.

L'immunità innata svolge un importante ruolo nella eziopatogenesi delle IBD. Alterazioni della risposta immunitaria innata sembrano determinare una ridotta

protezione dell'epitelio intestinale, causando l'instaurarsi di una risposta immunitaria di tipo adattivo eccessiva e deregolata (28).

Nella risposta immunitaria innata le Antigen Presenting Cells (APC, *e.g.* monociti, macrofagi residenti, cellule dendritiche) attivano, le cellule del sistema immunitario a produrre una vasta gamma di citochine proinfiammatorie, attraverso la stimolazione di alcuni Toll-like receptors (TRLs) (26). I TLRs sono recettori presenti sulla membrana delle APC capaci di riconoscere specifici componenti strutturali di diversi microrganismi, i cosiddetti Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs), tra cui LPS, MPP, CpG, dsRNA, flagellina. L'avvenuto legame tra TLRs e PAMPs determina l'attivazione a cascata di numerosi segnali intracellulari, fino a portare all'attivazione di NF- κ B, il quale stimola l'espressione di numerose molecole con un dimostrato ruolo rilevante nella patogenesi delle IBD. Alcune sono ad esempio IL-1 β , TNF, IL-6, IL-8, chemochine, ICAM e altre molecole di adesione coinvolte nel processo infiammatorio, o molecole che fungono da co-stimolatori. L'espressione di tali molecole proinfiammatorie infatti risulta essere aumentata nei soggetti con MC o CU in fase attiva (22).

La risposta immunitaria adattativa, che è mediata principalmente dai linfociti T con un'azione più lenta ma assai efficace, è rivolta specificatamente contro il microrganismo o la molecola che la induce. Si riteneva tradizionalmente che la risposta immunitaria nella MC fosse di tipo Th1-mediata e si associasse elevati livelli circolanti delle citochine pro-infiammatorie prodotte da queste cellule (interferon α (IFN- α), IL-12 e TNF- α) (22). Nella CU invece si riteneva prevalente la risposta immunitaria dipendente da linfociti Th2, dalle cellule natural killer e dalle citochine loro associate (IL-13, IL-4 e IL-5) (29). Tuttavia, questa classica distinzione dicotomica Th1/Th2 risulta

in parte superata. Nuovi studi hanno infatti dimostrato che in entrambe le principali forme di IBD è presente una sintesi aumentata di citochine prodotte da un altro tipo di linfociti T-helper, chiamati Th 17. Questo tipo cellulare, su stimolo dell'IL-23, produce IL-17. Non si conosce molto ancora dei meccanismi attraverso cui IL-17 porti a un danno intestinale, ma sembrerebbe essere capace di indurre la sintesi di citochine pro-infiammatorie e di metalloproteasi in diversi tipi cellulari.

Queste recenti scoperte hanno contribuito a spiegare nuovi meccanismi di danno tissutale oltre ad aprire nuove strade per lo sviluppo di strategie terapeutiche nelle IBD. Non di meno, recentemente è stato dimostrato che le citochine associate ai linfociti Th17, quali IL-17A e IL-22, possono esercitare anche un effetto protettivo. Attualmente, sono quindi necessari ulteriori studi per comprendere il reale ruolo dell'IL-17 nella patogenesi delle IBD (30).

2. LA MALATTIA DI CROHN

Tra le due entità nosologiche più significative delle IBD, la malattia di Crohn è stata l'oggetto della nostra analisi finale e quindi la trattazione si focalizzerà sugli aspetti salienti di questa patologia.

La malattia di Crohn è una patologia infiammatoria cronica, in genere ad andamento remittente-ricidivante, ovvero che alterna periodi di attività clinica di malattia a periodi paucisintomatici o di vera e propria remissione. Può coinvolgere tutto il tratto gastroenterico, dalla bocca all'ano, caratteristica che contribuisce a renderla una patologia dalla presentazione fortemente variabile ed eterogenea.

Classicamente si distinguono 3 diversi quadri di malattia, sulla base del comportamento del processo infiammatorio in un determinato momento storico della malattia. Si ha quindi una forma in cui prevale lo stato flogistico della mucosa (*e.g.* luminale); una forma caratterizzata dalla formazione di lesioni fibrotico-stenosanti e una ultima forma in cui a prevalere sono lesioni di tipo fistolizzante-penetrante (31).

Le lesioni stenose si formano per l'ispessimento di parete dovuta alla flogosi e alla conseguente fibrosi che si sviluppa nel tempo in seguito a ripetuti cicli di insulto-riparazione, fino a trasformare la parete intestinale in un cordone fibrotico rigido e inestensibile. Le lesioni stenose si localizzano più frequentemente a livello del piccolo intestino, il cui diametro è fisiologicamente minore rispetto a quello del colon, dove quindi più facilmente esitano in quadri di tipo occlusivo o subocclusivo, che possono in alcuni casi configurare una vera e propria emergenza medico-chirurgica. I quadri di tipo fistolizzante-penetrante sono conseguenti alle fissurazioni che si creano

inizialmente a livello mucoso spingendosi sempre più in profondità attraverso gli strati del viscere, fino a raggiungere lo strato più esterno della parete intestinale rappresentato dalla tonaca sierosa.

Si vengono così a formare tragitti fistolosi, con diverse conseguenze a seconda della sede. Troviamo quindi fistole entero-enteriche, che mettono in comunicazione tra loro due anse intestinali, oppure formazione di tramiti con altri organi quali cute, vescica, ureteri e vagina. Le fistole possono sboccare anche a livello del retroperitoneo e esitare nella formazione di ascessi, se il processo infiammatorio riesce ad essere circoscritto. Quando il processo flogistico vede il coinvolgimento della tonaca sierosa e dei mesenterici dell'intestino si traduce nella formazione di aderenze, che possono giocare un ruolo importante nella genesi del dolore addominale (32).

2.1 Presentazione clinica

I sintomi più frequenti della MC sono il dolore addominale, il calo ponderale e la diarrea cronica (definita correttamente se di durata maggiore a 4 settimane). La diarrea nella MC può avere diversa origine: può infatti configurarsi sia come diretta conseguenza dal processo infiammatorio stesso (*i.e.* diarrea infiammatoria), sia come conseguenza del malassorbimento e in particolare dell'alterato ricircolo entero-epatico degli acidi biliari che si crea nei casi tipici che presentano un coinvolgimento dell'ultima ansa ileale (31,32).

La sede del processo patologico rappresenta il fattore determinante nella manifestazione clinica della malattia. Ad esempio se ad essere interessato è il piccolo intestino, il quadro clinico sarà caratterizzato da un dolore addominale diffuso associato a diarrea, con anoressia, calo ponderale e segni di malassorbimento. Quelle che invece vengono definite localizzazioni "alte" di malattia, come ad esempio un coinvolgimento gastrico o duodenale, possono determinare dolore addominale ai quadranti superiori, nausea, vomito, senso di sazietà precoce e disfagia; si associa anche calo ponderale, in parte dovuto al malassorbimento e in parte a una tendenza dei pazienti in queste condizioni a diminuire l'apporto calorico. Una MC localizzata a livello colico si accompagna in genere a diarrea di tipo muco-ematica e dolore addominale crampiforme, localizzato principalmente ai quadranti addominali inferiori. Il coinvolgimento invece del retto-sigma si manifesta spesso con rettorragia e tenesmo. La malattia di Crohn perianale si presenta tipicamente con fistole ed ascessi, reperti distintivi dalla CU e talora determinanti nella diagnosi differenziale tra queste due entità patologiche (33). Bisogna sottolineare come il coinvolgimento perianale possa associarsi all'interessamento della mucosa rettale o retto-colica, ma presentarsi

anche in forma isolata e rappresentare l'unica manifestazione di malattia per diversi anni.

I tratti più frequentemente colpiti sono il tratto ileale e il tratto colico. Al momento della diagnosi infatti circa la metà dei soggetti affetti presenta una localizzazione ileo-colica, il 28% presenta un coinvolgimento del solo ileo terminale, mentre il 25% esclusivamente colico. Le localizzazioni in altre sedi del tratto gastrointestinale sono invece più rare e si riscontrano solo nell'1-4% di tutti i casi (34). La presentazione clinica dipende anche dall'estensione del tratto gastrointestinale interessato, dall'intensità dei fenomeni infiammatori e dal comportamento prevalentemente infiammatorio, piuttosto che stenosante o penetrante, oltre che dalla localizzazione. La forma stenosante ad esempio può presentarsi con un quadro di occlusione intestinale, mentre la forma penetrante ha come manifestazione acuta un quadro di addome acuto. Ancora l'esordio acuto di una ileite terminale severa può mimare il quadro clinico tipico di un'appendicite acuta al punto da rendere arduo il corretto inquadramento diagnostico differenziale in assenza di approfondimenti radiologici e/o endoscopici mirati.

Le complicanze principali della MC sono rappresentate dunque dai fenomeni occlusivi o sub-occlusivi e dalle fistole, che determinano un aumento nel tasso di ospedalizzazione di questi pazienti e un netto peggioramento della loro qualità di vita. Una complicanza a lungo termine è rappresentata dallo sviluppo di neoplasie maligne nel tratto gastrointestinale interessato da patologia. Il fenomeno flogistico perpetuato tipico di questa patologia crea un substrato favorente lo sviluppo di displasia mucosa, fino ad arrivare al carcinoma (35). Diversi studi hanno dimostrato un rischio aumentato di sviluppare neoplasie digestive, in particolare l'adenocarcinoma del colon retto in

soggetti affetti da MC (36). Tale rischio, aumenta all'aumentare dell'estensione e della durata di malattia e diventa particolarmente elevato dopo 20 anni di malattia colica estesa (35).

2.2 Diagnosi

La diagnosi di MC è un iter multidisciplinare che si avvale di una combinazione di dati clinici e strumentali che permettono di definire la patologia differenziandola dalle moltissime altre affezioni che possono interessare il tratto gastroenterico e, all'interno del gruppo delle IBD, dalla CU e dalla IBD non classificata.

Posto quindi un iniziale orientamento diagnostico sulla base della storia clinica e dell'esame obiettivo, il corretto inquadramento prevede esecuzione di accertamenti di laboratorio, esami endoscopici, radiologici e approfondimenti anatomo-patologici per la conferma istologica sui prelievi biopsici endoscopici.

2.3 Classificazione e indici di valutazione di malattia

Per la classificazione dei diversi sottotipi di MC, è stato largamente accettato in tutto il mondo l'utilizzo come standard di riferimento dei criteri di Montreal, stilati nel 2005 (37). Si tratta di un sistema di classificazione che suddivide i pazienti in base all'età al momento della diagnosi (A1 < 16 anni, A2 tra 17 e 40 anni, A3 > 40anni), alla localizzazione di malattia, e al comportamento di malattia. La classificazione di Montreal distingue i soggetti affetti da MC sia in funzione della localizzazione di malattia che del comportamento del processo infiammatorio.

