

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE MEDICO-CHIRURGICHE  
GASTROENTEROLOGICHE E DEI TRAPIANTI

Ciclo XXIII

Settore/i scientifico-disciplinare/i di afferenza: Med 12/Med 18

TITOLO TESI

**ESPRESSIONE E RUOLO FUNZIONALE DI  
INTERLEUCHINA-33 E DEL SUO RECETTORE, ST2,  
NELLE MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE  
INTESTINALI**

**Presentata da: Dott. Luca PASTORELLI**

**Coordinatore Dottorato: Chiarissimo Prof. Andrea STELLA**

**Relatore: Chiarissimo Prof. Maurizio VECCHI**

**Correlatore: Chiarissima Prof. Theresa T. PIZARRO**

**Esame finale anno 2011**

# **INDICE**

**pag.**

<b>INTRODUZIONE.....</b>	<b>3</b>
· Le malattie infiammatorie croniche intestinali.....	3
· Famiglia dell'Interleuchina-1 ed Interleuchina-33.....	39
· I modelli animali nello studio delle IBD.....	41
<b>SCOPO DELLO STUDIO.....</b>	<b>45</b>
<b>PAZIENTI E METODI.....</b>	<b>46</b>
<b>RISULTATI.....</b>	<b>55</b>
<b>DISCUSSIONE.....</b>	<b>79</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>85</b>

# **INTRODUZIONE**

## **LE MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI**

Con il termine di *malattie infiammatorie intestinali* o IBD (acronimo dell'inglese "*Inflammatory bowel disease*") si fa riferimento essenzialmente a due quadri nosologici: la malattia di Crohn (CD) e la rettocolite ulcerosa (UC). Tali patologie sono caratterizzate da infiammazione cronica intestinale e da un'eziopatogenesi verosimilmente multifattoriale, anche se non ancora definita con precisione e pertanto considerata idiopatica. Talvolta l'andamento clinico e l'aspetto endoscopico delle lesioni infiammatorie appare talmente sovrapponibile da rendere difficile la diagnosi differenziale tra le due patologie e con altre condizioni infiammatorie intestinali. Accanto a numerosi aspetti comuni la CD e la UC presentano però anche rilevanti differenze che ci permettono di considerarle come entità cliniche distinte.

## **EPIDEMIOLOGIA**

Le IBD non presentano un'incidenza uniforme da un punto di vista geografico. Storicamente considerate patologie a prevalenza maggiore nel mondo occidentale e spesso associate a condizioni socio-economiche più elevate, sembrano annoverare un crescente numero di casi non solo nei paesi in cui tradizionalmente vi era un'incidenza più elevata, ma anche nei paesi in via di sviluppo.

Negli Stati Uniti l'incidenza è stimata attorno ai 10-15.6/casi su 100000 abitanti/anno per la CD e di 6-15.6 /casi su 100000 abitanti/anno per la UC <sup>1</sup>. Gli studi epidemiologici condotti in Europa rivelano un'incidenza di 3.9-7 casi su 100000 abitanti/anno per il CD e di 8.7-11.8 casi/100000 abitanti/anno per la UC. Numerosi studi condotti in passato evidenziavano un'incidenza maggiore delle IBD nei paesi

del Nord Europa rispetto a quelli dell'Europa Meridionale (RR: 1.4 per la UC e RR: 1.8 per il CD). Tale dato è confermato da un'analisi più recente; tuttavia, la differenza di incidenza tra Nord e Sud dell'Europa sembra essere meno rilevante di quanto si credesse in passato <sup>2</sup>. I dati relativi all'Italia mostrano un'incidenza uniforme nel paese con andamento sostanzialmente sovrapponibile ai dati dell'Europa del Nord (incidenza UC: 3.4-10.5/100000/anno; incidenza CD: 1.9-6.6/100000/anno) <sup>1</sup>.

L'età di esordio della malattia è variabile: può comparire in giovane età, con un picco di incidenza tra i 15 ed i 30 anni, oppure manifestarsi tardivamente; esiste infatti un secondo picco di incidenza tra i 60 e gli 80 anni. Diversi studi evidenziano inoltre un aumento dell'incidenza delle IBD in età pediatrica <sup>3</sup>.

La UC non sembra mostrare una diversa incidenza in relazione al sesso; mentre il CD presenta un'incidenza lievemente maggiore nel sesso femminile, probabilmente in relazione a fattori ormonali <sup>4</sup>.

## **EZIOLOGIA E PATOGENESI**

Le IBD sono condizioni cliniche conosciute e studiate da molto tempo; tuttavia la loro eziologia non è stata ancora definita precisamente ed è considerata multifattoriale. Si è concordi nel sostenere che vi sia una **suscettibilità genetica** per lo sviluppo della malattia. Pertanto, in individui geneticamente predisposti, sia fattori esogeni (antigeni specifici, batteri endoluminali o fattori ambientali come il fumo), che fattori dell'ospite (alterazioni della funzione di barriera intestinale) possono favorire un'attivazione del sistema immunitario che determina uno stato di infiammazione cronica.

La predisposizione genetica allo sviluppo delle IBD è stata supportata dagli studi epidemiologici condotti su famiglie e gemelli e dall'individuazione di specifici loci genici. Il rischio di sviluppare la malattia è significativamente aumentato negli

individui con un parente di primo grado affetto da IBD. In effetti, la storia familiare positiva per IBD è considerata il più forte fattore di rischio per il loro sviluppo. Inoltre, studi condotti su gemelli monozigoti dimostrano una concordanza del 35% per lo sviluppo di CD e del 16% per la UC <sup>5</sup>.

L'ereditarietà nelle IBD è sicuramente multigenica. Da tempo si ipotizzava l'esistenza di regioni cromosomiche associate ad una maggiore suscettibilità per lo sviluppo di IBD. Tali regioni vennero definite come IBD1 (cromosoma 16q), IBD2 (12q), IBD3 (6p), IBD4 (14q), IBD5 (5q), IBD6 (19p) e IBD7 (1p). Solo nel 2001 è avvenuta l'identificazione del primo locus genico da parte di due gruppi di ricercatori, uno francese e uno statunitense, che hanno condotto lo studio in modo indipendente, ma che sono approdati a conclusioni simili. Il gene identificato è NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain 2) localizzato sul braccio lungo del cromosoma 16 nella regione precedentemente individuata con il termine di IBD 1 <sup>6, 7</sup>. Tale gene, attualmente definito anche CARD15 (caspase activation recruitment domain 15), presenta una chiara associazione con il CD, ma non con la UC. NOD2/CARD15 codifica per una proteina recettoriale intracellulare in grado di riconoscere prodotti di degradazione di componenti della parete batterica, in particolare il muramil dipeptide che è presente sia nei batteri Gram positivi che in quelli Gram negativi. Si conoscono tre mutazioni principali che interessano il dominio ricco in leucine della molecola e che interferiscono con la funzione genica. Si pensa che la perdita della funzione di NOD2/CARD15 conduca ad un'alterata risposta dell'immunità innata verso i batteri e che favorisca un'inappropriata attivazione del sistema NF-κB con una flogosi incontrollata. Un polimorfismo nel gene NOD2/CARD15 è maggiormente associato con una localizzazione ileale del CD <sup>8</sup>.

Gli studi condotti sul genoma hanno evidenziato una seconda regione genica le cui mutazioni sono associate ad una maggiore suscettibilità per lo sviluppo delle

IBD. Si tratta della regione IBD3 localizzata sul braccio corto del cromosoma 6 e contenente i geni che codificano per gli antigeni del sistema HLA (human leukocyte antigen) e per il Tumor Necrosis Factor alpha (TNF $\alpha$ ).L'associazione più significativa tra IBD e HLA sembra riguardare l'HLA DRB1(0103) e la colite di Crohn o una forma severa di UC pancolica<sup>9</sup>.

Per quanto riguarda i polimorfismi del gene del TNF $\alpha$ , ne sono stati identificati molteplici; è stata studiata in particolare la regione promoter di tale gene, ma non è stata individuata una mutazione precisa che correli con lo sviluppo di IBD. Tuttavia, in considerazione del ruolo cardine del TNF $\alpha$  nella patogenesi della flogosi cronica delle IBD è verosimile pensare che mutazioni a suo carico siano implicate nella suscettibilità alla malattia<sup>10</sup>.

Sono stati studiati inoltre i polimorfismi del gene MDR1 (multidrug resistance 1) sul braccio lungo del cromosoma 7. La proteina codificata da tale gene è una glicoproteina di membrana espressa sulla superficie epiteliale delle cellule della mucosa del colon. Una sua variante è associata allo sviluppo e al fenotipo della colite ulcerosa<sup>11</sup>.

Inoltre numerosi studi hanno mostrato una correlazione tra lo sviluppo della malattia di Crohn ed alcuni polimorfismi del gene che codifica per il recettore dell'interleuchina 23 (IL-23R)<sup>12, 13</sup> e del gene ATG16L1 (autophagy gene)<sup>14, 15</sup>: la perdita di funzione di quest'ultimo gene determinerebbe un'aberrante produzione di IL1 $\beta$  in risposta alle endotossine batteriche. L'"autofagia" è il processo fisiologico nel quale le cellule degradano componenti subcellulari; in condizioni patologiche tale processo aumenterebbe notevolmente<sup>16, 17</sup>.

Gli studi condotti in merito alla regione genica IBD5 hanno individuato due geni che sono associati allo sviluppo di IBD. Si tratta dei geni OCTN 1 e 2 (Organic Cation Transporter genes) che codificano per proteine carriers. I polimorfismi a carico di tali

geni sembrano essere associati ad una maggiore suscettibilità sia per il CD che la UC. La regione genica identificata con IBD5 contiene numerosi loci genici; non è escluso quindi che ci possano essere, al suo interno, altri geni correlati all'insorgenza delle IBD <sup>18, 19</sup>.

Infine sono stati studiati i polimorfismi del gene DLG5 (discs large homolog 5) che è localizzato sul cromosoma 10 e che codifica per una proteina strutturale coinvolta nel mantenimento dell'integrità epiteliale. E' stata evidenziata una maggiore suscettibilità per le IBD soprattutto nei pazienti che presentano anche la variante mutata del gene CARD15 <sup>20</sup>.

Accanto agli studi volti ad individuare una suscettibilità genetica nelle IBD è stato approfondito il ruolo di alcuni **fattori ambientali**. Innanzitutto è stato ipotizzato che le IBD potessero avere un'eziologia infettiva. In realtà tale ipotesi venne postulata già nel 1913, anno in cui venne descritta per la prima volta la condizione clinica che ha successivamente assunto il nome di CD <sup>21</sup>. Molti microrganismi sono stati studiati come possibili fattori eziologici nelle IBD, tuttavia è poco probabile che esse siano dei processi infettivi veri e propri. Appare molto più verosimile l'ipotesi secondo la quale un agente infettivo potrebbe modificare una condizione di omeostasi a livello intestinale, favorendo l'insorgenza della malattia in individui geneticamente predisposti <sup>22</sup>.

In effetti livello della mucosa intestinale vige un equilibrio costante tra il mantenimento di un rapporto simbiotico con numerose specie batteriche da un lato e l'attivazione di una risposta immunitaria nei confronti dei microrganismi patogeni dall'altro. Un'alterazione di questo equilibrio tra la flora commensale e quella patogena viene definita con il termine di "disbiosi" e sembra avere un ruolo centrale nella patogenesi delle IBD <sup>23</sup>.

Il *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP) è stato considerato come un

possibile agente eziologico del CD fin dall'iniziale descrizione del quadro clinico. Questo perché l'infezione da MAP determina a livello della mucosa intestinale bovina uno stato di infiammazione cronica a carattere granulomatoso molto simile a quella del CD. Nonostante ciò ci sono pareri contrastanti, e prevalentemente negativi, in merito al suo ruolo nella patogenesi delle IBD<sup>24, 25</sup>.

Sono state studiate numerose specie di *Helicobacter*, in particolare *H. hepaticus* e *H. bilis*. Uno studio ha dimostrato una riduzione delle specie batteriche commensali in risposta all'infezione con *H. bilis* e l'insorgenza di una risposta immunitaria IgG-mediata prima dello sviluppo di una colite da infezione da *H. bilis*<sup>26</sup>. Questo riscontro dà maggiore credibilità all'ipotesi della disbiosi trattata in precedenza. Tuttavia quale sia esattamente il ruolo degli *Helicobacter non pylori* nella patogenesi delle IBD è ancora da definire.

Un terzo batterio che è stato studiato più recentemente è un'*Escherichia coli* in seguito all'osservazione che il ceppo del microrganismo isolato nei pazienti affetti da CD ha delle proprietà di adesione alle cellule della mucosa intestinale molto maggiori rispetto ai ceppi di *E. coli* riscontrati negli individui-controllo. Questi microrganismi sono stati definiti *E. coli* adherent-invasive (AIEC) ed hanno la proprietà di invadere anche le cellule macrofagiche inducendo un aumento di produzione di TNF $\alpha$ , citochina "chiave" dell'infiammazione delle IBD<sup>27, 28</sup>.

Alcuni studi riportano un aumento del rischio di sviluppare una malattia infiammatoria intestinale in seguito ad un episodio di gastroenterite acuta (OR: 1.54 per CD; OR: 1.36 per UC). Gli agenti eziologici delle gastroenteriti che maggiormente sembrano essere associati sono il *Campylobacter* e la *Salmonella* spp.; tuttavia il loro ruolo rimane da definire precisamente<sup>29</sup>.

Accanto agli studi condotti sulle specie batteriche ne sono stati proposti numerosi in merito al ruolo di specie virali o fungine. Sembra che alcuni virus siano

primariamente implicati nella malattia: in particolare si tratta delle infezioni da Citomegalovirus, virus di Epstein-Barr, Parvovirus B19 e Norovirus<sup>30, 31</sup>. L'infezione da virus del morbillo, appartenente alla famiglia dei Paramyxovirus, è stata spesso presa in considerazione; la teoria dell'associazione delle due patologie è tuttavia controversa<sup>32</sup>.

Tra i fattori ambientali è stata associata allo sviluppo di queste malattie, in modo particolare per la UC, anche una *dieta* caratterizzata da aumentata assunzione di zuccheri raffinati e di grassi insaturi<sup>33</sup>, così come l'uso di farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS). Il ruolo di questi ultimi è ampiamente dibattuto. E' probabile che l'inibizione dell'enzima ciclossigenasi, inducendo una diminuzione dei livelli di prostaglandine e favorendo un aumento della permeabilità vascolare, sia alla base della ripresa di attività della malattia cui si assiste talvolta in seguito all'assunzione di FANS<sup>34</sup>. Infine, il *fumo di sigaretta* sembra essere correlato allo stato infiammatorio del CD. Al contrario tale effetto non è stato evidenziato per la rettocolite ulcerosa, dove anzi è ben evidente un effetto protettivo del fumo sia sullo sviluppo che sull'andamento della malattia<sup>35</sup>.

Trattando della patogenesi delle IBD è indispensabile considerare il ruolo del **sistema immunitario** dell'individuo. Come accennato in precedenza a livello della mucosa intestinale c'è un costante equilibrio tra la risposta verso i microrganismi patogeni e la tolleranza nei confronti della flora intestinale e di quegli antigeni che giungono a livello del lume intestinale per assunzione orale. Nell'induzione della tolleranza orale sarebbero coinvolti multipli meccanismi, come l'anergia di cellule T antigene-reattive o la produzione da parte dei linfociti CD4+ di alcune citochine inibitorie sull'infiammazione intestinale come l'interleuchina 10 (IL-10) e il transforming growth factor beta (TGF $\beta$ ). Sembra che tale meccanismo di soppressione della risposta contro gli antigeni luminali sia alterato nelle IBD, condizionando

un'inflammation incontrollata <sup>36</sup>. I meccanismi che regolano questa tolleranza rimangono in larga parte sconosciuti. Tuttavia, alcuni studi condotti su topi knockout hanno dimostrato che eliminando specifiche citochine (come IL-10 e TGF $\beta$ ) o i loro recettori, si induce la comparsa di colite <sup>37, 38</sup>.

Durante la fase di attività della malattia sia a livello della parete intestinale, che a livello sierico, si riscontrano linfociti T CD4+ in grado di secernere citochine infiammatorie che attivano altre cellule dell'inflammation (macrofagi e linfociti B) e agiscono indirettamente reclutando altri linfociti attraverso le interazioni tra i recettori situati sui leucociti (come l'integrina  $\alpha 4\beta 7$ ) e sull'endotelio vascolare (MadCAM1). I linfociti T CD4+ possono essere suddivisi in due sottogruppi principali: i Th1 che producono soprattutto interferone gamma (IFN $\gamma$ ) e fattore di necrosi tumorale (TNF) e i Th 2 con produzione elettiva di IL-4, IL-5 e IL-13. Sembra che le cellule Th1 inducano un'inflammation granulomatosa transmurale simile a quella del CD, mentre le cellule Th2 determinino un'inflammation mucosa superficiale, tipica della UC <sup>39</sup>. Una volta sviluppata la malattia si assiste al perpetuarsi dello stato infiammatorio in funzione della presenza delle principali citochine dell'inflammation: IL-1, IL-6 e TNF $\alpha$ . Queste ultime, normalmente prodotte in risposta ad un'infezione, hanno diversi effetti sui tessuti: favoriscono l'attivazione dei fibroblasti e la produzione di collagene, attivano le metallo-proteasi a livello intestinale e interagiscono con il sistema della coagulazione favorendo un aumento localizzato del fattore di von Willebrand <sup>40</sup>. Risulta pertanto chiaro come farmaci diretti contro queste molecole (come gli anticorpi anti TNF $\alpha$ ) possano avere un ruolo importante nello "spegnimento" dei segnali infiammatori.

## **PRESENTAZIONE CLINICA E DECORSO**

### ***MALATTIA DI CROHN***

Il CD può manifestarsi a qualsiasi livello del canale alimentare, dalla bocca all'ano. L'interessamento è a carattere segmentario e trasmurale; le lesioni possono essere prevalentemente di tipo fibrostenosante, fistolizzante o infiammatorio. Da ciò si deduce che la malattia ha un'eterogeneità assai elevata, condizionando quadri clinici anche molto differenti. E'altresì vero che le localizzazioni a livello del cavo orale, dell'esofago e dello stomaco sono molto rare. Il 30% dei pazienti presenta una malattia che interessa esclusivamente il piccolo intestino, il 30% ha anche una localizzazione colica e il 30% solo una localizzazione colica, configurando il quadro di colite di Crohn <sup>40</sup>. Quando è interessato l'ileo spesso è coinvolta l'ansa terminale. A differenza della UC il retto non è sempre interessato <sup>41, 42</sup>.

### **Clinica**

In un'esigua percentuale di casi la malattia si manifesta in modo improvviso, mimando il quadro di un'appendicite acuta. Talvolta, le manifestazioni extra-intestinali possono comparire prima dell'esordio della malattia. Tuttavia nella maggior parte dei casi si assiste ad un "periodo prodromico" con sintomi caratteristici ma aspecifici come episodi di addominalgie ricorrenti, alterazioni dell'alvo e calo ponderale. Ciò può comportare un considerevole ritardo nella diagnosi. Con il passare del tempo la sintomatologia si acuisce, in relazione all'estensione e alla localizzazione della malattia. I sintomi più comuni sono il dolore addominale e la diarrea. Il dolore addominale ricorrente è frequente in sede mesogastrica e in fossa iliaca destra per l'interessamento dell'ileo terminale; in presenza di lesioni stenose il dolore ha carattere crampiforme perché secondario all'ostacolo al transito

intestinale e alla distensione delle anse a monte del tratto stenotico; se la manifestazione della malattia è soprattutto infiammatoria il dolore può essere continuo, soprattutto pre-evacuativo. La diarrea è un altro sintomo cardine; è secondaria alla presenza delle lesioni che possono comportare malassorbimento e alterazione nel circolo entero-epatico dei sali biliari per interessamento dell'ultima ansa ileale. Quando sono presenti lesioni a livello del retto-sigma è possibile la comparsa di una diarrea muco-ematica e tenesmo, anche se queste manifestazioni sono più caratteristiche della UC.

Durante la fase di attività della malattia si assiste alla presenza di febbricola e ad un calo ponderale se la diarrea ed il malassorbimento sono cospicui.

Quando la malattia interessa l'esofago o lo stomaco si manifesta con disturbi dispeptici, nausea, vomito e dolori riferiti in sede epigastrica <sup>43</sup>. La comparsa del vomito può essere associata anche ad episodi subocclusivi in pazienti con una malattia stenotante a livello ileo-colico.

La malattia perianale è un'altra delle possibili localizzazioni del CD. Si manifesta con iperemia ed edema della cute, ulcere superficiali, ragadi, stenosi fibrotica del canale anale, fistole ed ascessi perianali recidivanti. Il coinvolgimento perianale è spesso preceduto da una localizzazione rettale della malattia; solo raramente è presente alla diagnosi. In presenza della localizzazione perianale la malattia ha generalmente un andamento più severo <sup>44</sup>.

Il decorso della malattia è tipicamente cronico ricorrente, con periodi di riacutizzazioni alternati a periodi di remissione. L'evoluzione può essere quella di una malattia fistolizzante o fibrostenotante. Nel primo caso si assiste alla formazione di tragitti fistolosi a testimonianza del carattere transparietale dell'infiammazione. Accanto alle già menzionate fistole perianali, è possibile la formazione di fistole entero-enteriche o di tragitti fistolosi con organi adiacenti, come nel caso delle fistole

entero-vescicali o entero-ureterali o retto-vaginali. Infine, seppur raramente e soprattutto in fase post-chirurgica, si possono presentare fistole entero-cutanee con gemizio di materiale fecaloide o enterico verso la superficie cutanea. La probabilità di formazione di raccolte ascessuali è decisamente maggiore in questa forma della malattia. Inoltre è possibile un coinvolgimento del mesentere con predisposizione allo sviluppo di aderenze tra le anse intestinali <sup>45</sup>.

Quando la malattia si presenta sotto la forma fibrostenotica si assiste ad un restringimento del lume del viscere nelle sedi interessate dalla malattia. Tale ispessimento parietale può verificarsi a qualsiasi livello del tratto gastroenterico ed essere associato sia allo stato infiammatorio durante la fase di attività della malattia, sia all'aumento di deposizione di fibre collagene da parte dei fibroblasti. L'entità della sintomatologia è in relazione al calibro luminale residuo. Quando quest'ultimo è marcatamente ridotto si ha un'ostruzione parziale con dilatazione delle anse a monte della stenosi che comporta la comparsa di addominalgie ad andamento colico, episodi di vomito e meteorismo. L'ostruzione può evolvere e divenire totale configurando il quadro di un'occlusione intestinale vera e propria <sup>46</sup>.