Per quanto riguarda la localizzazione, si distinguono 4 gruppi: L1 malattia esclusivamente digiuno-ileale, L2 malattia esclusivamente colica, L3 malattia ileo-colica, L4 malattia con coinvolgimento del tratto gastroenterico superiore (*i.e.* sino al legamento di Treitz). Relativamente al comportamento di malattia, si distinguono invece una forma B1 o infiammatoria, B2 o fibrotica-stenosante e B3 o fistolizzante-penetrante, definita quest'ultima dalla presenza di fistole intraddominali, di masse addominali o dalla presenza di ascessi non perianali. La presenza di complicanze perianali viene infatti descritta a parte, aggiungendo la lettera "p" alla classe di appartenenza B1, B2 o B3. E' stato dimostrato come la localizzazione della malattia si mantiene tendenzialmente stabile in uno stesso paziente, mentre il comportamento è soggetto in misura molto maggiore a variazioni. Circa il 50% dei pazienti con MC a 10 anni presenta infatti una variazione nel comportamento di malattia e più frequentemente si tratta di un passaggio da una forma esclusivamente infiammatoria a una forma stenosa o penetrante (38,39), riflettendo la caratteristica peculiare di tale patologia ovvero di essere un processo dinamico che conduce a un danno irreversibile a livello intestinale nella maggior parte dei pazienti.

Per quanto riguarda la valutazione dell'attività di malattia e quindi il livello di gravità in corso di una fase attiva, nel 1979 è stato messo a punto dal National Cooperative Crohn's Disease Study il "Crohn's Disease Activity Index" (CDAI). Si tratta di un indice basato su otto differenti variabili che devono essere valutate nel paziente durante la visita; ognuna di queste viene moltiplicata per un proprio coefficiente e poi sommata alle altre fino a dare un punteggio finale che fornisce un'indicazione dell'attività di malattia in quel momento. In particolare, punteggi inferiori a 150 indicano tendenzialmente una malattia in fase di quiescenza, un punteggio tra 150 e 220 una malattia attiva lieve, tra 220 e 450 un'attività moderata di malattia e infine un punteggio oltre i 450 indica una malattia attiva severa.

Nonostante alcune note limitazioni di tale indice, quali ad esempio la soggettività di alcune variabili, il fatto che faccia riferimento ai 7 giorni precedenti la visita, la variabilità interindividuale dei pazienti, il CDAI viene ancora a tutt'oggi considerato il gold standard per la valutazione dell'attività della malattia (40).

Oltre al CDAI sono stati sviluppati altri indici per la valutazione di attività di malattia, basati su attività clinica. Il maggiormente utilizzato per la praticità è Harvey Bradshaw Index (HBI)(41). Si calcola tramite l'osservazione di cinque diversi parametri a cui viene attribuito un punteggio come indicato in Tabella 1.1 La somma totale dei punteggi fornisce un numero che viene così decodificato: inferiore a 5 indica remissione, tra 5 e 7 attività lieve, tra 8 e 16 attività moderata e superiore a 16 attività grave.

Harvey Bradshaw Index	
Benessere del paziente (giorno precedente)	0 = buono 1 = leggermente inferiore alla norma 2 = scarso 3 = molto scarso 4 = pessimo
Dolore addominale (giorno precedente)	0 = assente 1 = lieve 2 = moderato 3 = severo
Numero di evacuazioni liquide o molli (giorno precedente)	Indicare un valore (1-25)
Massa addominale	0 = assente 1 = dubbia 2 = definita 3 = definita e sensibile alla palpazione
Presenza di complicanze	No (0 punti) Sì (ogni complicazione si conteggia con 1 punto)

Tabella 1.1 calcolo di Harvey- Bradshaw Index.

2.4 Trattamento

Il trattamento farmacologico dei soggetti con MC ha lo scopo di indurre e mantenere a lungo la remissione, riducendo al minimo la necessità di ricorso alla chirurgia. Per ogni paziente, il tipo di trattamento dipende da numerose variabili quali localizzazione, estensione e severità di malattia, presenza di complicanze in atto ed eventuali terapie pregresse, comorbidità e fattori di rischio per effetti collaterali legati a terapie immunomodulanti o cortisoniche.

Primo approccio terapeutico per la MC è la terapia antibiotica da utilizzare per brevi periodi. Metronidazolo e Ciprofloxacina infatti si sono dimostrati essere efficaci nel trattamento della malattia infiammatoria attiva, perianale e fistolizzante; il Metronidazolo inoltre può essere utile nella prevenzione delle recidive dopo resezione ileale.

Storicamente, i corticosteroidi (CS) sono stati largamente utilizzati nei pazienti con MC in fase attiva di grado moderato-severo. L'efficacia di questa classe di farmaci dipende dalla loro azione inibente i mediatori dell'infiammazione, che si esplica in seguito al legame tra il farmaco e gli specifici recettori presenti sulle cellule del sistema immunitario. Tale legame determina la soppressione della produzione da parte della cellula dei fattori pro-infiammatori, tra cui il già menzionato NF-kb, inducendo l'apoptosi nei linfociti attivati.

Nelle forme moderate si utilizzano principalmente CS topici o a bassa disponibilità. I CS topici si possono trovare in forma di schiume rettali, supposte o clisteri. In generale supposte e schiume sono utilizzate nel trattamento di pazienti con localizzazione

distale; le schiume inoltre, insieme ai clisteri sono capaci di raggiungere anche tratti di colon localizzati più a monte, fino al sigma, per cui possono essere impiegate nel trattamento dei pazienti con quadri colici più estesi. La Budesonide e il Beclometasone dipropionato sono CS orali a bassa biodisponibilità.

Essi presentano scarso assorbimento intestinale con conseguente bassa tossicità sistemica anche in associazione al significativo metabolismo epatico di primo passaggio che ne caratterizza la farmacocinetica. La Budesonide a rilascio ileale è formulata in modo da permettere che il rilascio del farmaco avvenga nell'ileo e nel colon destro, per cui risulta particolarmente indicata nel trattamento di pazienti con malattia da moderata a moderato-severa localizzata a questi segmenti.

L'uso di corticosteroidi sistemici è in genere riservato ai pazienti con quadri di maggior gravità. Tale classe di farmaci comprende sia agenti a somministrazione orale, come il Prednisone, che agenti a somministrazione endovenosa, come l'Idrocortisone o il Metilprednisone (42). Nei pazienti con MC, l'utilizzo di tali farmaci è giustificato in presenza di sintomi di malattia di grado moderato o severo, indipendentemente dalla localizzazione, oppure come seconda linea in caso di fallimento del trattamento con Budesonide a rilascio ileale nei soggetti con malattia ileo-cecale. Si tratta infatti di potenti farmaci anti-infiammatori che si sono dimostrati capaci di indurre la remissione a breve termine nel 60-70% dei casi di MC moderato-severa, contro un tasso di risposta del 30% con placebo. L'utilizzo di CS parenterali in genere è riservato a quei pazienti che non hanno risposto alla terapia con Prednisone per os; nell'effettuare queste terapie si tende a preferire il Metilprednisone all'Idrocortisone, in quanto presenta meno effetti di tipo mineralcorticoide. In caso di pazienti che non rispondono al Prednisone è comunque necessario considerare, in alternativa ai CS per via

endovenosa, trattamenti con farmaci immunomodulanti o biologici o eventualmente anche il ricorso alla chirurgia.

A fronte di una significativa efficacia degli steroidi ad azione sistemica nel paziente con episodio di acuzie, essi rivestono scarso ruolo nella terapia di mantenimento. Oltre ad essere assai poco efficace nel mantenere la remissione infatti, una terapia corticosteroidica a lungo termine comporterebbe la comparsa di effetti collaterali tali per cui i danni supererebbero i benefici. Si stima che circa la metà dei pazienti sottoposti a una terapia a lungo termine con CS presenterà effetti avversi. Tra i più precoci si annoverano acne, edema, la comparsa di *facies lunare*, tipica dell'ipercortisolemia, disturbi del sonno e dell'umore, intolleranza glucidica e dispepsia. Uso più prolungato di CS sistemici, ovvero per un periodo almeno di 12 settimane, può provocare sviluppo di cataratta bilaterale, miopatie, suscettibilità alle infezioni, osteoporosi e osteonecrosi della testa del femore. Moltissimi studi mostrano come esista una correlazione inversa tra uso di CS e densità ossea, raccomandando l'esecuzione di una MOC in tutti i pazienti dopo 3 mesi di terapia corticosteroidica, soprattutto nei soggetti che presentano fattori di rischio aggiuntivi (*e.g.* menopausa). In caso di terapie prolungate con CS inoltre, bisogna porre particolare attenzione al momento della sospensione che deve essere graduale al fine di evitare comparsa di insufficienza surrenalica. Tale condizione clinica si manifesta con comparsa di ipotensione posturale, nausea, vomito, disturbi elettrolitici (iperpotassiemia e iponatriemia) (43).

Altri effetti indesiderati non direttamente legati alla azione del farmaco sono ma che si correlano all'utilizzo di tali farmaci sono la possibilità che insorga una dipendenza da CS o una refrattarietà. La prima si definisce come l'impossibilità a scalare la dose senza

che si vada incontro a una riacutizzazione di malattia mentre la seconda si manifesta con perdita di efficacia di terapia in corso della stessa. Per entrambe queste tipologie di pazienti vi è l'indicazione a intraprendere una terapia con farmaci immunomodulatori o biologici (42).

Gli immunomodulanti utilizzati nella MC comprendono farmaci della famiglia delle tiopurine, come l'Azatioprina (AZA) e la 6-mercaptopurina (6-MP). L'effetto di questi farmaci si esplica attraverso un loro metabolita attivo, la 6-tioguanina (6-TGN) che agisce inibendo la sintesi di DNA e RNA e induce l'apoptosi nelle cellule T attraverso meccanismi ancora non del tutto spiegati. Tali farmaci necessitano di tempo per poter raggiungere la piena attività clinica. Sono richiesti anche fino a tre mesi per manifestare completamente i loro effetti. L'AZA si è dimostrata efficace nel trattamento di pazienti con MC refrattaria alla terapia standard con CS e, analogamente alla 6-MP, è raccomandata nei soggetti ad alto rischio per recidiva post-operatoria. Inoltre, una remissione ottenuta con AZA, sebbene gravata dalla difficoltà dovuta al lungo tempo necessario affinché si sviluppino completamente i suoi effetti benefici, ha il vantaggio di poter essere poi mantenuta mediante prosecuzione della terapia con lo stesso farmaco (42). Nel trattamento con AZA gli effetti collaterali a breve termine riguardano principalmente la soppressione dell'attività midollare, riscontrabile in circa 2-5% dei casi. È quindi raccomandato per tali pazienti il monitoraggio dell'emocromo al fine di individuare precocemente lo sviluppo di leucopenia, che è la manifestazione più frequente. Gli effetti dell'AZA sul midollo osseo sono dose-dipendenti e possono dunque essere gestiti mediante riduzione del dosaggio del farmaco o sospensione dello stesso. Un altro effetto collaterale che può interessare i pazienti in trattamento con AZA o 6-MP è rappresentato dalla pancreatite (1.3-3.3% dei casi). Tale effetto è invece indipendente dalla dose del farmaco ed in

genere si sviluppa entro le prime 3-4 settimane di terapia. Altri disturbi comprendono manifestazioni abbastanza comuni, sebbene lievi, come nausea, vomito e dolore addominale, e altre reazioni aspecifiche quali febbre, rash cutanei e artralgie, solitamente dose-indipendenti e responsive alla sospensione del farmaco. L'intolleranza ad uno tra AZA e 6-MP, non implica che vi sia necessariamente un'intolleranza crociata all'interno della stessa classe di farmaci. Nei pazienti in trattamento con tiopurine sono state riportate numerose complicanze infettive, la maggior parte delle quali in assenza di leucopenia. Il trattamento con AZA e 6-MP si è dimostrato essere associato a epatotossicità che è una complicanza rara con un meccanismo patogenetico non è ancora stato esattamente definito. Tra le ipotesi prese in considerazione si annoverano epatite da farmaci, la comparsa di colestasi, l'iperplasia nodulare rigenerativa e la peliosi. Le tiopurine si associano infine ad un minimo ma significativo rischio di linfoma e tumori cutanei di tipo non melanoma. Va però sottolineato che sebbene il rischio relativo associato alle tiopurine di sviluppare tali neoplasie sia aumentato, il rischio assoluto rimane comunque molto basso (44).