Al fine di valutare da un punto di vista clinico l'andamento e la fase di attività della malattia sono stati elaborati alcuni indici clinici. Il più noto ed utilizzato è il CDAI (Crohn's Disease Activity Index) che prende in considerazione una serie di sintomi riferiti dal paziente, relativi alla settimana precedente alla visita, ed alcuni dati degli esami ematochimici. Ad ogni parametro viene assegnato un punteggio che è moltiplicato per uno specifico fattore di moltiplicazione. Il punteggio totale offre un'indicazione sull'attività della malattia: un valore inferiore a 150 è generalmente associato allo stato di quiescenza della malattia; viceversa al di sopra di tale valore si parla di malattia in stato attivo <sup>47</sup> (tabella I).

**Tabella I: Clinical Disease Activity Index (CDAI).**

	Giorni							Σ	Fattore di correzione	
	1	2	3	4	5	6	7			
<b>Numero di scariche liquide o semiliquide</b>									x 2	
<b>Dolore addominale</b>										
0= non dolore									x 5	
1= dolore lieve										
2= dolore moderato										
3=dolore intenso										
<b>Soggettività generale</b>										
0= bene									x 7	
1= poco bene										
2= male										
3= molto male										
4= terribile										
<b>Numero di reperti tra:</b> artrite, artralgie, irite, uveite, eritema nodoso, ipoderma gangrenoso, stomatite aftosa, ragadi, fistole o ascessi anali, febbre>37°Cnell'ultima sett.									x 20	
<b>Uso di farmaci antidiarroici</b>										
0= no									x 30	
1= si										
<b>Massa addominale</b>										
0= no									x 10	
1= dubbia										
2= si										
<b>Ematocrito</b>										
Uomini= 47-Ht paziente									x 6	
Donne= 42-Ht paziente										
<b>Peso corporeo</b>										
% di variazione rispetto al peso standard									x 1	
									<b>CDAI</b>	...

## **Quadro endoscopico**

L'aspetto endoscopico delle lesioni è molto variabile da individuo ad individuo e varia nello stesso soggetto in relazione alla fase di quiescenza o di attività della malattia. Un aspetto specifico è la segmentarietà delle lesioni; si parla di "skip lesions": si osservano pertanto aree di mucosa interessate dalla flogosi alternate ad aree macroscopicamente indenni. L'ileocolonscopia è l'esame che meglio documenta l'aspetto della mucosa a livello dell'ileo terminale e del colon. L'EGDS viene eseguita nel caso si sospetti una localizzazione della malattia nella porzione prossimale del tratto gastroenterico e, nel caso di malattia con sospetta localizzazione ileale, possono essere utili la entero-TC e entero-RM, oltre alla enteroscopia con videocapsula.

Se la malattia è in uno stato di attività endoscopicamente lieve si riscontrano delle piccole lesioni definite "aftoidi" nel contesto di una mucosa che può apparire indenne dalla malattia. Tali lesioni possono evolvere in vere e proprie ulcere che possono essere lineari, serpiginose o talvolta ad aspetto stellato e che difficilmente interessano l'intera circonferenza luminale; la mucosa perilesionale può presentare edema ed iperemia. Un quadro endoscopico peculiare della malattia è l'aspetto della mucosa ad "acciottolato" dovuto alla presenza di ulcere serpiginose, poste longitudinalmente e trasversalmente, fraposte ad aree di mucosa iperemica ed edematosa. Qualora ci sia un coinvolgimento dell'ultima ansa ileale si può escludere la diagnosi di UC. Quando la malattia si presenta invece come una pancolite di Crohn non è sempre facilmente differenziabile dalla UC. Va ricordato tuttavia che generalmente la mucosa del retto è macroscopicamente risparmiata dal processo infiammatorio <sup>48</sup>.

## **Istologia**

I prelievi biotici eseguiti in sede endoscopica forniscono informazioni relative agli strati superficiali della parete del viscere. Poiché l'infiammazione della malattia di Crohn è transmurale i reperti istologici delle biopsie possono fornire informazioni parziali rispetto allo stato della parete. Una lesione istologica tipica della malattia è *l'infiammazione della mucosa* con un'infiltrazione locale di granulociti neutrofili; inizialmente l'infiltrato è localizzato a livello di singole cripte, si parla pertanto di *criptite*. L'evoluzione può essere quella di un ascesso criptico. Un segno istopatologico peculiare della malattia di Crohn è il riscontro di *granulomi epitelioidi*: si tratta di lesioni non necrotizzanti, difficilmente riscontrabili nei reperti biotici, ma, quando presenti, praticamente patognomoniche della malattia ed associate ad un andamento clinico più severo. I granulomi epitelioidi possono essere individuati anche in aree di mucosa che appaiono non interessate dalla malattia da un punto di vista macroscopico<sup>49</sup>. Infine, il danno cronico esplicito dall'infiammazione determina un'atrofia progressiva, soprattutto a livello della mucosa del colon.

## **Decorso**

Il decorso è tipicamente cronico e recidivante, caratterizzato da periodi di acuzie della malattia seguiti da periodi di remissione. C'è un'ampia variabilità interindividuale per quanto riguarda la severità. Talvolta si assiste ad un andamento lieve della malattia con infrequenti episodi di riacutizzazione. E' tuttavia molto più comune un andamento moderato con 1 o 2 episodi all'anno di riacutizzazione o un decorso severo con la comparsa di complicanze in fase di acuzie della malattia. Uno studio osservazionale rivela che nei primi sette anni di malattia il 20% dei pazienti riporta almeno un episodio all'anno di ripresa sintomatologica della malattia, mentre il 67% ha meno di una riacutizzazione all'anno. Generalmente si assiste ad un decorso

più severo quando l'esordio è avvenuto in giovane età oppure qualora esista una familiarità per IBD. E' stato osservato che il rischio di ospedalizzazione per questi pazienti è nell'ordine del 20% annuo<sup>50</sup>. Da un punto di vista clinico la manifestazione della malattia a livello perianale è spesso associata ad una maggiore severità della condizione.

Durante le fasi di acuzie è possibile l'estensione della malattia a regioni di mucosa precedentemente non coinvolte dalla malattia; uno studio osservazionale ha evidenziato che in circa il 60% dei pazienti ci sarebbe un'estensione della malattia nei primi nove anni dall'esordio<sup>41</sup>. La ripresa di attività di malattia può determinare anche l'insorgenza di complicanze che necessitano di un intervento chirurgico, come la comparsa di stenosi serrate che portano ad un quadro di occlusione intestinale. Quasi la metà dei pazienti necessita di un approccio chirurgico nei primi 10 anni dalla diagnosi<sup>51</sup>. Nel caso di resezione chirurgica è frequente la successiva ricomparsa della malattia in corrispondenza dell'anastomosi; diversi studi evidenziano un rischio di riattivazione della malattia che va dal 44 al 55% entro i primi dieci anni dall'intervento chirurgico<sup>41, 52</sup>. Per tale motivo l'approccio chirurgico per la MC deve essere praticato solo nel momento in cui non si può avere alcuna efficacia con la terapia medica.

In alcuni pazienti possono comparire sintomi extraintestinali della malattia; questi ultimi verranno descritti in seguito.

E' rilevante ricordare che non c'è sempre una stretta correlazione fra la ripresa endoscopica della malattia e il quadro sintomatologico; in effetti gli indici di attività di malattia, come il CDAI, non sempre trovano un esatto corrispettivo nell'aspetto endoscopico.

Il CD sembra essere associata ad un maggior rischio di sviluppo di neoplasie nel tratto gastroenterico, soprattutto adenocarcinomi a livello del colon. Il rischio

relativo sembra essere molto basso, ma una adeguata sorveglianza endoscopica è necessaria in questi pazienti <sup>53</sup>. Uno studio molto recente ha individuato l'associazione tra un polimorfismo genico, in particolare la delezione del gene DP1L1 (deleted in polyposis 1-like1) che si comporterebbe da "tumor soppressore", e l'insorgenza di carcinomi a livello del colon in pazienti affetti da IBD <sup>54</sup>. Sono stati riportati anche rari casi di carcinomi squamo-cellulari a livello del canale anale in pazienti affetti da malattia perianale <sup>55</sup> e neoplasie ematologiche.

## **RETTOCOLITE ULCEROSA**

La rettocolite ulcerosa è una malattia della mucosa che interessa solitamente il retto e si estende, senza soluzione di continuo, alla mucosa del colon con un interessamento parziale o totale. In circa il 25-55% dei casi la malattia è limitata al retto e al sigma, nel 30-40% dei casi si estende oltre il sigma e nel 20% dei casi si manifesta come una pancolite <sup>56</sup>. Quando è interessato tutto il colon l'infiammazione può estendersi fino agli ultimi 1-2 cm di ileo terminale e questa viene definita come "ileite da reflusso", che peraltro presenta scarso significato clinico.

### **Clinica**

La malattia può esordire acutamente, mimando il quadro di una colite infettiva, oppure progressivamente. In quest'ultimo caso i pazienti riferiscono una sintomatologia intestinale che dura da tempo, caratterizzata da episodi di diarrea, proctorragia ed addominalgie che possono essere intermittenti e di entità modesta. La manifestazione clinica più tipica della UC è la comparsa di frequenti scariche di diarrea muco-ematica, associate a dolori addominali.

L'entità della sintomatologia non è necessariamente in relazione all'estensione

quanto più allo stato di attività della malattia. I pazienti affetti da procto-sigmoidite riferiscono generalmente che le feci sono di consistenza normale o diminuita con evidenza di sangue rosso vivo o di strie ematiche e talvolta di muco. Se la malattia si estende oltre il sigma è tipica una diminuzione della consistenza delle feci che risultano frammiste al sangue e la presenza di dolore addominale riferito soprattutto in fossa iliaca sinistra. Durante le riacutizzazioni della malattia la frequenza delle evacuazioni può aumentare in modo considerevole; possono comparire altri sintomi quali tenesmo, urgenza evacuativa e talvolta incontinenza. Solo in rare occasioni le feci sono esclusivamente liquide con sangue e pus. I sintomi permangono generalmente anche durante la notte.

In circa il 15% dei pazienti la UC si manifesta in modo molto grave a partire dall'esordio con un sanguinamento massivo oppure con la comparsa di *megacolon tossico*. Questa condizione è caratterizzata da una distensione del colon con diametro superiore a 5-6 cm a livello del colon traverso e perdita delle anastomosi. Si tratta di una condizione rara, con un'incidenza di 1-2.5% nei pazienti affetti da UC, ma che deve essere tempestivamente diagnosticata e trattata. Sebbene non sia noto l'esatto meccanismo patogenetico, si ritiene che l'estensione dell'infiammazione oltre la mucosa consente ai mediatori dell'infiammazione di avere un contatto diretto con le terminazioni nervose dei plessi, arrivando a stimolare le fibre nervose intramurali della parete colica ed inducendo un riflesso nervoso inibitorio adrenergico che comporta la dilatazione del viscere<sup>57</sup>. Si tratta di una complicanza temibile che può essere trattata con terapia medica in prima istanza; nel caso in cui ci sia una progressiva dilatazione, un sanguinamento massivo o la perforazione del viscere c'è un'indicazione assoluta alla colectomia. In considerazione dell'elevata mortalità in caso di perforazione intestinale alcuni autori sostengono l'opportunità di una colectomia ogni qualvolta si faccia diagnosi di megacolon tossico. Tale approccio è

giudicato da altri eccessivamente aggressivo; pertanto l'esatto "timing chirurgico" per il megacolon tossico non è definito con esattezza <sup>58</sup>.