Un altro farmaco ad azione immunosoppressiva impiegato nel trattamento della MC è il Metotrexate. Si tratta di un farmaco inizialmente utilizzato nel trattamento della leucemia, ma che si è dimostrato efficace nell'indurre la remissione di malattia e la riduzione della corticodipendenza nei pazienti con MC. A dosaggi minori inoltre consente anche il mantenimento della remissione. Questo farmaco funge da antagonista competitivo dell'acido folico: è capace infatti di legarsi all'enzima diidrofoloreduktasi impedendo la conversione dell'acido folico in tetraidrofolico, portando a un'alterata sintesi del DNA. Presenta inoltre anche proprietà antinfiammatorie, probabilmente derivate da un effetto inibente la produzione di IL-1. Tra gli effetti collaterali legati alla somministrazione di Metotrexate ritroviamo

comprendono nausea, vomito, leucopenia, fibrosi epatica e, raramente, ipertensione polmonare. La fibrosi epatica in particolare rappresenta una delle sequele più gravi della terapia con Metotrexate; per tale motivo vi è indicazione ad eseguire una biopsia pre-trattamento in tutti i pazienti che presentano alterazioni della funzionalità epatica o in cui si sospetti l'esistenza di un epatopatia cronica e nei pazienti che hanno un rischio aumentato di sviluppare tossicità epatica. Fattori di rischio per l'epatotossicità comprendono obesità, diabete mellito, eccessivo consumo di alcool, elevati livelli basali di transaminasi e assunzione di elevate dosi di Metotrexate (dose cumulativa >1500mg). Inoltre, una terapia con Metotrexate comporta la riduzione delle scorte di acido folico, per cui è mandatorio associare una terapia suppletiva. Pazienti in terapia con Metotrexate sono quindi routinariamente sottoposti a controlli della funzionalità epatica e dell'emocromo e la rilevazione di alterazioni comporta la necessità di sospendere la terapia. Il Metotrexate è altamente teratogeno per cui la gravidanza rappresenta una controindicazione assoluta al suo utilizzo e le pazienti in età fertile in terapia con questo farmaco devono utilizzare metodi di contraccezione adeguati (42).

Una grossa svolta nel trattamento della MC si è avuta a partire dagli anni '90 con l'introduzione dei farmaci biologici. Il termine "farmaco biologico" è usato per indicare una classe di molecole proteiche complesse, prodotte in laboratorio all'interno di sistemi viventi con metodiche di biologia ricombinante, progettati per agire su uno specifico recettore. I farmaci biologici hanno assunto negli ultimi anni un ruolo fondamentale nel trattamento di diverse malattie infiammatorie croniche, tra cui le IBD. Questi farmaci possiedono infatti potenti effetti terapeutici grazie alla loro capacità di bloccare completamente e in modo rapido l'interazione tra alcune proteine chiave per il sistema immunitario. I farmaci biologici, inoltre, sono gli unici tra i farmaci utilizzati nel trattamento delle IBD ad essere stati progettati per intervenire

specificamente contro particolari molecole coinvolte nei meccanismi patogenetici di queste malattie (45).

Il primo farmaco appartenente a tale classe e approvato per la MC è l'Infliximab (IFX). Si tratta di un anticorpo monoclonale IgG1 chimerico diretto contro il TNF- α umano; la regione costante di questo anticorpo (IgG1k) è di origine umana, mentre la regione variabile è di origine murina. È noto come IFX sia capace di legare il TNF- α solubile presente a livello della mucosa intestinale, neutralizzandone l'effetto. Si lega inoltre alle molecole di TNF- α presenti sulle membrane cellulari, esercitando un effetto tossico e causando quindi la distruzione delle cellule del sistema immunitario. In particolare, attraverso questo legame è capace di indurre l'apoptosi dei linfociti T. Il suo effetto antagonista nei confronti del TNF- α legato alle membrane sembra giocare un ruolo particolarmente importante nell'efficacia a lungo termine di questo farmaco.

L'uso di IFX è stato approvato per il trattamento dei pazienti affetti da MC di entità moderata-severa che non rispondono ad altre terapie e nei pazienti con fistole attive . Gli studi ACCENT I e ACCENT II hanno dimostrato come il 40% dei pazienti che inizialmente rispondono bene alla terapia, se sottoposti a infusioni ripetute ogni 8 settimane, presentano una remissione della durata di almeno un anno. IFX inoltre induce una rapida e completa guarigione endoscopica a livello della mucosa, migliora la qualità di vita dei pazienti e permette di diminuire il rischio di ospedalizzazione e ricorso alla chirurgia (46). La posologia ottimizzata per indurre la remissione della malattia prevede la somministrazione ev di 5 mg di IFX per Kg di peso corporeo alle settimane 0, 2 e 6 (ciclo di induzione); per il mantenimento della remissione si somministra lo stesso dosaggio di IFX ad intervalli regolari di 8 settimane (47).Lo studio ACCENT I ha dimostrato come il 40% dei pazienti che inizialmente rispondono bene alla

terapia, se sottoposti a infusioni ripetute ogni 8 settimane, presentano una remissione della durata di almeno un anno (46). In caso di malattia perianale refrattaria con fistole entero-cutanee, il tasso di risposta a IFX è stato del 68%, con il 50% di remissione completa (studio ACCENT II).

Si è osservato inoltre come IFX sia efficace nel trattare anche alcune manifestazioni extraintestinali della malattia; in particolare, risulta efficace in caso di pioderma gangrenoso, uveite e spondiloartrite (48)(49)(50).

Le principali controindicazioni al trattamento con anti-TNF sono l'ipersensibilità alla molecola, la presenza di un quadro di TBC attiva o di altre gravi infezioni (ad es. infezioni da virus epatotropi, quadri di sepsi, infezioni da patogeni opportunisti), insufficienza cardiaca moderata-severa ed in maniera meno restrittiva neoplasie maligne recenti o in atto, malattie neurologiche demielinizzanti. È sempre necessario, prima di iniziare la terapia biologica, sottoporre il paziente ad adeguato screening mirato ad escludere la presenza di infezioni attive o di una TBC latente (intradermoreazione secondo Mantoux e/o test Quantiferon e radiografia del torace) (51).

Il trattamento con IFX risulta ben tollerato dalla maggior parte dei pazienti e gli effetti collaterali gravi sono rari; sono considerati effetti avversi gravi le complicanze infettive (sepsi, polmonite, Coccidiomicosi disseminata, Histoplasmosi, Listeriosi, Aspergilloso, Pneumocistosi ed infezioni virali quali Herpes Virus e Virus Varicella-Zoster); le reazioni lupus-like acute all'infusione; le reazioni di ipersensibilità ritardata; la demielinizzazione; lo sviluppo di linfomi; l'insufficienza cardiaca (52).

La presenza nella molecola di IFX di elementi di derivazione murina, quindi riconosciuti come non-self dal nostro sistema immunitario, comporta il rischio di immunogenicità,

che si manifesta tramite lo sviluppo di anticorpi diretti contro il farmaco, detti Anticorpi Anti-IFX o Anticorpi Antichimerici Umani. Questi anticorpi predispongono alle reazioni infusionali acute e da ipersensibilità ritardata, oltre a determinare il rischio di perdita di risposta al trattamento. Ciò si osserva in circa il 30% dei pazienti. Una premedicazione con farmaci cortisonici o l'associazione con immunomodulatori è quindi raccomandata al fine di ridurre il rischio di formazione di tali anticorpi e di reazioni infusionali, permettendo una risposta più duratura alla terapia (53). La presenza di questi anticorpi può essere sospettata clinicamente quando si osserva una diminuzione nella qualità della risposta al farmaco o nella durata di risposta all'infusione. Un aumento del dosaggio a 10 mg/Kg o una diminuzione negli intervalli tra le somministrazioni può ripristinare l'efficacia del farmaco.

Alcuni pazienti che perdono la risposta o non tollerano IFX, possono passare all'utilizzo di altri anti-TNF- α , quali Adalimumab (ADA) o di Certolizumab pegol. ADA è un anticorpo ricombinante umano monoclonale di tipo IgG1, rivolto anch'esso contro il TNF- α , ma che contiene solo sequenze di peptide umano. Presenta quindi un meccanismo d'azione simile all' IFX ma dotato di minore immunogenicità. La somministrazione avviene per via iniettiva sottocutanea. Attualmente ADA è stato approvato per il trattamento dei soggetti con MC da moderata a severa che hanno perso la risposta all'IFX o che hanno sviluppato reazioni infusionali anche di tipo ritardato (54). Il trattamento con ADA prevede una dose di 160 mg alla prima somministrazione, 80 mg alla seconda seguite da dosi di 40 mg ogni 2 settimane come terapia di mantenimento. In soggetti con quadri particolarmente gravi che necessitano di un rapido miglioramento del quadro clinico, si può effettuare un aumento del dosaggio (55).

Effetti collaterali in corso di terapia con ADA comprendono reazioni al sito di iniezione e il rischio infezioni, per cui anche per questo farmaco è indicato effettuare uno screening per la TBC prima di iniziare il trattamento. Inoltre vi è il rischio di generare autoimmunità: ADA infatti può indurre la produzione di anticorpi anti-nucleo che si associano allo sviluppo di artralgie e reazioni cutanee (54).

Un altro farmaco ideato per ridurre l'immunità legata a IFX è il Certolizumab pegol (CZP), che corrisponde alla forma PEGilata del frammento Fab di un anticorpo monoclonale diretto contro il TNF- α ; tale legame con la molecola di polietilen-glicole è in grado di aumentare l'emivita dell'anticorpo. Bisogna sottolineare come, per pazienti che non hanno mostrato nessuna risposta iniziale a IFX o a un altro anti-TNF, è attualmente considerato inutile tentare un trattamento con un altro farmaco anti-TNF.

Prima dell'approvazione del Natalizumab, l'unica opzione per questi pazienti era la chirurgia. Il Natalizumab è un'immunoglobulina IgG4 umanizzata ricombinante, diretta contro l'integrina α -4, che appartiene ad una nuova classe di farmaci conosciuta come inibitori selettivi delle molecole di adesione. Le integrine sono molecole espresse sulla superficie dei leucociti e fungono da mediatori dell'adesione degli stessi leucociti all'endotelio vascolare. L'integrina α -4 mediante la subunità, β 1 o β 7, interagisce con i ligandi endoteliali, definiti molecole di adesione o adressine vascolari. In particolare, l'interazione tra la sub unità β 7 dell'integrina α -4 e le molecole di adesione tipo adressine mucosali, gioca un ruolo importante nell' indirizzare i leucociti verso la mucosa dell'intestino. Natalizumab esplica i suoi effetti bloccando l'adesione e la migrazione dei leucociti dal circolo ai tessuti. Questo farmaco è risultato attivo nella MC moderata e severa; tuttavia ad oggi, sono stati riportati 105 casi (3 in corso di studi clinici e 102 nel periodo post-marketing) di leucoencefalopatia multifocale progressiva

associata alla riattivazione del poliomavirus JC, per cui attualmente il farmaco è stato ritirato dal mercato europeo, mentre continua ad essere utilizzato negli USA seppur con stretti controlli sui pazienti (56).

È stato poi negli ultimi anni approvato negli Stati Uniti ed Europa l'utilizzo di Vedolizumab per CU e MC. Si tratta di un anticorpo monoclonale diretto contro l'integrina $\alpha 4\beta 7$, ovvero una molecola di adesione espressa sulla superficie di linfociti specifici per l'intestino (57). Tramite il suo legame con la molecola di adesione della mucosa vascolare (MAdCAM-1 mucosal vascular addressin cell adhesion molecule-1) a livello della rete vascolare intestinale gioca un ruolo fondamentale nel trasporto dei linfociti a livello intestinale (58)(59). Caratteristica fondamentale del vedolizumab è la selettività intestinale, non propria dei suoi predecessori. Per la malattia di Crohn il farmaco è attualmente destinato a coloro i quali siano affetti da MC moderato-severo che abbiano manifestato una risposta inadeguata o una perdita di risposta a terapia convenzionale o con AntiTNF alfa. Oppure per quei pazienti che abbiano manifestato intolleranza a terapie convenzionali con AntiTNF alfa.

Quando il paziente risulta refrattario alle terapie mediche o in caso di insorgenza di complicanze in corso di tali trattamenti, diventa necessario il ricorso alla chirurgia. Nei pazienti con MC le opzioni terapeutiche chirurgiche comprendono trattamenti rivolti sia alla malattia intestinale, quali stricturoplastiche e resezioni intestinali, sia alle sue complicanze, come ad esempio il trattamento di fistole perianali e il drenaggio di ascessi (60)(61).

3. PROTEOMICA NELLE IBD

3.1 Biomarcatori nelle IBD

Gli strumenti attualmente a disposizione nella diagnosi e prognosi delle IBD, come per la previsione di risposta a terapia sono perlopiù basati sull'utilizzo di caratteristiche cliniche in combinazione con caratteristiche endoscopiche, istologiche, radiologiche e marcatori non specifici rilevati dall'analisi di siero e feci. L'aumento di alcune molecole a livello sierico caratterizza il quadro infiammatorio tipico delle IBD, anche se spesso non è possibile eseguire la loro analisi o ricerca routinariamente. Alcune di queste molecole sono molecole di fase acuta, secondarie al processo di coagulazione e fibrinolisi, altre sono inibitori di proteasi, proteine di trasporto e citochine (62)(63). Anche una elevata conta piastrinica si correla ad una risposta infiammatoria ma senza specificità per le IBD (63). Gli indicatori sierici maggiormente utilizzati sono la proteina C reattiva (PCR), gli anticorpi anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) e gli anticorpi anti citoplasma dei neutrofili (ANCA). Questi indicatori però hanno diversi limiti. La PCR ha una buona affidabilità nell'identificazione dell'attività infiammatoria specialmente nella malattia di Crohn ma non dimostra la stessa affidabilità nei pazienti affetti da Colite ulcerosa (64). Inoltre essa ha scarsa specificità nel distinguere tra MC, UC e coliti infettive. Alcuni studi hanno inoltre dimostrato che il 25 % dei pazienti affetti da MC con evidente attività di malattia dimostravano normali valori di PCR (62). La positività agli ASCA si dimostra nel 39- 79% dei pazienti con MC e nel 5-15% dei pazienti con UC (64)(65). Il 14-18% di pazienti sani mostra però altresì una positività per tali anticorpi limitando il valore diagnostico della loro rilevazione (66). Anche la rilevazione di ANCA positività mostra un basso potere diagnostico essendo positivo in una percentuale di pazienti sani che si aggira intorno al 32% (67). L'analisi delle proteine

fecali ha dimostrato buoni risultati in termini diagnostici e prognostici delle IBD, maggiormente della malattia di Crohn. La calprotectina fecale per esempio si mantiene alterata per una settimana nelle feci quando vi sia un danno mucosale anche in assenza di lesioni endoscopiche evidenti (68). Essa però non è specifica delle IBD bensì di un danno mucosale e può non essere particolarmente elevata nei pazienti con coinvolgimento ileale di malattia di Crohn, necessita perciò di cut off diversi nel sospetto o analisi di pazienti con malattia ileocolica (69)(70). Alcuni studi sembrano inoltre dimostrare un ruolo della calprotectina in termini di previsione di risposta alla terapia con AntiTNF come anche in termini di prevenzione di relapse, quest'ultimo ruolo secondario al fatto che il valore della calprotectina fecale incrementa già sei mesi prima della evidenza clinica ed endoscopica di relapse (71)(72). Benchè quindi siano stati identificati molti biomarcatori non invasivi, nessuno di questi sembra in grado di svolgere appieno il ruolo di "gold standard" per la diagnosi, la valutazione di attività di malattia, la prognosi nelle IBD, nonchè la previsione di risposta alle terapie.

3.2 Proteomica come approccio nell'identificazione di biomarcatori nelle IBD

La proteomica studia complessivamente la composizione proteica in termini qualitativi e quantitativi in una specifica condizione clinica e ne analizza i cambiamenti sotto precisi stimoli (73)(74). il Proteoma può essere considerato come la "firma " di una precisa condizione clinica patologica in quanto deriva dal risultato dell'interazione tra le caratteristiche genetiche ed i fattori ambientali (75). Le nuove biotecnologie infatti facilitano attualmente l'analisi del trascrittoma e delle sue variazioni anche nel contesto delle IBD e sono in grado di fornire nuovi biomarcatori (76). Esse aiutano nell'analisi e nella comprensione dei meccanismi di risposta infiammatoria, delle attività della barriera epiteliale e dell'interazione con il microbiota intestinale attraverso l'analisi di differenti campioni biologici (siero/feci) . Le tecniche di proteomica vengono classificate attraverso due approcci nominati rispettivamente *bottom-up* o *top down*. Nel primo caso l'approccio prevede che le proteine purificate o complessi proteici siano sottoposti a clivaggio proteolitico ed i prodotti peptidici siano analizzati alla spettrometria di massa (MS). Al contrario l'approccio definito *top down* si basa sull'analisi di proteine intatte, ovvero non clivate, attraverso la misura diretta di frammenti ionizzati o dall'isolamento di proteine attraverso sistemi di separazione basati sull'utilizzo di gel e analisi spettrometrica di massa.

3.3 Proteomica nello studio della patogenesi delle IBD

La proteomica ha dimostrato di poter svolgere un ruolo importante nello studio dei meccanismi patogenetici della IBD. In uno studio pubblicato nel 2015 sono state descritte significative differenze in termini di abbondanza proteica attraverso l'analisi di campioni di tessuto ottenuti da pazienti affetti da UC rispetto a pazienti controllo. Di queste 46 proteine identificate la lattoferrina dimostrava la maggior differenza media in abbondanza nei pazienti con UC, nello specifico 219 volte più abbondante nei campioni provenienti da questi pazienti. L'abbondanza relativa di lattoferrina inoltre correlava con il grado di infiammazione di pazienti con UC (72). Undici delle quarantasei proteine identificate nelle biopsie provenienti da pazienti affetti da UC sono presenti nei granulociti neutrofili e sono associate con la formazione dei filamenti extracellulari (NETs) di questi leucociti. Essi vengono prodotti in seguito ad uno stimolo infiammatorio e rappresentano un segno di infiammazione cronica anche in assenza di segni macroscopici di essa (77–80). Le tecniche di proteomica si sono anche concentrate sull'analisi della risposta delle cellule del sistema immunitario nei pazienti affetti da IBD. Altri studi hanno analizzato invece le modifiche a livello dell'epitelio intestinale. Esso infatti rappresenta la più estesa superficie del nostro organismo esposta all'ambiente esterno e che quindi viene maggiormente in contatto con ipotetici agenti patogeni. La sua alterazione gioca di certo un importante ruolo nella patogenesi delle IBD. Le cellule epiteliali sono la prima linea di difesa nei confronti di potenziali agenti lesivi e svolgono anche il ruolo di immunità innata nel contesto della mucosa intestinale. Il ruolo di difesa può però venir meno quando assistiamo ad un danno dello strato di epitelio, che innesca meccanismi immunitari a sostegno di circuiti infiammatori con incremento dell'infiltrato di cellule immunitarie, come tipicamente osservato nelle IBD (81). Le alterazioni a livello molecolare che si instaurano in tali

condizioni sono state identificate solo parzialmente concentrando l'attenzione a livello dello strato epiteliale, della matrice extracellulare e sulle modifiche a carico delle giunzioni cellulari. Attraverso la tecnica di gel elettroforesi a due dimensioni (2D DIGE) associate alla spettrometria di massa (MALDI-TOF) in uno studio In 2012 Poulsen et al. hanno analizzato i profili proteici ottenuti da campioni di pazienti affetti da UC. I risultati di queste analisi hanno permesso di identificare 43 proteine espresse in maniera differente nei campioni provenienti dai pazienti con infiammazione e rispetto ai pazienti con malattia quiescente. Alcune di esse sono proteine coinvolte nel metabolismo energetico e nella risposta allo stress ossidativo (82). Un altro recente studio basato sull'analisi di campioni di tessuto a tutto spessore ottenuto da materiale chirurgico ha supportato la validità dell'approccio proteomico (83). Entrambi gli studi hanno rivelato importanti cambiamenti in proteine interessate nel rimaneggiamento della matrice extracellulare, della mecano trasduzione, e dei meccanismi di autofagia che sembrano caratterizzare i quadri di UC quiescente e di MC quiescente. Nello specifico i pazienti affetti da UC sembrano mostrare modifiche nel rimodellamento del citoscheletro in associazione ad aumentati livelli di specifici enzimi coinvolti nell'omeostasi cellulare. I pazienti affetti da MC invece, mostrano l'implementazione di una rete volta al sostegno del metabolismo cellulare, mentre i meccanismi di autofagia e di rinnovamento cellulare sono alleviate (83–85).