La comparsa di tratti stenotici e di lesioni perianali si verificano eccezionalmente. Il riscontro di tali reperti deve far sospettare una malattia di Crohn.

Come per la malattia di Crohn, anche per la UC sono stati elaborati degli indici di gravità. Tra questi va menzionata la classificazione di Truelove e Witts che, tenendo conto di dati clinici e biumorali, classifica la malattia come lieve, moderata o severa (Tabella II). La malattia ad attività moderata presenta un quadro intermedio tra quella lieve e quella severa. Un altro indice proposto più recentemente è il *Disease Activity Index* (DAI) basato su parametri clinici ed endoscopici; consente di valutare la gravità della malattia e di valutarne l'evoluzione (Tabella III).

	<b>Attività lieve</b>	<b>Attività moderata</b>	<b>Attività severa</b>
<b>Numero di evacuazioni giornaliere</b>	<4	4-6	>6
<b>Temperatura ascellare in almeno 2 degli ultimi 4 giorni</b>	Normale	<37,5° C	>37,5° C
<b>Frequenza cardiaca</b>	Normale	< 90 bpm	> 90 bpm
<b>Emoglobina</b>	Normale	> 75% dei valori normali	< 75% dei valori normali
<b>VES</b>	< 30 mm/h	> 30 mm/h	> 50 mm/h

**Tabella II: Indice di Truelove e Witts**

<b>Numero di scariche settimanali</b>	<b>Valore</b>
0 = <18	
1 = 18-35	
2 = 36-60	
3 = >60	
3=dolore intenso	
<b>Sangue nelle feci</b>	
0= assente	
2= modico	
4= abbondante	
<b>Valutazione dello stato del paziente</b>	
0= ottimale	
1= nella norma	
2= deteriorato	
3= molto deteriorato	
<b>Dolore/crampi addominali</b>	
0= assenti	
1= lievi	
2= moderati	
3= intensi	
<b>Temp corporea dovuta alla colite</b>	
0= <38°C	
3= >38°C	
<b>Manifestazioni extraintestinali</b>	
3= irite	
3= eritema nodoso	
3= artrite	
<b>Esami di laboratorio</b>	
0= VES< 50 mm/h	
1= VES: 50-100 mm/h	
2= VES> 100 mm/h	
<b>Emoglobina</b>	
0= >10g/dl	
4= <10g/dl	
<b>TOTALE</b>	

**Tabella III: Indice di Attività Clinica per la Rettocolite Ulcerosa**

### **Quadro endoscopico**

L'aspetto endoscopico è in relazione all'estensione ad allo stato di attività della malattia. Nella UC l'interessamento infiammatorio è a carico della mucosa. I segni che compaiono più precocemente sono la perdita del reticolo vascolare con edema ed iperemia. Quando il grado di infiammazione aumenta, l'edema diventa più

marcato e la mucosa acquisisce un aspetto granulare: diviene fragile e va incontro più facilmente a sanguinamento a contatto con l'endoscopio. Possono essere presenti delle erosioni o ulcerazioni multiple che, negli stati di maggiore severità, vanno incontro a sanguinamento spontaneo <sup>59</sup>. A differenza delle lesioni del CD, le ulcere della UC si localizzano su una mucosa microscopicamente infiammata. Soprattutto nelle malattie di lunga durata è possibile il riscontro di pseudopolipi di natura infiammatoria; meno frequenti sono i polipi adenomatosi e ancor meno quelli carcinomatosi <sup>60</sup>.

Le alterazioni endoscopiche sono generalmente più severe a livello del retto dove è interessato il lume in modo circonfrenziale senza aree di mucosa indenne. Quando la malattia è in fase cronica asintomatica o di remissione una progressiva atrofia della mucosa determina un appiattimento della superficie luminale ed un assottigliamento della mucosa stessa <sup>59</sup>.

### **Istologia**

Le alterazioni della mucosa nella UC sono, in linea di massima, simili a quelle del CD colico, con infiammazione e danno cronico. Inizialmente è presente un infiltrato infiammatorio diffuso a livello della lamina propria e rappresentato soprattutto da granulociti neutrofili, linfociti, plasmacellule e macrofagi. I granulociti neutrofili migrano dal torrente circolatorio verso lo strato epiteliale dove vanno ad interessare le cripte con un quadro di criptite che può evolvere nella formazione di ascessi criptici. La criptite si associa ad una aumentata secrezione mucosa da parte delle cellule caliciformi mucipare e ad un maggiore turnover cellulare. A differenza del CD non si individuano in genere granulomi epitelioidi.

I reperti istologici descritti sono aspecifici e possono essere evidenziati in corso di coliti di altra eziologia. Tuttavia i reperti che suggeriscono la cronicità del

processo, come la distorsione e l'atrofia delle cripte e la presenza di un infiltrato infiammatorio cronico, possono fare propendere per la diagnosi di UC <sup>40</sup>.

### **Decorso**

La UC è una malattia tipicamente ricorrente caratterizzata da riacutizzazioni che possono durare anche alcune settimane, recidivando dopo un intervallo asintomatico di durata variabile da poche settimane a molti anni. La gravità delle manifestazioni è spesso correlata all'estensione dell'infiammazione: i pazienti con una colite estesa o totale hanno maggiore probabilità di avere una ripresa di attività clinica più severa rispetto ai pazienti con una malattia limitata al retto-sigma. Anche il ricorso alla chirurgia è maggiore nei casi da malattia estesa. Uno studio osservazionale, condotto su un periodo di 10 anni, ha mostrato che in meno del 10% dei pazienti è necessario un approccio chirurgico <sup>61</sup>. Come per il CD possono comparire manifestazioni extra-intestinali.

Un importante aspetto da considerare è che la flogosi cronica predispone allo sviluppo di displasia ed aumenta il rischio di neoplasia coloretale con una prevalenza di neoplasia nei pazienti affetti da UC di 3.5% <sup>62</sup>. A differenza della sequenza adenoma-carcinoma osservabile nelle forme di carcinoma coloretale sporadico, che di solito origina su una lesione polipoide, nella UC la displasia può insorgere su mucosa piatta e presentarsi come displasia a basso o alto grado. In realtà esiste anche la possibilità che la displasia insorga nell'ambito di lesioni polipoidi, in tal caso si identifica con l'acronimo DALM (Displasia-Associated Lesion or Mass) e va distinta dalle lesioni presenti nella UC quali gli pseudopolipi o i polipi adenomatosi <sup>63</sup>.

I pazienti che hanno un rischio aumentato di sviluppare una neoplasia sono coloro che hanno avuto un esordio precoce della malattia, con una lunga storia di

malattia e con un interessamento esteso del colon. Il rischio è aumentato anche nei pazienti affetti da colangite sclerosante e che presentano una familiarità per cancro del colon<sup>64</sup>. Poiché il cancro del colon insorge generalmente su mucosa displastica è consigliabile eseguire controlli endoscopici regolari nel tempo con campionamento bioptico multiplo al fine di individuare il più precocemente possibile la presenza di lesioni precancerose<sup>65</sup>.

## **MANIFESTAZIONI EXTRAINTESTINALI**

Le IBD possono essere complicate dalla comparsa di manifestazioni extraintestinali. Tali complicanze della malattia si manifestano nel 6.2% dei pazienti; solo in un'esigua percentuale di pazienti si assiste a multiple manifestazioni extraintestinali<sup>66</sup>. Secondo altri autori l'incidenza sarebbe molto più elevata<sup>67</sup>. La loro comparsa può precedere o accompagnare l'esordio della malattia; tuttavia esse possono anche comparire dopo una lunga storia di malattia. Alcune manifestazioni sono strettamente associate all'attività infiammatoria della malattia a livello intestinale, mentre altre acquisiscono un andamento indipendente.

Le sedi più frequentemente interessate sono le articolazioni, la cute, le vie biliari, l'occhio e l'apparato scheletrico; possono comparire anche delle alterazioni ematologiche. La maggior parte delle manifestazioni extraintestinali è osservata nei pazienti con localizzazione colica estesa della malattia infiammatoria<sup>68</sup>.

### **Manifestazioni muscoloscheletriche**

Le manifestazioni muscoloscheletriche sono le più comuni complicanze extraintestinali delle IBD. Sono state descritte diverse forme di coinvolgimento articolare. Si può assistere infatti all'insorgenza di un'*artropatia periferica* che è

un'artrite migrante, non erosiva e non deformante che coinvolge prevalentemente l'articolazione del ginocchio e della caviglia in modo asimmetrico <sup>69</sup>. Secondo alcuni autori esisterebbero due forme di artropatia periferica: una "pauciarticolare" (coinvolgimento di 5 articolazioni al massimo) strettamente correlata all'attività della malattia a livello intestinale, e una "poliarticolare"(coinvolgimento di più di 5 articolazioni) ad andamento più severo ed indipendente <sup>70</sup>.

Ci può essere inoltre un coinvolgimento dell'apparato muscolo-scheletrico assiale; l'artropatia assiale include la *sacroileite* e la *spondilite anchilosante*. La spondilite anchilosante associata alle IBD è clinicamente identica a quella delle forme primitive. Generalmente l'esordio è in giovane età, con dolori alla colonna vertebrale che sono accentuati dal riposo e possono essere associati a rigidità mattutina. Il decorso è progressivo, spesso indipendente dalla IBD associata, e può condurre a danni scheletrici permanenti fino all'anchilosi <sup>71</sup>. E' stata evidenziata una stretta correlazione tra la spondilite anchilosante-IBD correlata e la presenza di HLA B27. In più della metà dei pazienti affetti dalla spondilite anchilosante correlata all'IBD ci sarebbe la positività dell'HLA B27 <sup>72</sup>.

### **Manifestazioni cutanee e mucose**

Le principali manifestazioni cutanee delle IBD sono l'*eritema nodoso* (EN) e il *pioderma gangrenoso* (PG). Il primo si manifesta più frequentemente in concomitanza delle fasi di acuzie della malattia. L'EN si presenta con lesioni nodulari rosse, del diametro di circa 2 cm, dolenti, calde che compaiono usualmente sulla superficie estensoria degli arti inferiori. Sintomi sistemici come la febbre, l'astenia e l'artralgia sono spesso presenti in caso di EN.

Il PG esordisce con una lesione cutanea eritematosa e dolente che evolve con la formazione di una pustola che si ulcera ed è caratterizzata da una regione centrale

necrotica. Come l'EN si localizza prevalentemente a livello della superficie estensoria degli arti inferiori, ma eccezionalmente può localizzarsi in altre sedi. A differenza dell'EN, il PG lascia vistose cicatrici alla scomparsa.

Il coinvolgimento della mucosa del cavo orale si manifesta con la *stomatite aftosa* caratterizzata da piccole ulcere dolenti che regrediscono senza lasciare esiti cicatriziali <sup>73</sup>.

### **Manifestazioni epatobiliari**

La *colangite sclerosante primitiva* (CSP) è senza dubbio la manifestazione epatobiliare più specifica e più importante. La malattia è rara nella popolazione generale, mentre è fortemente associata alle IBD: si è visto che nell'80-90% dei casi di CSP esiste una concomitante IBD. La prevalenza è del 5% nei pazienti affetti da RCU, mentre la condizione sembra meno frequente nei pazienti affetti da CD. L'insorgenza della PSC può avvenire in qualunque momento della malattia e talora ne precede la comparsa <sup>74</sup>. L'eziologia della condizione è sconosciuta, ma numerose evidenze suggeriscono una patogenesi autoimmune; è molto frequente la positività degli anticorpi anticitoplasma dei neutrofili con pattern perinucleare (p-ANCA) <sup>74</sup>. In realtà si tratta di anticorpi anticitoplasma dei neutrofili con pattern perinucleare ma senza positività per l'enzima mieloperossidasi (MPO); poiché non si conosce l'antigene contro cui questi anticorpi sono rivolti essi sono anche identificati come "x-ANCA". La diagnosi è spesso posta in pazienti asintomatici che presentano un rialzo degli indici di colestasi e le alterazioni sierologiche precedentemente citate. Nel caso in cui la CSP sia sintomatica il paziente presenta astenia, ittero, prurito, febbre, dolore in ipocondrio destro e calo ponderale <sup>67</sup>. Possono essere interessati sia i dotti intraepatici che extraepatici, con i caratteristici aspetti morfologici di nodularità, irregolarità e stenosi dei dotti.

L'evoluzione della CSP può essere quella di una cirrosi biliare secondaria o di un colangiocarcinoma. Il rischio di quest'ultima condizione è del 10-15% <sup>74</sup>. Si è inoltre osservato un aumentato rischio di sviluppo di adenocarcinoma del colon nei pazienti affetti da CSP e rettocolite ulcerosa <sup>75</sup>.

Nei pazienti affetti da IBD è aumentato il rischio di sviluppare altre patologie immuno-mediate a carico del fegato, come l'*epatite autoimmune* (EA). In uno studio condotto su pazienti affetti da EA nel 16% dei casi è stata diagnosticata una concomitante UC <sup>76</sup>.

E' stata inoltre osservata un'associazione tra IBD e insorgenza di colelitiasi e pancreatite, in particolar modo nei pazienti affetti da CD <sup>77</sup>.

### **Manifestazioni oculari**

La prevalenza delle manifestazioni a livello oculare è inferiore al 10%, ma il loro riconoscimento deve essere tempestivo <sup>67</sup>. Le principali manifestazioni sono l'*uveite*, più frequente nei pazienti affetti da UC e l'*episclerite*, più frequente nei pazienti affetti da CD. L'*uveite* si manifesta con dolore oculare, arrossamento, fotofobia e offuscamento della visione. E' una condizione generalmente associata alla positività dell'HLA B27 e alla presenza di altre manifestazioni extraintestinali come l'eritema nodoso <sup>78</sup>.

L'*episclerite* invece si presenta come un'iperemia della sclera e della congiuntiva che può avere un interessamento bilaterale; generalmente non provoca dolore e non determina alterazioni della vista. Nel caso in cui si verifichi una *sclerite*, che si manifesta con un severo dolore oculare, ci può essere un coinvolgimento delle strutture retiniche con conseguente diminuzione dell'acuità visiva <sup>67</sup>. E' comune il riscontro di una congiuntivite lieve.

## **Manifestazioni trombotiche**

Le IBD sono associate ad alterazioni ematologiche; in particolare, l'aumentato rischio di trombosi venosa e arteriosa è un fenomeno noto da tempo <sup>79</sup>. Uno studio di coorte condotto su una popolazione canadese ha mostrato un rischio 3 volte maggiore per i pazienti affetti da IBD di sviluppare trombosi venosa profonda o embolia polmonare, soprattutto nei pazienti con CD <sup>80</sup>. Nonostante ciò, l'esatto meccanismo che sottende allo sviluppo delle complicanze tromboemboliche non è definito con precisione. E' stata ampiamente studiata la relazione tra le IBD e i fattori ereditari condizionanti una trombofilia, come la presenza del fattore V Leiden o la mutazione G20210 A PT, le possibili alterazioni a carico delle proteine C ed S o l'iperomocisteinemia. Tuttavia tali fattori sembrano avere un ruolo minore nella predisposizione allo sviluppo di fenomeni trombotici <sup>81</sup>. Sono state formulate numerose ipotesi in merito ad alterazioni del sistema dell'aggregazione piastrinica, della coagulazione e della fibrinolisi. Le piastrine sembrano mostrare alterazioni quantitative e qualitative nei pazienti affetti da IBD <sup>82</sup>. Uno studio volto a valutare l'eventuale ipofibrinolisi ha evidenziato un aumento significativo della concentrazione plasmatica del TAFI (inibitore della fibrinolisi attivato dalla trombina) soprattutto durante le fasi di attività della malattia, potendo contribuire allo stato protrombotico <sup>83</sup>.

## **DIAGNOSI**

Il CD e la UC presentano caratteristiche cliniche simili ad altre condizioni soprattutto nella fase di esordio. Non esiste un test diagnostico che consente di fare diagnosi certa della malattia; pertanto, la diagnosi viene posta in base ai criteri clinici, bioumorali, endoscopici, istologici e radiologici. Nonostante ciò, la diagnosi differenziale tra UC e CD risulta impossibile nel 5-15% dei casi all'esordio della sintomatologia e tale situazione viene definita come *colite indeterminata*. Tuttavia nei

due terzi di questi pazienti viene successivamente definita la diagnosi <sup>84</sup>.

L'endoscopia, favorendo la diretta visualizzazione della mucosa, consente di valutare il carattere delle lesioni, l'estensione e la severità della malattia. Pertanto è un esame fondamentale nella diagnosi delle IBD anche per la possibilità di eseguire biopsie della mucosa. Le biopsie dovrebbero essere effettuate anche nei tratti di mucosa che presentano aspetto endoscopico di normalità, in quanto anche queste zone possono presentare alterazioni istologiche suggestive o fornire elementi importanti per la diagnosi differenziale. Come già accennato in precedenza, non esiste un reperto patognomonico di IBD a livello istologico, se non il riscontro di granulomi epitelioidi non caseificanti tipici del CD piuttosto rari.

L'endoscopia con le biopsie ha inoltre un ruolo cruciale nella sorveglianza e nell'individuazione di lesioni displastiche o neoplastiche nei pazienti che presentano una lunga storia di malattia <sup>85</sup>.

Numerosi esami radiologici sono utili nella valutazione della malattia, soprattutto a livello del piccolo intestino dove non è possibile la valutazione endoscopica tradizionale, se non quando la malattia ha una localizzazione molto prossimale o molto distale. L'ecografia addominale è un'indagine semplice e non espone il paziente a radiazioni ionizzanti; è possibile eseguire un esame mirato alla visualizzazione delle anse intestinali per valutarne lo spessore e la presenza di eventuali complicanze della malattia <sup>86</sup>. La tomografia assiale computerizzata e la risonanza magnetica hanno un ruolo complementare nella diagnosi della malattia. In particolare, la risonanza magnetica, in virtù dell'elevato potere di risoluzione e dell'assenza di radiazioni ionizzanti, viene utilizzata nei casi in cui si sospetti la presenza di stenosi, fistole o ascessi <sup>87</sup>.

La presenza di una malattia infiammatoria cronica è generalmente caratterizzata da tipici reperti a livello bioumorale. L'innalzamento degli indici di fase

acuta (proteina C reattiva PCR; velocità di eritrosedimentazione VES;  $\alpha$ -1 glicoproteina acida) rafforza il primo sospetto di un'IBD e spesso correla con lo stato di attività della malattia a livello intestinale o extraintestinale. E' possibile riscontrare trombocitosi, che rappresenta un marcatore di infiammazione, e leucocitosi che può essere sia un segno di infiammazione che l'indicazione di una concomitante infezione. In generale, le alterazioni degli indici di flogosi sono più frequenti nel CD, mentre nella UC si rilevano nelle forme più estese<sup>88</sup>. In considerazione dello stato infiammatorio cronico è frequente il riscontro di anemia microcitica, attribuibile anche ad una carenza marziale. E' possibile anche il riscontro di anemia macrocitica, causata dal deficit di vitamina B12 e di acido folico, osservato frequentemente soprattutto nei pazienti affetti da CD. Quando sono presenti sia la sideropenia che i deficit vitaminici l'anemia può essere normocitica.

A livello sierologico è possibile inoltre andare a ricercare alcuni anticorpi che sono stati associati alla presenza di IBD; si tratta in particolare dei p-ANCA (anticorpi diretti contro il citoplasma dei neutrofili a pattern perinucleare) e degli ASCA (anticorpi diretti contro il *Saccharomyces cerevisiae*). I p-ANCA risultano essere positivi nel 50-70% dei pazienti affetti da RCU<sup>89</sup> e fino al 20% dei pazienti affetti da CD<sup>90</sup>. Gli ASCA risultano invece più frequentemente positivi nei pazienti affetti da CD (45-60%) rispetto alla frequenza di positività nella UC (15%)<sup>89</sup>. Gli ASCA sono anticorpi diretti contro un lievito abbondantemente presente nella dieta e normalmente presente nel lume intestinale, il *Saccharomyces cerevisiae*, in particolare contro epitopi della sua parete cellulare. E' stato proposto che questi anticorpi possano essere la conseguenza di un'aumentata permeabilità intestinale o di una cross-reattività con altri antigeni, mentre sembra improbabile che possano esercitare un ruolo patogenetico diretto<sup>91</sup>.

E' possibile inoltre andare a dosare biomarkers fecali come la calprotectina e

la lattoferrina che sono proteine citoplasmatiche dei neutrofili. Si tratta di indici di stato infiammatorio che non risultano essere specifici per IBD ma che possono avvalorare l'ipotesi diagnostica di un'esistente flogosi intestinale<sup>88</sup>.

Infine, allo scopo di escludere che il quadro clinico del paziente sia causato da un'infezione o da un'infestazione parassitaria dell'intestino, è necessario eseguire una coprocultura e la ricerca dei parassiti e delle loro uova su più campioni. Come già accennato in precedenza, è inoltre possibile che un processo infettivo a carico dell'intestino possa indurre una riattivazione della malattia.

## TERAPIA

Il classico approccio terapeutico per la UC e il CD si avvale di una progressiva intensificazione della terapia a seconda dell'andamento clinico e dello stato di attività della malattia. E' molto dibattuta l'utilità di un approccio opposto, definito "top-down", che si avvale di un'intensa terapia iniziale al fine di indurre precocemente una remissione clinica e di evitare l'insorgenza di complicanze<sup>92</sup>.

Generalmente la gestione terapeutica delle IBD prevede il trattamento della fase di attività di malattia e la terapia di mantenimento per lo stato di quiescenza.