3.4 Proteomica nello studio della risposta alle terapie nelle IBD

Un altro ruolo determinante della proteomica è nell'ambito dell'identificazione di biomarker per la diagnosi, selezione della terapia e nel monitoraggio della risposta clinica. Un recente studio concentrato sulla diagnosi e basato sull'approccio proteomico, ha identificato un profilo sierologico in grado di dimostrare la presenza di danno transmurale nei pazienti con MC, che sia anche in grado di indicare la presenza di complicanze con una sensibilità del 70% e una specificità del 72.5% (86). I marcatori sierici identificati non sembrano essere in grado di discriminare però tra Malattia di Crohn e Rettocolite Ulcerosa, mentre l'approccio proteomico su campioni di siero sembra avere migliori caratteristiche per questo obiettivo (83)(87)(88).

L'approccio tramite proteomica è stato applicato anche in ambito di gestione terapeutica. Infatti, si è cercato di identificare potenziali biomarcatori di risposta alla terapia e nello specifico alle terapie con farmaci biologici

la terapia con Infliximab, uno dei farmaci biologici ad azione anti TNF è tra le maggiormente utilizzate nella terapia delle IBD. In tale ambito la capacità di predire la risposta alla terapia e la conoscenza dei meccanismi che sottendono alla perdita di risposta o alla inesistenza di essa non sono ancora completamente acclarati. Alcuni studi hanno identificato il fattore di aggregazione piastrinica 4 (PF4) come un indicatore eventuale di risposta alla terapia con infliximab in pazienti affetti da malattia di Crohn. Esso infatti si dimostra avere livelli maggiori nei non responder a confronto dei responder sia prima che dopo il trattamento con infliximab. PF4 è considerato come un fattore espresso nel contesto di fase acuta e quindi in generale come marcatore di infiammazione nei pazienti affetti da MC (89). Un altro interessante studio ha messo a confronto i sieri di pazienti trattati con infliximab sia prima dell'inizio

del trattamento che dopo il periodo di induzione, identificando un pannello di 15 proteine presenti in quantità diverse nei sieri di questi pazienti. La maggior parte di questo pannello proteico è rappresentata da peptidi che hanno un ruolo nell'attivazione e differenziazione dei linfociti CD4 + e nella attivazione dei monociti/macrofagi (90).

4. SCOPO DELLO STUDIO

L'obiettivo del progetto di basa sulla volontà di identificare potenziali biomarcatori in grado di discriminare tra soggetti affetti da patologia (CU e/o MC) e successivamente di ricercare particolari biomarcatori che permettano di discriminare pazienti responder o non responder nel contesto di terapie biologiche. Le tecniche si basano sull'analisi proteomica basata sull'utilizzo della spettrometria di massa laser assistita (MALDI). Come precedentemente discusso diversi studi negli ultimi anni hanno incoraggiato le tecniche di analisi proteomica come valide strategie nell'individuazione di biomarcatori. Il nostro lavoro si propone di effettuare l'analisi proteomica su siero di pazienti e nello specifico su una specifica porzione proteica ovvero le low abundant protein che rappresenterebbero una frazione specifica in grado di riflettere i prodotti derivanti dal citoscheletro delle cellule epiteliali intestinali e della rimodellamento lipidico. Quindi l'obiettivo primario è di identificare uno spettro o un picco specifico in grado di caratterizzare la patologia e in seconda battuta di identificare spettri o picchi specifici di pazienti responder e non responder a terapie biologiche.

5. MATERIALI E METODI

5.1 Popolazione in studio

Dopo aver ottenuto adeguato consenso informato sono stati arruolati tutti i pazienti consecutivi affetti da MC che afferivano alla U.O. Gastroenterologia ed Endoscopia digestiva di IRCCS policlinico San Donato. Tutte le diagnosi erano già state confermate da adeguato iter diagnostico dopo corretto inquadramento clinico strumentale (31).

Sono stati arruolati anche soggetti sani come controlli (con età e sesso sovrapponibili e confrontabili con i campioni di soggetti malati).

Sono stati raccolti dati riguardanti le caratteristiche cliniche della malattia, le localizzazioni della stessa, l'estensione secondo la classificazione di Montreal al basale, e il comportamento clinico classificato secondo HBI al basale e ad ogni visita corrispondente alle infusioni.

La raccolta dei dati clinici e dei sieri è stata effettuata prima dell'infusione di farmaco, fino alla IV/V.

Le indicazioni alla terapia con farmaco biologico, come da indicazione delle linee guida della società europea per il Crohn e la Colite Ulcerosa (ECCO) erano le seguenti:

Pazienti affetti da malattia moderato/severa con resistenza a terapia steroidea sistemica o sviluppo di steroido dipendenza (31).

Ad ogni controllo clinico veniva calcolato l'HBI, che permette una valutazione delle condizioni cliniche dei pazienti. Affinchè un paziente fosse considerato come

responsivo alla terapia era necessario che il HB Index decrescesse di un valore pari o maggiore di 3 punti rispetto alla valutazione precedente. Perché il paziente fosse invece considerato in remissione il valore assoluto di HB Index deve assestarsi sotto il 4. La rivalutazione endoscopica è stata somministrata ai paziente secondo indicazione clinica. I pazienti venivano prelevati per rivalutazione biochimica, dosaggio PCR alla sesta e alla quattordicesima settimana, ovvero alla terza e quarta infusione. Tali dati però non sono stati utilizzati per rivalutazione di malattia.

5.2 Ionizzazione a desorbimento laser assistito da matrice (MALDI Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization).

Per la creazione di spettri di massa è stata utilizzata la tecnica di Ionizzazione a desorbimento laser assistito da matrice (MALDI Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization).

Perché il campione sia correttamente analizzato tramite questa tecnica è necessario che venga preliminarmente sottoposto a tecniche specifiche di ifenazione. Tale approccio ha il vantaggio di consentire l'analisi e quindi l'identificazione di una precisa benchè piccola porzione di peptidi o proteine. Nel nostro caso i campioni sono stati sottoposti ad immunodeplezione con HPLC e colonna multi affinity removal system. Tale passaggio nell'ottica di eliminare le 14 proteine ad alta abbondanza (HAP).

I sieri raccolti ed adeguatamente analizzati appartenenti a controlli sani, a pazienti responder e a pazienti non responder sono stati processati per ottenere degli specifici spettri e l'analisi di confronto è stata poi condotta su due bracci di studio.

Il primo braccio prevedeva il confronto tra i pazienti sani (controlli) e i pazienti totali affetti da patologia, successivamente sono stati confrontati i pazienti controlli con i

pazienti responder ed i controlli con i non responder. Tutto con il siero ottenuto prima della prima infusione.

Il secondo braccio prevedeva invece l'analisi tra i pazienti responder e non responder, prima della prima, della seconda e della terza infusione.

Nell'analisi di entrambi i bracci sono stati utilizzati a fini statistici i seguenti metodi:

come prima cosa normality test (Anderson-Darling test), per verificare se la distribuzione è normale (distribuzione gaussiana) che è condizione necessaria per applicare un test parametrico (t-test, ANOVA); se la distribuzione non rispetta il criterio di normalità si applica un test non parametrico (Wilcoxon test, Kruskal-Wallis);

Wilcoxon test ($p < 0.05$); CV (coefficiente di variazione) deve essere < 25 ; ROC curve (Receiver Operating Characteristic) (AUC -area under curve- > 0.75), valuta la capacità discriminante di un test, se il valore trovato è > 0.75 la proporzione dei veri positivi è superiore a quella dei falsi positivi; PCA (Principal Component Analysis), considera la variabilità all'interno del modello. In ultimo va precisato che l'analisi è stata condotta "grouping", cioè considera:

replicati biologici (diversi campioni) e replicati tecnici (per ogni campione vengono sparati 4 diversi spettri).

Infine l'utilizzo del software ***Clin pro tools*** è stato utilizzato nell'analisi degli spettri e nell'identificazione di picchi miglior separatori.

6. RISULTATI

I campioni utilizzati sono sieri umani prelevati da pazienti con diagnosi confermata di morbo di Crohn sottoposti ad infusioni endovenose di anticorpi monoclonali anti-TNF e da pazienti controllo, tutti di sesso maschile.

I sieri di 72 soggetti sono stati utilizzati per l'analisi dei due bracci di cui 40 controlli sani, 11 classificati come non responder e 21 come responder tutti pazienti affetti da malattia di Crohn.

I quaranta sieri classificati come controlli appartengono a soggetti adulti di sesso maschile senza comorbidità o terapie concomitanti, età media 51 anni [range 22-70].

Degli 11 che sono stati successivamente classificati come **non responder**, l'età media era 59 anni [range 45-72]. Nessuno di questi pazienti presentava localizzazione esclusivamente ileale (L1) o del tratto gastroenterico superiore (L4), 4 (36%) con localizzazione ileocolica (L3) e 7 (64%) colica (L2). 2 (18%) pazienti presentavano coinvolgimento perianale ed un solo paziente (9%) interessamento extraintestinale

Dei 21 che successivamente sono stati classificati come **responder** l'età media era 41 (24-72). 3 (14%) mostravano una localizzazione del tratto gastroenterico superiore (L4), 5 (24%) mostravano una localizzazione di malattia ileale (L1), 8 (38%) ileocolica (L3) e 5 (24%) colica (L2). 8 (38%) avevano un coinvolgimento perianale e 2 (9,5%) manifestavano interessamento extraintestinale di malattia. Dei 11 pazienti classificati come non responder, sette (63%) erano sottoposti a terapie concomitanti, intese come azatioprina, 6 mercaptopurina o metotrexate. Nel gruppo di pazienti classificati come

responder, dodici (57%) erano sottoposti a terapie concomitanti. Le caratteristiche dei pazienti analizzati sono elencate in Tabella 2.1

Risposta terapia (n)	ETA' MEDIA aa [range]	Terapie concomitanti *	L1	L2	L3	L4	Malattia perianale	Manifestazioni extraintestinali
NR (11)	59 [45-72]	7 (63%)	0	7 (64%)	4 (36%)	0	2 (18%)	1 (9%)
R (21)	41 [24-72]	12(57%)	5 (24%)	5 (24%)	8 (38%)	3 (14%)	8 (38%)	2 (9,5%)

* Terapia con azatioprina, 6 mercaptopurina, metotrexate

Tabella 2.1 Caratteristiche dei pazienti in studio.