Per quanto riguarda la UC gli *aminosalicilati* sono farmaci utilizzati nella terapia di mantenimento nelle forme lievi e moderate<sup>93</sup>. La sulfasalazina è stato il primo farmaco di questa classe ad essere impiegato; tale molecola, a livello intestinale, viene metabolizzata dai batteri e convertita a sulfapiridina e acido 5-aminosalilico (5-ASA) che è la molecola biologicamente attiva. Il farmaco esiste in numerose formulazioni orali, ma è possibile anche la somministrazione topica a livello rettale, soprattutto nel trattamento della UC<sup>94</sup>. Nel caso in cui non ci sia la remissione clinica o nelle forme moderate e severe è indicato l'uso di *corticosteroidi*. E' stata dimostrata la loro capacità di indurre la remissione della malattia; al contrario non è dimostrata

la loro utilità nella terapia di mantenimento <sup>95</sup>. A seconda della severità della condizione e dell'estensione della malattia la terapia può essere somministrata a livello topico o sistemico. In ogni caso, la terapia steroidea non può essere protratta eccessivamente in relazione agli effetti collaterali sistemici. Pertanto, sono state studiate e commercializzate molecole appartenenti a questa classe con limitata biodisponibilità sistemica per un minor assorbimento intestinale e un importante metabolismo al primo passaggio a livello epatico, come la budesonide e il beclometasone dipropionato <sup>95</sup>. In caso di mancata risposta alla terapia steroidea (steroido-resistenza) o di impossibilità di sospendere lo steroide senza avere la ripresa della sintomatologia (steroido-dipendenza) si usano farmaci immunomodulatori. In modo particolare le tiopurine (azatioprina e il suo metabolita 6-mercaptopurina) sono impiegate nella terapia di mantenimento della UC; l'efficacia terapeutica di tali farmaci non è immediata ma è raggiunta dopo alcune settimane di trattamento <sup>96</sup>. L'indicazione terapeutica all'utilizzo delle tiopurine è pertanto quella di mantenere lo stato di remissione soprattutto nei pazienti che necessitano frequentemente di steroidi. Un ulteriore immunomodulatore utilizzato nella terapia della UC severa è la ciclosporina che garantisce buoni risultati a breve termine nella terapia della fase attiva di malattia, ma non altrettanti nella terapia di mantenimento <sup>95</sup>.

Per quanto riguarda il CD i pazienti con una forma lieve o moderata di malattia sono trattati con i cortisonici a bassa tossicità sistemica perché l'efficacia degli amiosalicilati è dubbia. Questi ultimi non sono molto efficaci nel mantenere la remissione ottenuta con la terapia steroidea <sup>97</sup>. Anche per il CD la terapia steroidea ha un ruolo fondamentale nell'induzione della remissione della malattia. Nel CD viene particolarmente impiegata la budesonide soprattutto nell'indurre la remissione della malattia; mentre nessuno steroide ha un ruolo determinante nel mantenere la

malattia in stato di quiescenza<sup>98, 99</sup>. Nella terapia di mantenimento del CD, come per la UC, sono impiegati farmaci immunomodulatori come l'azatioprina. Inoltre, il methotrexate viene impiegato soprattutto nei casi di CD extraintestinale a coinvolgimento articolare.

In caso di inefficacia o parziale risposta ai trattamenti farmacologici tradizionali possono essere utilizzati, sia nella UC che nel CD, farmaci definiti "biologici" introdotti relativamente di recente. Si tratta di anticorpi monoclonali diretti contro specifiche molecole dell'infiammazione. I due principali farmaci utilizzati sono l'infliximab e l'adalimumab; sono entrambi anticorpi monoclonali anti TNF $\alpha$  ma differiscono per la morfologia strutturale, essendo l'infliximab una molecola chimerica e l'adalimumab una molecola ricombinante umanizzata. E' stata dimostrata una notevole efficacia dei farmaci biologici nell'indurre la remissione della malattia nelle forme moderate e severe non responsive ai trattamenti tradizionali<sup>100</sup>.

Un ulteriore approccio terapeutico ancora dibattuto prevede l'utilizzo di antibiotici nel portare la malattia alla remissione, in modo particolare nel CD. Nella UC, al contrario, non è confermata l'efficacia della terapia antibiotica<sup>101</sup>.

Come già trattato in precedenza la terapia chirurgica è indicata solo nei casi di complicanze o di completa refrattarietà alla terapia medica. E' più frequente, ma non risolutiva nel CD (resezioni, stricturoplastiche, drenaggio ascessi, trattamento delle fistole perianali) e più rara e tendenzialmente risolutiva nella UC (proctocolectomia) ad eccezione della comparsa di uno stato infiammatorio della mucosa a livello della tasca ileale (pouchite) che viene creata a sostituzione del retto in seguito all'intervento<sup>101</sup>.

### **Infliximab nel trattamento delle IBD**

L'infliximab (IFX) è uno dei farmaci biologici che sono stati introdotti a partire

dalla fine degli anni '90 per il trattamento delle IBD. Con il termine di “farmaco biologico” si fa riferimento a molecole di diversa natura, più frequentemente di natura proteica, che vengono sintetizzate con tecniche di biologia ricombinante e dirette contro specifiche molecole con un ruolo importante nella patogenesi della malattia. Tra i possibili farmaci biologici che possono essere sintetizzati ci sono citochine ricombinanti, antagonisti recettoriali di citochine e anticorpi monoclonali chimerici o umanizzati <sup>102</sup>. L'IFX è un anticorpo monoclonale diretto contro il TNF $\alpha$  che ha favorito grandi miglioramenti nel trattamento dei pazienti affetti da forme severe e refrattarie di malattia. Inizialmente l'IFX era stato studiato per il trattamento del CD; in questa condizione clinica, come detto in precedenza, sembra prevalere l'azione dei linfociti Th 1 che, con la produzione in particolare di citochine come TNF $\alpha$ , favoriscono la permanenza dello stato infiammatorio <sup>103</sup>. Solo in un secondo momento la Food and Drug Administration ha consentito l'utilizzo di IFX anche per la UC. Infatti, nonostante l'evidenza che l'assetto citochinico associato alla UC e al CD sia differente e che nella UC prevalga la risposta Th 2, ci sono molte evidenze in vitro e in vivo che il TNF $\alpha$  abbia un importante ruolo nella patogenesi della UC e pertanto ne è stato ampliato l'utilizzo <sup>104</sup>.

L'IFX è un molecola monoclonale chimerica perché, a differenza di altri anti-TNF, è costituito dalla fusione di una molecola di origine murina con una porzione ricombinante umana. Si tratta di un anticorpo della classe delle IgG1. Le indicazioni terapeutiche all'utilizzo di IFX, nelle IBD, sono le malattie refrattarie alle terapie tradizionali, le forme severe o steroide-dipendenti e alcune manifestazioni extraintestinali <sup>105</sup>. Esistono delle controindicazioni all'utilizzo di IFX come la presenza di un ascesso, la presenza di tubercolosi attiva o pregressa, la presenza di sclerosi multipla e il pregresso sviluppo di un linfoma <sup>106</sup>. L'esatto meccanismo d'azione dell'IFX a livello molecolare non è completamente compreso; tuttavia è stato

dimostrato che induce apoptosi nelle cellule mononucleate del sangue periferico e nei linfociti T a livello intestinale <sup>107</sup>. Al fine di mantenere lo stato di inattività della malattia sia a livello luminale che delle fistole è meglio una terapia protratta di mantenimento a differenza dell'approccio "on demand". L'IFX è somministrato tramite un'infusione via endovena ad una dose standard di 5mg/Kg con una fase iniziale di induzione al tempo 0 e alle settimane 2 e 6; successivamente si ha la fase di mantenimento con un'infusione ogni 8 settimane. Tale schema terapeutico, inizialmente approvato per il CD, è stato successivamente applicato anche nella terapia della UC. L'IFX viene anche utilizzato per la MC in età pediatrica, ma non per la UC. Alcuni autori hanno recentemente ipotizzato l'utilizzo dell'IFX in età pediatrica a partire dalla diagnosi, mettendo in atto la strategia terapeutica definita "top-down". Sembra che tale approccio possa essere utile nel ritardare l'insorgenza di riacutizzazioni della malattia e nel modificare la storia di malattia, ma tale evidenza deve essere ulteriormente validata <sup>108</sup>.

Uno dei problemi correlati alla molecola di IFX è la sua elevata antigenicità che è in relazione alla natura chimerica della molecola; alcuni pazienti sviluppano infatti degli anticorpi contro l'IFX definiti "anticorpi umani antichimerici". Ciò può comportare lo sviluppo di reazioni infusionali acute oppure una progressiva perdita nella risposta alla terapia. Sono state proposte alcune strategie al fine di evitare lo sviluppo di questi anticorpi, ad esempio l'utilizzo concomitante di farmaci immunosoppressori o la somministrazione profilattica di steroidi sistemici. Nonostante ciò circa il 10% dei pazienti ogni anno deve interrompere la terapia per intolleranza e/o perdita di risposta <sup>109</sup>. I pazienti che non rispondono più all'IFX anche dopo un aumento della posologia, possono essere trattati con un altro anticorpo anti-TNF in genere con efficacia. E' comunque importante ricordare che le evidenze dell'efficacia clinica sono più forti per l'IFX rispetto a quelli degli altri anti-TNF. L'IFX è efficace nell'indurre e

mantenere in remissione la malattia anche nella forma fistolizzante mantenendo infusioni del farmaco ogni 8 settimane. In uno studio è stata aumentata la posologia del farmaco a 10 mg/kg di peso corporeo, ma non ci sono evidenze che ciò favorisca un ulteriore miglioramento nella remissione clinica. Pertanto la dose standard è stata mantenuta a 5 mg/Kg di peso corporeo <sup>110</sup>.

Lo spegnimento del segnale infiammatorio mediato dal TNF può indurre un'alterazione nella risposta immunitaria. Per questo motivo è necessario escludere che il paziente abbia ascessi che possono determinare quadri settici e che non abbia una latente infezione tubercolare. Uno studio ha mostrato che il rischio di sviluppare infezioni severe è del 2-4% nei pazienti trattati con IFX senza una differenza statistica se comparato al rischio nella popolazione controllo <sup>111</sup>. Tuttavia, per minimizzare il rischio di infezioni opportunistiche, è utile vaccinare i pazienti e evitare l'uso di corticosteroidi. Tutti i pazienti dovrebbero ricevere i vaccini contro la varicella, l'influenza e lo pneumococco. Inoltre, il vaccino contro l'HPV dovrebbe essere somministrato alle giovani donne, come anche il vaccino anti-HBV nei pazienti sieronegativi <sup>112</sup>.

E' molto dibattuta la possibilità di insorgenza a lungo termine di effetti collaterali in pazienti trattati con IFX. Il TNF ha un ruolo nell'indurre l'apoptosi; è stato ipotizzato che l'IFX, spegnendo il segnale del TNF, possa interferire con tale meccanismo, aumentando il rischio di insorgenza di neoplasie, in modo particolare di linfomi. Tuttavia, alcuni studi hanno dimostrato che non c'è un aumento significativo del rischio di linfomi in pazienti trattati con IFX <sup>113</sup>.