La prima analisi è stata condotta per confrontare i controlli verso i soggetti affetti da patologia per individuare eventuali picchi miglior separatori che permettessero di discriminare tra campioni controllo e campioni affetti da malattia di Crohn. In questo primo gruppo sono state effettuate le analisi di confronto tra controlli e non responder e tra controlli e responder.

Nel primo sottogruppo lo spettro MALDI totale (ossia lo spettro medio di tutti i campioni analizzati) ha permesso di rilevare la presenza di 115 picchi in un range di m/z compreso fra 1000 e 35000. L'analisi degli spettri relativi a ciascun gruppo ha consentito di evidenziare una variazione significativa in 18 picchi tutti down-regolati nei controlli (Figura 1).

Nel secondo sottogruppo, ovvero quello del confronto tra campioni controllo e campioni di soggetti non responder lo spettro MALDI totale (ossia lo spettro medio di tutti i campioni analizzati) ha permesso di rilevare la presenza di 128 picchi in un range di m/z compreso fra 1000 e 35000. L'analisi degli spettri relativi a ciascun gruppo ha consentito di evidenziare una variazione significativa in 12 picchi tutti down-regolati nei controlli (Figura 2).

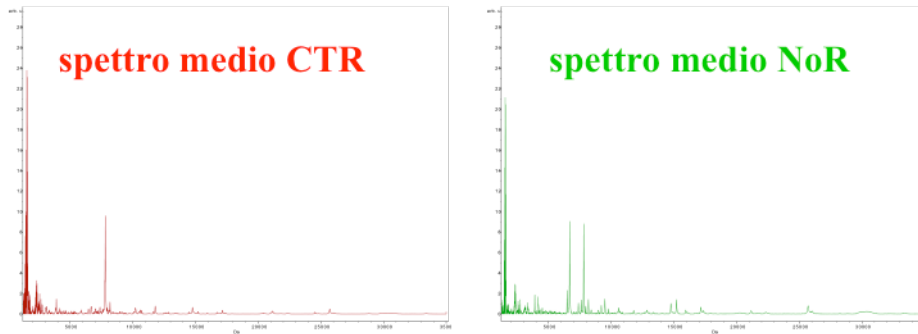


Figura 1. Confronto tra gli spettri medi di campioni sani (controlli) e campioni non responder.

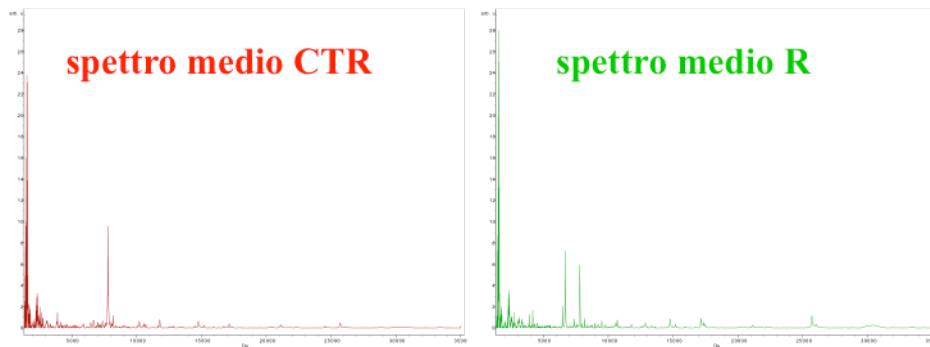


Figura 2. Confronto tra gli spettri medi di campioni sani (controlli) e campioni responder.

Nel secondo braccio di analisi era previsto il confronto tra i pazienti responder e i pazienti non responder. Le analisi sono state condotte prima della prima e prima della seconda infusione.

Nel primo caso lo spettro MALDI totale (ossia lo spettro medio di tutti i campioni analizzati) ha permesso di rilevare la presenza di 125 picchi in un range di m/z compreso fra 1000 e 35000. L'analisi degli spettri relativi a ciascun gruppo ha

consentito di evidenziare una variazione significativa in 2 picchi down-regolati nei responder (Figura 3).

Nel secondo gruppo, ovvero il confronto tra responder e non responder alla II infusione lo spettro MALDI totale (ossia lo spettro medio di tutti i campioni analizzati) ha permesso di rilevare la presenza di 122 picchi in un range di m/z compreso fra 1000 e 35000. L'analisi degli spettri relativi a ciascun gruppo ha consentito di evidenziare una variazione significativa in 6 picchi down-regolati nei responder (Figura 4).

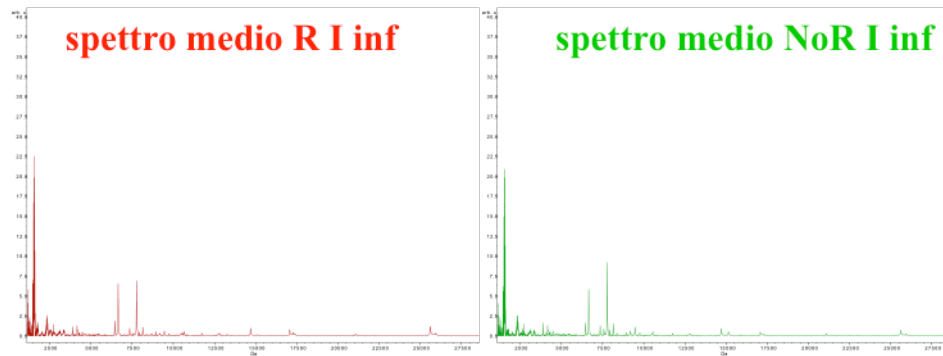


Figura 3. Confronto tra gli spettri medi di campioni responder e non responder alla I infusione.

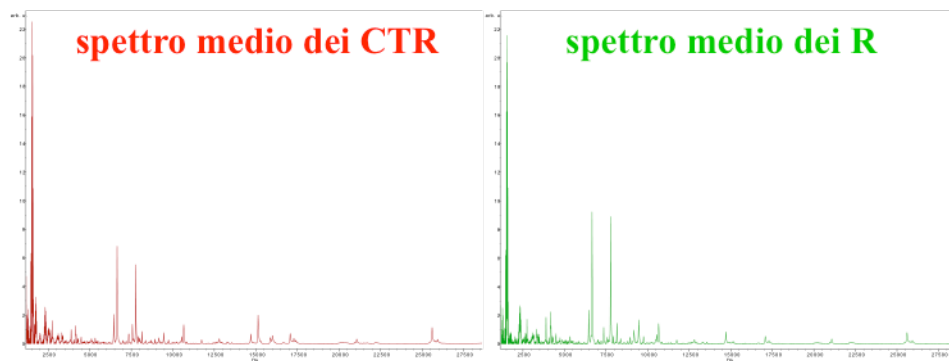


Figura 4. *Confronto tra gli spettri medi di campioni responder e non responder alla I infusione.*

In ultima analisi è stato fatto un confronto degli spettri medi tra controlli, responder e non responder prima della prima infusione e prima della seconda infusione. Tale comparazione ha permesso di identificare un picco (3155.98 m/z) che varia in tutti i campioni. Esso è alterato nei responder e non responder rispetto ai controlli prima della prima infusione, ma tende a manifestare un comportamento simile ai controlli nei responder rimanendo up regolato nei non responder prima della seconda infusione (Figura 5).

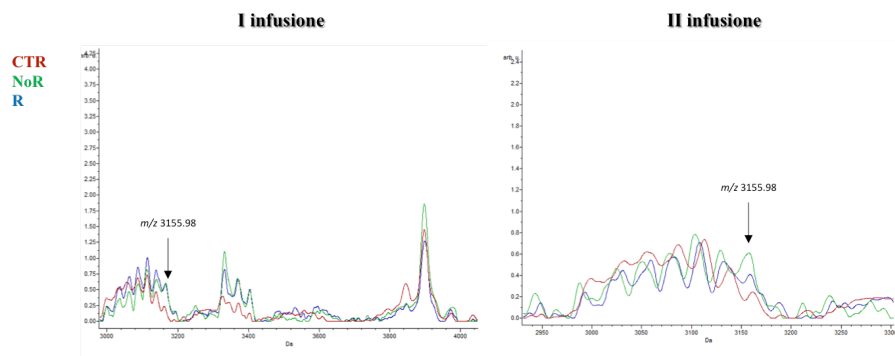


Figura 5 *Confronto tra gli spettri medi di campioni sani (controlli), responder e non responder alla I infusione e alla II infusione.*

7. DISCUSSIONE

Molti aspetti eziologici patogenetici e clinici rimangono a tutt'oggi oscuri nel contesto delle patologie infiammatorie intestinali. Nell'ambito dell'inquadramento eziopatogenetico sono stati raggiunti obiettivi importanti riguardo la comprensione di alcuni meccanismi molecolari che sottendono all'insorgenza della patologia soprattutto nell'ambito del ruolo del sistema immunitario e dell'attivazione o soppressione di alcuni particolari pattern infiammatori (77–80) (81). Tali studi hanno permesso di chiarificare in parte l'eziologia multifattoriale da sempre ipotizzata nell'ambito delle IBD e di identificare alcuni particolari scenari patogenetici che coinvolgano il sistema immunitario e la sua interazione con l'epitelio intestinale e la matrice extracellulare (83). Rimane ancora evidente un elevato grado di variabilità per ciò che riguarda le manifestazioni cliniche ed il comportamento delle IBD che rende difficile l'identificazione di un marcatore preciso ed affidabile di diagnosi, prognosi e risposta alla terapia. Molti sono stati analizzati nel tempo, partendo da marcatori biochimici ottenuti dall'analisi del siero o delle feci fino ad arrivare alla ricerca di un marcatore genetico in grado di rivestire questo importante ruolo. Ma la ricerca di un singolo protagonista sembra essere fallimentare come approccio, forse a causa della particolare eterogeneità e complessità delle malattie infiammatorie croniche intestinali.

In tale contesto l'utilizzo delle tecniche di proteomica sembra dimostrare risultati incoraggianti. Essa infatti sembra soddisfare alcuni importanti requisiti come la capacità di analizzare un ampio volume di dati da singolo campione e di riprodurre uno specchio fedele di complesse interazioni a livello molecolare senza focalizzarsi

strettamente su alcune singole alterazioni o molecole (91). L'utilizzo di tecniche di proteomica inoltre garantisce la raccolta di una ampissima mole di dati informatizzati e confrontabili attraverso software specifici. I risultati del lavoro presentato dal nostro gruppo sembrano andare in questa direzione. A fronte di una limitata popolazione analizzata, frutto della complessità del disegno dello studio e delle tecniche applicate, appare infatti possibile identificare sia uno spettro specifico di patologia che anche un particolare picco che possa fungere da biomarcatore.

Il lavoro svolto dimostra come primo fondamentale aspetto che l'analisi si possa condurre in maniera affidabile e riproducibile a partire da campioni facilmente ottenibili dal paziente ovvero i siero ricavati da prelievo di sangue periferico.

Inoltre le biotecnologie applicate permettono con ragionevole sicurezza di eliminare dall'analisi spettrometrica quei peptidi o proteine presenti nel sangue circolante che già in passato sono state studiate come biomarcatori (PCR o particolari anticorpi circolanti) e che si sono dimostrati poco efficaci per il ruolo.

I dati ottenuti dai confronti singoli tra controlli e soggetti affetti da malattia di Crohn sono incoraggianti. Essi infatti producono spettri confrontabili e le differenze evidenziate sono a favore di una maggior presenza di derivati proteici a livello del siero di pazienti con patologia. Tali informazioni consentono di immaginare un pattern specifico associato ai pazienti con patologia benchè non ancora completamente delineato. Una simile conclusione si può azzardare anche riguardo al confronto tra pazienti responder e pazienti non responder. Gli spettri ottenuti identificano picchi comuni e confrontabili ma allo stesso tempo un profilo specifico appartenente ai pazienti non responder, anche in questo caso di maggior espressione proteica.

I dati più interessanti si sono però evidenziati nel confronto complessivo tra spettri sovrapposti di responder, non responder e controlli ottenuti prima della prima infusione e prima della seconda.

Alla osservazione un picco corrispondente a 3155,98 m/z è diverso in tutti i campioni e sembra normalizzarsi nei responder rispetto ai non responder dopo la prima infusione, andando ad assumere lo stesso aspetto dei controlli.

Questo picco potrebbe essere quindi tipico di patologia essendo praticamente uguale nei pazienti malati ed ancora non trattati e andando a rinormalizzarsi in quei soggetti che rispondono alla terapia.

L'esatta corrispondenza con un preciso peptide o proteina è in fase di studio, come in fase di studio sono i pazienti affetti da CU e coloro che sono stati sottoposti a terapia con farmaci anti integrine.

Sebbene i dati siano incoraggianti, il lavoro attualmente può solo porre le basi per un futuro e più ampio utilizzo di tecniche di proteomica nell'ambito dell'identificazione di biomarcatori in grado di svelare i meccanismi patogenetici, il comportamento e la risposta alle terapie di questi pazienti.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Tontini GE, Vecchi M, Pastorelli L, Neurath MF, Neumann H. Differential diagnosis in inflammatory bowel disease colitis: State of the art and future perspectives. *World J Gastroenterol WJG*. 2015 Jan 7;21(1):21–46.
2. Kaplan GG. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015 Dec;12(12):720–7.
3. Burisch J, Pedersen N, Čuković-Čavka S, Brinar M, Kaimakliotis I, Duricova D, et al. East–West gradient in the incidence of inflammatory bowel disease in Europe: the ECCO-EpiCom inception cohort. *Gut*. 2014 Apr 1;63(4):588–97.
4. Ranzi T, Bodini P, Zambelli A, Politi P, Lupinacci G, Campanini MC, et al. Epidemiological aspects of inflammatory bowel disease in a north Italian population: a 4-year prospective study. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1996 Jul;8(7):657–61.
5. Bernstein C, Wajda A, Svenson L, MacKenzie A, Koehoorn M, Jackson M, et al. The Epidemiology of Inflammatory Bowel Disease in Canada: A Population-Based Study. *Am J Gastroenterol*. 2006 Jul;101(7):1559–68.
6. Rodríguez L a. G, González-Pérez A, Johansson S, Wallander M-A. Risk factors for inflammatory bowel disease in the general population. *Aliment Pharmacol Ther*. 2005;22(4):309–15.

7. Loftus EV. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*. 2004 May 1;126(6):1504–17.
8. Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sørensen TIA, Binder V. Familial Occurrence of Inflammatory Bowel Disease [Internet]. <https://doi.org/10.1056/NEJM199101103240203>. 2010 [cited 2019 Sep 28]. Available from: https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM199101103240203?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dwww.ncbi.nlm.nih.gov
9. Probert CS, Jayanthi V, Hughes AO, Thompson JR, Wicks AC, Mayberry JF. Prevalence and family risk of ulcerative colitis and Crohn's disease: an epidemiological study among Europeans and south Asians in Leicestershire. *Gut*. 1993 Nov 1;34(11):1547–51.
10. Hanauer SB. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm Bowel Dis*. 2006 Jan;12 Suppl 1:S3-9.
11. Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekblom A. Appendectomy and Protection against Ulcerative Colitis [Internet]. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM200103153441104>. 2009 [cited 2019 Sep 28]. Available from: https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM200103153441104?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dwww.ncbi.nlm.nih.gov

12. Mahid SS, Minor KS, Soto RE, Hornung CA, Galandiuk S. Smoking and Inflammatory Bowel Disease: A Meta-analysis. *Mayo Clin Proc.* 2006 Nov 1;81(11):1462–71.
13. Lindberg E, Tysk C, Andersson K, Järnerot G. Smoking and inflammatory bowel disease. A case control study. *Gut.* 1988 Mar;29(3):352–7.
14. Koloski NA, Bret L, Radford-Smith G. Hygiene hypothesis in inflammatory bowel disease: A critical review of the literature. *World J Gastroenterol WJG.* 2008 Jan 14;14(2):165–73.
15. Halme L, Rautelin H, Leidenius M, Kosunen TU. Inverse correlation between *Helicobacter pylori* infection and inflammatory bowel disease. *J Clin Pathol.* 1996 Jan;49(1):65–7.
16. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* Infection in Inflammatory Bowel Disease: Is *Helicobacter pylori* Infection a Protective Factor?: *Scandinavian Journal of Gastroenterology: Vol 36, No 12* [Internet]. [cited 2019 Sep 28]. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/003655201317097155>
17. Elliott DE, Li J, Blum A, Metwali A, Qadir K, Urban JF, et al. Exposure to schistosome eggs protects mice from TNBS-induced colitis. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol.* 2003 Mar 1;284(3):G385–91.
18. Sandborn WJ, Elliott DE, Weinstock J, Summers RW, Landry-Wheeler A, Silver N, et al. Randomised clinical trial: the safety and tolerability of *Trichuris suis* ova in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2013;38(3):255–63.

19. Hugot J-P, Alberti C, Berrebi D, Bingen E, Cézard J-P. Crohn's disease: the cold chain hypothesis. *The Lancet*. 2003 Dec 13;362(9400):2012–5.
20. Collins MT, Lisby G, Moser C, Chicks D, Christensen S, Reichelderfer M, et al. Results of Multiple Diagnostic Tests for *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in Patients with Inflammatory Bowel Disease and in Controls. *J Clin Microbiol*. 2000 Dec;38(12):4373–81.
21. Card T, Logan RFA, Rodrigues LC, Wheeler JG. Antibiotic use and the development of Crohn's disease. *Gut*. 2004 Feb;53(2):246–50.
22. Qian B-F, Tonkonogy SL, Sartor RB. Luminal bacterial antigen-specific CD4+ T-cell responses in HLA-B27 transgenic rats with chronic colitis are mediated by both major histocompatibility class II and HLA-B27 molecules. *Immunology*. 2006 Mar;117(3):319–28.
23. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001 May;411(6837):603–6.
24. Russell R, Wilson D, Satsangi J. Unravelling the complex genetics of inflammatory bowel disease. *Arch Dis Child*. 2004 Jul;89(7):598–603.
25. Lala S, Ogura Y, Osborne C, Hor SY, Bromfield A, Davies S, et al. Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology*. 2003 Jul;125(1):47–57.
26. Seksik P, Sokol H, Lepage P, Vasquez N, Manichanh C, Mangin I, et al. Review

article: the role of bacteria in onset and perpetuation of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006 Oct;24 Suppl 3:11–8.

27. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2012 Nov 1;491(7422):119–24.

28. Collier-Hyams LS, Neish AS. Innate immune relationship between commensal flora and the mammalian intestinal epithelium. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2005 Jun;62(12):1339–48.

29. Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, et al. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1996 Aug 1;157(3):1261–70.

30. Sarra M, Pallone F, Macdonald TT, Monteleone G. IL-23/IL-17 axis in IBD. *Inflamm Bowel Dis*. 2010 Oct;16(10):1808–13.

31. Gomollón F, Dignass A, Annese V, Tilg H, Van Assche G, Lindsay JO, et al. 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management. *J Crohns Colitis*. 2017 Jan;11(1):3–25.

32. Benevento G, Avellini C, Terrosu G, Geraci M, Lodolo I, Sorrentino D. Diagnosis and assessment of Crohn's disease: the present and the future. *Expert*

Rev Gastroenterol Hepatol. 2010 Dec;4(6):757–66.

33. Ingle SB, Loftus EV. The natural history of perianal Crohn's disease. *Dig Liver Dis Off J Ital Soc Gastroenterol Ital Assoc Study Liver*. 2007 Oct;39(10):963–9.

34. Langholz E. Current trends in inflammatory bowel disease: the natural history. *Ther Adv Gastroenterol*. 2010 Mar;3(2):77–86.

35. Freeman H-J. Colorectal cancer risk in Crohn's disease. *World J Gastroenterol*. 2008 Mar 28;14(12):1810–1.

36. Pohl C, Hombach A, Kruis W. Chronic inflammatory bowel disease and cancer. *Hepatogastroenterology*. 2000 Feb;47(31):57–70.

37. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott IDR, Bernstein CN, Brant SR, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol J Can Gastroenterol*. 2005 Sep;19 Suppl A:5A-36A.

38. Louis E, Collard A, Oger AF, Degroote E, Aboul Nasr El Yafi FA, Belaiche J. Behaviour of Crohn's disease according to the Vienna classification: changing pattern over the course of the disease. *Gut*. 2001 Dec;49(6):777–82.

39. Cosnes J, Cattan S, Blain A, Beaugerie L, Carbonnel F, Parc R, et al. Long-term evolution of disease behavior of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2002 Jul;8(4):244–50.

40. Sostegni R, Daperno M, Scaglione N, Lavagna A, Rocca R, Pera A. Review article: Crohn's disease: monitoring disease activity. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003 Jun;17 Suppl 2:11–7.
41. Harvey RF, Bradshaw JM. A simple index of Crohn's-disease activity. *Lancet Lond Engl.* 1980 Mar 8;1(8167):514.
42. Lichtenstein GR, Abreu MT, Cohen R, Tremaine W, American Gastroenterological Association. American Gastroenterological Association Institute technical review on corticosteroids, immunomodulators, and infliximab in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2006 Mar;130(3):940–87.
43. Yang Y-X, Lichtenstein GR. Corticosteroids in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol.* 2002 Apr;97(4):803–23.
44. Marshall JK, Otley AR, Afif W, Bernstein CN, Hookey L, Leontiadis G, et al. Canadian Association of Gastroenterology position statement regarding the use of thiopurines for the treatment of inflammatory bowel disease. *Can J Gastroenterol Hepatol.* 2014 Aug;28(7):371–2.
45. van Deventer SJH. New biological therapies in inflammatory bowel disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2003 Feb;17(1):119–30.
46. Rutgeerts P, Vermeire S, Van Assche G. Biological therapies for inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* 2009 Apr;136(4):1182–97.
47. Rutgeerts P, D'Haens G, Targan S, Vasiliauskas E, Hanauer SB, Present DH, et al. Efficacy and safety of retreatment with anti-tumor necrosis factor antibody

(infliximab) to maintain remission in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1999 Oct;117(4):761–9.