### **Altri farmaci biologici e IBD**

Oltre all'IFX esistono altri due farmaci anti-TNF utilizzati nel trattamento delle IBD: l'adalimumab e il certulizumab pegol. L'adalimumab è un anticorpo monoclonale

ricombinante completamente umano della classe delle IgG1 che è stato approvato per il trattamento del CD, dell'artrite reumatoide, dell'artrite psoriasica e della spondilite anchilosante. La molecola di adalimumab, in virtù del fatto che non presenta sequenze peptidiche murine, mostra minore antigenicità rispetto all'IFX. Anche se meno frequente è comunque possibile lo sviluppo di anticorpi contro tale molecola <sup>106</sup>. Adalimumab è ben tollerato dai pazienti che hanno sviluppato intolleranza o che sono diventati resistenti al trattamento con IFX. A differenza dell'IFX viene somministrato con un'iniezione sottocutanea ogni 2 settimane. Come per l'IFX esiste una fase di induzione e una seconda di mantenimento. Una seconda molecola diretta contro il TNF $\alpha$  è il certulizumab pegol che è il frammento Fab (frammento legante l'antigene) che interagisce con il TNF impedendogli di legarsi al suo recettore e di trasdurre il segnale. Come l'adalimumab viene somministrato sottocute nel trattamento della MC <sup>106</sup>. In Italia tale farmaco non è ancora stato approvato per la terapia delle IBD.

Nell'ambito delle molecole anti-TNF sono stati studiati anche farmaci contro il recettore del TNF come l'etanercept, che lega il recettore 2 del TNF al frammento Fc delle immunoglobuline umane; tuttavia non si sono dimostrati efficaci nel trattamento del CD <sup>114</sup>.

In fase di studio ci sono numerosi altri farmaci "biologici". Tra questi troviamo molecole che impediscono l'interazione tra le cellule circolanti del sistema immunitario e i loro recettori endoteliali e che vengono definite "molecole selettive anti-adesione". Il natalizumab è un anticorpo monoclonale ricombinante della classe delle IgG4 diretto contro l'integrina- $\alpha$ 4 che blocca l'adesione e la conseguente migrazione dei leucociti a livello della mucosa intestinale <sup>115</sup>. Tale farmaco, dimostratosi efficace nell'indurre la remissione di malattia e nel mantenimento della fase di quiescenza nelle forme moderate e severe di CD, è stato tuttavia ritirato dal

commercio in Europa. Infatti, durante uno studio clinico, un paziente affetto da CD in terapia con natalizumab ha sviluppato la leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML); due casi analoghi si sono verificati in pazienti affetti da sclerosi multipla in terapia con lo stesso farmaco. Pertanto tale farmaco non è attualmente disponibile in Italia, mentre in altri stati è stato reintrodotta nella terapia della sclerosi multipla e anche del CD negli USA <sup>116</sup>.

E' stato recentemente sviluppato un secondo anticorpo anti  $\alpha 4\beta 7$ -integrina che inibisce l'adesione leucocitaria mediata da MAdCAM-1 in modo particolare a livello intestinale, ma tale molecola necessita ancora di numerosi studi per valutarne la possibile applicazione nel campo terapeutico delle IBD <sup>106</sup>.

Un ulteriore target terapeutico che è in fase di studio è lo sviluppo di anticorpi contro citochine chiave dell'infiammazione nelle IBD. L'IL-6, secreta dai macrofagi e dai linfociti T, è un importante mediatore di fase acuta dell'infiammazione e presenta livelli sierici aumentati nei pazienti affetti da CD e UC. Uno studio ha dimostrato che somministrando tocilizumab, un anticorpo monoclonale diretto contro il recettore dell'IL-6, si favorisce la remissione di pazienti affetti da CD in fase attiva <sup>117</sup>. Anche l'IL-12 e l'IL-23 hanno un ruolo fondamentale nella patogenesi delle IBD e sono target dei farmaci biologici che sono in fase di studio. Al fine di inibire la risposta infiammatoria mediata dai linfociti Th1 sono in fase di studio anticorpi monoclonali diretti contro IL-2, INF $\gamma$  e IL-12 <sup>106</sup>.

Un altro possibile approccio terapeutico per le IBD potrebbe essere la somministrazione di citochine anti-infiammatorie come IL-10, IL-11, IFN $\alpha$  e IFN $\beta$ . IL-10 è una citochina prodotta dalle cellule B e T, oltre che dai macrofagi in seguito alla presentazione dell'antigene da parte di cellule APC. E' considerata una citochina antinfiammatoria perché inibisce la produzione di IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$  e IL-6 e ha un ruolo importante nel controllo del processo infiammatorio. In esperimenti condotti su

animali si è visto che Il-10 collabora all'omeostasi del sistema immunitario a livello intestinale e che il suo deficit è associato alla comparsa di infiammazione intestinale nei topi knockout <sup>37</sup>.

Infine è stata formulata l'ipotesi dell'utilizzo di alcuni fattori di crescita, come il TGF $\beta$ , nella terapia delle IBD. Tali molecole infatti esercitano un feed-back negativo sulla differenziazione dei linfociti T helper naive nelle sottopopolazioni Th1 e Th2. Inoltre fattori come l'epidermal growth factor (EGF) e il keratinocyte growth factor (KGF-1) favoriscono l'integrità della mucosa; in virtù di questa caratteristica potrebbero essere utili nel favorire il ripristino dell'integrità della mucosa intestinale. In uno studio è stata valutata l'efficacia clinica dell'EGF nel trattamento della UC <sup>118</sup>. Per quanto concerne l'EGF è necessario ricordare che può favorire la produzione di proto-oncogeni ed aumentare il rischio di insorgenza di neoplasie. Pertanto sono necessari ancora numerosi studi per definire il profilo di sicurezza dell'utilizzo clinico di tale molecola.

## FAMIGLIA DELL'INTERLEUCHINA-1 ED INTERLEUCHINA-33

### **LA FAMIGLIA DELL'INTERLEUCHINA-1 E LE IBD**

L'importanza di un corretto bilancio tra mediatori pro- ed anti-infiammatori per il mantenimento dell'omeostasi intestinale è stato dimostrato dall'efficacia dei trattamenti anti-TNF: infatti, come discusso precedentemente, il blocco selettivo del TNF si è dimostrato una delle strategie più efficaci per ridurre l'infiammazione nelle IBD. Ulteriore supporto è fornito dagli studi che dimostrano che nelle IBD <sup>119, 120</sup> e in altre malattie autoinfiammatorie <sup>121</sup> vi è uno sbilanciamento tra IL-1 e il suo antagonista naturale IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra). In effetti, altri membri della

famiglia dell'IL-1 sono implicati nella patogenesi delle IBD, come IL-18, descritta come un importante mediatore pro-infiammatorio nel CD <sup>122, 123</sup>.

### **INTERLEUCHINA-33**

Nel 2005, IL-33, conosciuta come Nuclear Factor-High Endothelial Venules (NF-HEV) <sup>124</sup>, é stata riconosciuta come nuovo membro della famiglia dell' IL-1 <sup>125</sup>. L'espressione di IL-33 ee stata descritta in numerose cellule di origine non ematopoietica, come cellule muscolari lisce, cellule endoteliali, fibroblasti, cellule epiteliali bronchiali e adipociti e in alcune cellule immuni (macrofagi e cellule dendritiche) <sup>125, 126</sup>. Inizialmente era stato proposto che, come IL-1 e IL-18, IL-33 venisse sintetizzata come un precursore di 30 kDa (pro-IL-33) e quindi clivata da caspasi-1, in seguito all'attivazione dell'inflammasoma, in una forma matura/bioattiva di 18 kDa <sup>125</sup>. Sudi recenti, invece, hanno sfidato questo paradigma, suggerendo che la forma full-length di 30 kDa é la forma attiva, e altre forme clivate e meno attive (20-22 kDa) possono essere il risultato dell'attivazione di caspasi-3 e -7 <sup>127-129</sup>. Il significato biologico di queste forme nella patologia umana deve ancora essere indagato.

L'interazione tra IL-33 e il suo recettore, ST2, un tempo recettore orfano della famiglia dei recettori Toll/IL-1 e il corecettore IL-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP), porta all'attivazione del downstream signaling e agli effetti biologici di IL-33. ST2 esiste in 2 diverse splice variant, che portano alla sintesi di ST2L e sST2 <sup>130</sup>. ST2L é un recettore di membrana che trasmette il segnale dopo il legame con IL-33, mentre sST2 é una molecola solubile che probabilmente funziona da "decoy receptor", legando IL-33 e bloccando i suoi effetti biologici <sup>131-133</sup>. Come per le isoforme di IL-33, il significato di ST2L e sST2 nella patologia umana deve ancora essere indagato.

Sempre piú dati suggeriscono che il sistema IL-33/ST2 giochi un ruolo primario in numerose malattie autoimmuni ed infiammatorie, come reazioni allergiche, asma, dermatite atopica, malattie fibroproliferative del polmone, artrite reumatoide e shock anafilattico <sup>134, 135</sup>. Infatti, IL-33 modula le risposte immuni; comunque, diversamente da IL-1 e IL-18, che promuovono principalmente risposte di tipo Th1, l'attivazione IL-33/ST2 primariamente induce citochine Th2, come IL-5 e IL-13 <sup>125, 136</sup>, e può amplificare sia risposte di tipo Th1/Th17 che Th2 <sup>137, 138</sup>. IL-33 ha specifici effetti nell'intestino. In particolare, topi trattati cronicamente con IL-33 presentavano iperplasia epiteliale e infiltrazione neutrofila ed eosinofila nella mucosa intestinale <sup>125</sup>. Come IL-1 $\alpha$ , IL-33 potrebbe avere un doppio ruolo, con la forma da 30 kDa funzionante come un fattore nucleare intracellulare, oltre che come citochina pro-infiammatoria <sup>139</sup>; infatti, é stato visto che IL-33 é una proteina associata alla cromatina con la capacità di legarsi al DNA e regolare la trascrizione <sup>140</sup>.

## I MODELLI ANIMALI NELLO STUDIO DELLE IBD

### **MODELLI MURINI DI INFIAMMAZIONE INTESTINALE**

Svariati modelli animali di infiammazione intestinale sono stati sviluppati per induzione chimica, per trasferimento di cellule immunitarie o mediante manipolazione genetica. I modelli di induzione chimica (trinitrobenzen sulfonic acid o TNBS <sup>141</sup>, dextran sodio sulfate DSS <sup>142</sup>) di colite ricapitolano gli eventi che conducono al danno acuto della mucosa e benché siano importanti strumenti per lo studio di particolari aspetti dell'infiammazione intestinale, differiscono chiaramente dall'IBD umana, sia negli eventi iniziali, così come il corso clinico della patologia <sup>143</sup>. Non di meno sono stati fondamentali per lo studio del ruolo patogenetico di specifiche citochine, nella

colite sperimentale <sup>144</sup>. Altri modelli sono quelli immunomediati, dove linfociti T CD45RB<sup>high</sup> (adoptive transfer) <sup>144</sup>, o midollo osseo (bone marrow chimera) <sup>145</sup>, sono stati trasferiti in topi immunodeficienti. Questo tipo di studi sono stati importanti per chiarire il ruolo patogenetico e regolatorio dei linfociti T nel controllo dell'immunità della mucosa e dell'infiammazione intestinale ed offrono forti evidenze che la polarizzazione Th1 gioca un ruolo chiave nella patogenesi del Crohn <sup>146</sup>. I modelli genetici (per la maggior parte knockout es. IL-2 <sup>147</sup>, T Cell Receptor (TCR)  $\alpha/\beta$  <sup>148</sup>, IL-10 <sup>37</sup> contribuiscono alla comprensione del ruolo di immunomediatori di alcune molecole chiave, nella patogenesi dell'infiammazione intestinale cronica. E' comunque improbabile che le mutazioni genetiche imposte rappresentino analoghi difetti nell'IBD umano, riducendo quindi la loro utilità nella comprensione dei fattori scatenanti la UC ed il CD. I modelli spontanei rappresentano uno dei più attraenti modelli sperimentali per lo studio dell'infiammazione intestinale, in quanto, analogamente alla malattia umana, l'infiammazione insorge senza nessuna apparente manipolazione. Vi sono i topi C3H/HeJBir, caratterizzati da infiammazione cronica e spontanea della regione del colon e della valvola ciecale. La colite che colpisce i giovani topi, tende a stabilizzarsi col passare del tempo, senza ricorrenze <sup>149</sup>. I topi TNF $\Delta$ ARE rappresentano un modello di ileite, caratterizzato da alti livelli di TNF circolante <sup>150</sup>. Molte sono le evidenze che supportano un ruolo chiave del TNF nella patogenesi del CD. Questo modello offre l'opportunità di studiare i meccanismi dell'ileite indotta da TNF, che potrebbe avere importanti implicazioni per lo sviluppo di nuove terapie miranti alla riduzione dell'attività del TNF nel CD.