48. Regueiro M, Valentine J, Plevy S, Fleisher MR, Lichtenstein GR. Infliximab for treatment of pyoderma gangrenosum associated with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2003 Aug;98(8):1821–6.

49. Imrie FR, Dick AD. Biologics in the treatment of uveitis. *Curr Opin Ophthalmol*. 2007 Nov;18(6):481–6.

50. Van den Bosch F, Kruithof E, De Vos M, De Keyser F, Mielants H. Crohn's disease associated with spondyloarthritis: effect of TNF-alpha blockade with infliximab on articular symptoms. *Lancet Lond Engl*. 2000 Nov 25;356(9244):1821–2.

51. Keane J, Gershon S, Wise RP, Mirabile-Levens E, Kasznica J, Schwiertman WD, et al. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med*. 2001 Oct 11;345(15):1098–104.

52. Caviglia R, Ribolsi M, Rizzi M, Emerenziani S, Annunziata ML, Cicala M. Maintenance of remission with infliximab in inflammatory bowel disease: efficacy and safety long-term follow-up. *World J Gastroenterol*. 2007 Oct 21;13(39):5238–44.

53. Farrell RJ, Alsahli M, Jeen Y-T, Falchuk KR, Peppercorn MA, Michetti P. Intravenous hydrocortisone premedication reduces antibodies to infliximab in Crohn's disease: a randomized controlled trial. *Gastroenterology*. 2003 Apr;124(4):917–24.

54. Peyrin-Biroulet L, Laclotte C, Bigard M-A. Adalimumab maintenance therapy for Crohn's disease with intolerance or lost response to infliximab: an open-label study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007 Mar 15;25(6):675–80.
55. Sandborn WJ, Hanauer SB, Rutgeerts P, Fedorak RN, Lukas M, MacIntosh DG, et al. Adalimumab for maintenance treatment of Crohn's disease: results of the CLASSIC II trial. *Gut.* 2007 Sep;56(9):1232–9.
56. Van Assche G, Vermeire S, Rutgeerts P. Adalimumab in Crohn's disease. *Biol Targets Ther.* 2007 Dec;1(4):355–65.
57. Feagan BG, Greenberg GR, Wild G, Fedorak RN, Paré P, McDonald JWD, et al. Treatment of ulcerative colitis with a humanized antibody to the alpha4beta7 integrin. *N Engl J Med.* 2005 Jun 16;352(24):2499–507.
58. Berg EL, McEvoy LM, Berlin C, Bargatze RF, Butcher EC. L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1. *Nature.* 1993 Dec 16;366(6456):695–8.
59. Hesterberg PE, Winsor-Hines D, Briskin MJ, Soler-Ferran D, Merrill C, Mackay CR, et al. Rapid resolution of chronic colitis in the cotton-top tamarin with an antibody to a gut-homing integrin alpha 4 beta 7. *Gastroenterology.* 1996 Nov;111(5):1373–80.
60. Gionchetti P, Dignass A, Danese S, Magro Dias FJ, Rogler G, Lakatos PL, et al. 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 2: Surgical Management and Special Situations. *J Crohns Colitis.* 2017 Feb;11(2):135–49.

61. Hwang JM, Varma MG. Surgery for inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2008 May 7;14(17):2678–90.
62. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. C-reactive protein as a marker for inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2004 Sep;10(5):661–5.
63. Cioffi M, Rosa AD, Serao R, Picone I, Vietri MT. Laboratory markers in ulcerative colitis: Current insights and future advances. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2015 Feb 15;6(1):13–22.
64. Henriksen M, Jahnsen J, Lygren I, Stray N, Sauar J, Vatn MH, et al. C-reactive protein: a predictive factor and marker of inflammation in inflammatory bowel disease. Results from a prospective population-based study. *Gut*. 2008 Nov;57(11):1518–23.
65. Peyrin-Biroulet L, Sandborn W, Sands BE, Reinisch W, Bemelman W, Bryant RV, et al. Selecting Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease (STRIDE): Determining Therapeutic Goals for Treat-to-Target. *Am J Gastroenterol*. 2015 Sep;110(9):1324–38.
66. Bennike T, Birkelund S, Stensballe A, Andersen V. Biomarkers in inflammatory bowel diseases: current status and proteomics identification strategies. *World J Gastroenterol*. 2014 Mar 28;20(12):3231–44.
67. Bernstein CN, El-Gabalawy H, Sargent M, Landers C, Rawsthorne P, Elias B, et al. Assessing inflammatory bowel disease-associated antibodies in Caucasian and First Nations cohorts. *Can J Gastroenterol J Can Gastroenterol*. 2011

May;25(5):269–73.

68. Tibble J, Teahon K, Thjodleifsson B, Roseth A, Sigthorsson G, Bridger S, et al. A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease. *Gut*. 2000 Oct;47(4):506–13.

69. Impact of disease location on fecal calprotectin levels in Crohn's disease: *Scandinavian Journal of Gastroenterology*: Vol 50, No 7 [Internet]. [cited 2019 Sep 28]. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/00365521.2015.1008035?journalCode=igas20>

70. Manceau H, Chicha-Cattoir V, Puy H, Peoc'h K. Fecal calprotectin in inflammatory bowel diseases: update and perspectives. *Clin Chem Lab Med*. 2017 Mar 1;55(4):474–83.

71. De Vos M, Louis EJ, Jahnsen J, Vandervoort JGP, Noman M, Dewit O, et al. Consecutive fecal calprotectin measurements to predict relapse in patients with ulcerative colitis receiving infliximab maintenance therapy. *Inflamm Bowel Dis*. 2013 Sep;19(10):2111–7.

72. Molander P, Färkkilä M, Ristimäki A, Salminen K, Kemppainen H, Blomster T, et al. Does fecal calprotectin predict short-term relapse after stopping TNF α -blocking agents in inflammatory bowel disease patients in deep remission? *J Crohns Colitis*. 2015 Jan;9(1):33–40.

73. Anderson NL, Anderson NG. Proteome and proteomics: new technologies,

new concepts, and new words. *Electrophoresis*. 1998 Aug;19(11):1853–61.

74. Barnett M, Young W, Cooney J, Roy N. Metabolomics and Proteomics, and What to Do with All These “Omes”: Insights from Nutrigenomic Investigations in New Zealand. *J Nutr Nutr*. 2014;7(4–6):274–82.

75. Viennois E, Zhao Y, Merlin D. Biomarkers of Inflammatory Bowel Disease: From Classical Laboratory Tools to Personalized Medicine. *Inflamm Bowel Dis*. 2015 Oct;21(10):2467–74.

76. Hong SN, Joung J-G, Bae JS, Lee CS, Koo JS, Park SJ, et al. RNA-seq Reveals Transcriptomic Differences in Inflamed and Noninflamed Intestinal Mucosa of Crohn’s Disease Patients Compared with Normal Mucosa of Healthy Controls. *Inflamm Bowel Dis*. 2017;23(7):1098–108.

77. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2011 Jul 25;11(8):519–31.

78. O’Donoghue AJ, Jin Y, Knudsen GM, Perera NC, Jenne DE, Murphy JE, et al. Global substrate profiling of proteases in human neutrophil extracellular traps reveals consensus motif predominantly contributed by elastase. *PloS One*. 2013;8(9):e75141.

79. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004 Mar 5;303(5663):1532–5.

80. Delgado-Rizo V, Martínez-Guzmán MA, Iñiguez-Gutierrez L, García-Orozco A, Alvarado-Navarro A, Fafutis-Morris M. Neutrophil Extracellular Traps and Its Implications in Inflammation: An Overview. *Front Immunol* [Internet]. 2017 Feb 6 [cited 2019 Sep 28];8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5292617/>
81. Pastorelli L, De Salvo C, Mercado JR, Vecchi M, Pizarro TT. Central Role of the Gut Epithelial Barrier in the Pathogenesis of Chronic Intestinal Inflammation: Lessons Learned from Animal Models and Human Genetics. *Front Immunol* [Internet]. 2013 Sep 17 [cited 2019 Sep 28];4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3775315/>
82. Poulsen NA, Andersen V, Møller JC, Møller HS, Jessen F, Purup S, et al. Comparative analysis of inflamed and non-inflamed colon biopsies reveals strong proteomic inflammation profile in patients with ulcerative colitis. *BMC Gastroenterol*. 2012 Jun 24;12:76.
83. Moriggi M, Pastorelli L, Torretta E, Tontini GE, Capitanio D, Bogetto SF, et al. Contribution of Extracellular Matrix and Signal Mechanotransduction to Epithelial Cell Damage in Inflammatory Bowel Disease Patients: A Proteomic Study. *Proteomics*. 2017 Dec;17(23–24).
84. Shkoda A, Werner T, Daniel H, Gunckel M, Rogler G, Haller D. Differential protein expression profile in the intestinal epithelium from patients with inflammatory bowel disease. *J Proteome Res*. 2007 Mar;6(3):1114–25.

85. Nanni P, Mezzanotte L, Roda G, Caponi A, Levander F, James P, et al. Differential proteomic analysis of HT29 Cl.16E and intestinal epithelial cells by LC ESI/QTOF mass spectrometry. *J Proteomics*. 2009 Jul 21;72(5):865–73.
86. Yau YY, Leong RWL, Pudipeddi A, Redmond D, Wasinger VC. Serological Epithelial Component Proteins Identify Intestinal Complications in Crohn’s Disease. *Mol Cell Proteomics MCP*. 2017 Jul;16(7):1244–57.
87. M’Koma AE, Seeley EH, Washington MK, Schwartz DA, Muldoon RL, Herline AJ, et al. Proteomic Profiling of Mucosal and Submucosal Colonic Tissues Yields Protein Signatures that Differentiate the Inflammatory Colitides. *Inflamm Bowel Dis*. 2011 Apr;17(4):875–83.
88. Seeley EH, Washington MK, Caprioli RM, M’Koma AE. Proteomic Patterns of Colonic Mucosal Tissues Delineate Crohn’s Colitis and Ulcerative Colitis. *Proteomics Clin Appl [Internet]*. 2013 Aug [cited 2019 Sep 28];7(0). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3737405/>
89. Simi M, Leardi S, Tebano MT, Castelli M, Costantini FM, Speranza V. Raised plasma concentrations of platelet factor 4 (PF4) in Crohn’s disease. *Gut*. 1987 Mar;28(3):336–8.
90. Vaiopoulou A, Gazouli M, Papadopoulou A, Anagnostopoulos AK, Karamanolis G, Theodoropoulos GE, et al. Serum protein profiling of adults and children with Crohn’s disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2015 Jan;60(1):42–7.
91. Fiocchi C. Inflammatory Bowel Disease: Complexity and Variability Need

Integration. Front Med. 2018;5:75.