## **I TOPI SAMP1/YITFC**

Molto promettenti per lo studio dell'IBD sono i topi SAMP1/YitFc, derivanti da un ceppo di topi normali, chiamati AKR. Topi del ceppo AKR furono incrociati per oltre

20 generazioni, selezionando una linea con durata della vita ridotta (senescence accelerated mouse prone 1) SAMP1<sup>151</sup>. Dopo circa 10 anni, un gruppo di ricerca Giapponese stabilizzò una sublinea di topi SAMP1, che non erano più soggetti ad invecchiamento precoce, ma esibivano un chiaro fenotipo di infiammazione intestinale spontanea (SAMP1/Yit)<sup>152</sup>. E' stata successivamente verificata l'origine dei topi SAMP1/Yit dai topi AKR, mediante analisi genomica confrontando un pannello di 274 loci microsatellitari. L'osservazione che circa il 40% degli alleli sembrava non derivare dalla linea AKR dimostra che durante la selezione i topi SAMP1 sono stati incrociati con altre linee. Nonostante questo tra i topi AKR ed i topi SAMP1/Yit vi è una completa omologia della regione dell'MHC sul cromosoma 17<sup>153</sup>. I topi SAMP1/Yit mostrano un'inflammatione spontanea che si manifesta intorno alla 20 settimana, con una penetranza del 100% dopo la 30 settimana. Le caratteristiche istologiche ricordano l'ileite terminale del CD umano, con un'inflammatione segmentale, principalmente localizzata a livello dell'ileo terminale; coinvolgimento trasmurale; presenza di granulomi nella mucosa e nella sottomucosa; cambiamenti nella morfologia e nell'architettura delle cellule epiteliali; ipertrofia muscolare e neurale<sup>153</sup>. L'ileite cronica può essere trasferita in maniera adottiva da linfociti T CD4+ in topi immunodeficienti (severe combined immunodeficient, SCID), dove la patologia risulta localizzarsi nuovamente a livello dell'ileo terminale, suggerendo che i linfociti T CD4+ potrebbero riconoscere antigeni specificatamente localizzati in questo tratto dell'intestino. Dopo altre generazioni di incroci tra consanguinei, sono emerse nuove caratteristiche fenotipiche: infatti in questi topi l'ileite si manifesta alla 10a settimana, vi è una notevole ipertrofia della muscolatura intestinale e un marcato deposito di collagene nei segmenti interessati dall'inflammatione; la produzione di alti livelli di IFN- $\gamma$  intestinale 4 settimane prima l'insorgenza dell'inflammatione; manifestazioni perianali, in un sottogruppo di animali, quali fistole e ulcerazioni.

Questo nuovo gruppo di animali è stato denominato SAMP1/YitFc e allevato sempre mediante incrocio tra consanguinei <sup>154</sup>.

## **SCOPO DELLA TESI**

Scopo della presente tesi é valutare l'espressione di IL-33 e di ST2 nella mucosa e nel siero di pazienti affetti da malattie infiammatorie croniche intestinali e indagare il ruolo funzionale dell'asse IL-33/ST2 nella patogenesi dell'infiammazione cronica intestinale, utilizzando il modello murino spontaneo di IBD, rappresentato dai topi SAMP1/YitFc.

## **MATERIALI E METODI**

### **Pazienti**

Biopsie endoscopiche del colon di pazienti di sesso maschile e femminile, di età compresa tra i 18 e i 65 anni, affetti da CD o UC e da controlli sani (CON) sono state raccolte durante colonscopie o sigmoidoscopie, eseguite a scopo diagnostico o di sorveglianza, presso il Digestive Health Center presso la University of Virginia (DHC UVA), e sono state utilizzate per estrarre proteine ed RNA totale. Sono stati inoltre ottenuti campioni di tessuto colico a tutto spessore di pazienti affetti da CD e da UC e da controlli non infiammatori, durante interventi di resezione intestinale per malattia infiammatoria cronica intestinale o per condizioni non infiammatorie, neoplastiche e non neoplastiche presso il DHC UVA o la Cleveland Clinic Foundation (CCF). Il tessuto colico a tutto spessore è stato utilizzato per tecniche di immunohistochimica (UVA) e come fonte di cellule epiteliali intestinali (CCF). Vetrini anonimi, non colorati, di biopsie o di pezzi chirurgici fissati in formalina e inclusi in paraffina, provenienti da pazienti affetti da coliti infettive o da diverticolite sono stati ottenuti dal Biorepository and Tissue Research Facility presso la UVA e utilizzati per tecniche di immunohistochimica. Campioni di sangue intero sono stati ottenuti da pazienti affetti da CD e da UC che si erano sottoposti a visite mediche presso il DHC UVA, presso l'Unità di Gastroenterologia ed Endoscopia Digestiva dell'IRCCS Fondazione Mangiagalli, Regina Elena and Ospedale Maggiore di Milano e presso l'Unità di Gastroenterologia ed Endoscopia Digestiva dell'IRCCS Policlinico San Donato per la diagnosi, il follow-up e le riattivazioni di malattie infiammatorie croniche intestinali; campioni di sangue proveniente da individui sani di età, sesso ed etnia paragonabili sono stati utilizzati come controlli (CON). Campioni di sangue intero sono stati anche

raccolti da pazienti affetti da CD e da UC trattati con Infliximab (5-10 mg/kg, e.v.); tali prelievi sono stati eseguiti 1 ora prima e 2 ora dopo ogni singola infusione di farmaco al T<sub>0</sub>, e alle settimane 2, 6, 14, 22, 30, e 38. Tutte le diagnosi sono state confermate da dati clinici, endoscopici ed istologici. Tutti gli studi sono stati approvati dai relativi comitati etici/Internal Review Board delle diverse strutture coinvolte.

## **Animali**

i topi SAMP1/YitFc (SAMP) e AKR/J (AKR) sono stati mantenuti in condizioni *Specific Pathogen Free* (SPF) nello stabulario della Case Western Reserve University. Tutti i protocolli sono stati approvati dall'Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) della Case Western Reserve University.

## **Raccolta del tessuto ileale e valutazione della severità dell'ileite dei topi SAMP**

Il tratto terminale dell'ileo é stato prelevato dai topi sacrificati, lavato con PBS freddo, aperto longitudinalmente e immerso in soluzione di Bouin's (LabChem). I tessuti così fissati sono stati processati, inclusi in paraffina, tagliati in sezioni di 4 µm, colorati con ematossilina ed eosina, e valutati istologicamente, in cieco, da un singolo anatomo-patologo, utilizzando un sistema di punteggio semiquantitativo, ampiamente validato

155

## **Isolamento e colture di cellule dei linfonodi mesenterici e splenociti**

I linfonodi mesenterici (MLN) e le milze dei topi sacrificati sono stati raccolti e processati per l'isolamento delle cellule (18); gli organi sono stati rimossi

asetticamente e passati attraverso un filtro con pori di 70  $\mu\text{m}$  in modo da ottenere una sospensione di cellule singole. La lisi degli eritrociti é stata eseguita con il buffer di lisi ACK (Lonza). Le cellule cosí ottenute sono state poste in coltura in RPMI 1640 con 10% FBS e 1% penicillina/streptomina, in presenza di un coating di anti-CD3 (5  $\mu\text{g/ml}$ ) e di anti-CD28 (1  $\mu\text{g/ml}$ ) solubile, in presenza e assenza di rIL-33 (10 ng/ml) per 48h. I supernatanti sono stati quindi raccolti per ulteriori analisi.

### **Raccolta di siero umano e murino**

Campioni di sangue intero (5 ml) sono stati raccolti dai pazienti utilizzando un ago di 22 gauge in provette vacutainer e dai topi anestetizzati utilizzando la puntura cardiaca; i campioni sono quindi stati centrifugati a 2500 x g per 20 minuti. Il siero é stato quindi raccolto da ogni campione, immediatamente aliquotato e conservato a -80°C per ulteriori analisi.

### **Isolamento delle cellule epiteliali intestinali e delle cellule mononucleate della lamina propria**

Per l'isolamento di cellule epiteliali intestinali (IEC) umane, i tessuti colici sono stato raccolti e processati immediatamente dopo la resezione chirurgica <sup>122</sup>. I pezzi operatori sono stati tagliati longitudinalmente, lavati, esaminati per valutarne l'aspetto macroscopico ed é stato raccolto un campione a tutto spessore della parete colica. La mucosa intestinale é stata scollata dalla muscolaris mucosae, quindi tagliata in sottili striscioline e lavata ripetutamente in HBSS contenente 10 mM DTT (Sigma-Aldrich). Le IEC sono quindi state isolate attraverso ripetute incubazioni in HBSS (Invitrogen/GIBCO) contenente 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich). Le cellule

mononucleate, gli eritrociti e le cellule morte sono state rimosse utilizzando un gradiente Percoll Plus al 40% (GE Healthcare), nel quale le cellule epiteliali si equilibrano all'interfaccia; le preparazioni cellulari così ottenute sono state raccolte, lavate 2 volte in PBS e quindi le cellule sono state contate. La purezza delle preparazioni è stata valutata utilizzando un metodo all'immunoperossidasi, mediante il quale tutte le cellule con morfologia epiteliale sono state colorate con un anticorpo anti-cheratina, con una contaminazione da parte delle cellule mononucleate della lamina propria minore dell'1%, come valutato dalla colorazione mediante un anticorpo monoclonale diretto contro un antigene leucocitario comune (CD45). Per le cellule mononucleate della lamina propria umane, striscioline di mucosa, dopo essere state lavate dal muco, sono state digerite con collagenasi e DNAsi (entrambe da ThermoScientific). La sospensione cellulare così ottenuta è stata purificata utilizzando il gradiente Ficoll-Hypaque Plus (GE Healthcare) e la preparazione di cellule mononucleate della lamina propria lavata e raccolta.

Le IEC murine sono state isolate dai topi utilizzati negli esperimenti <sup>156</sup>; i segmenti di tessuto intestinale dei topi sono stati tagliati in piccoli pezzi della lunghezza inferiore al cm e quindi ripetutamente incubati in una soluzione contenente 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich). Le cellule contaminanti sono state rimosse utilizzando un gradiente Percoll Plus 40% (GE Healthcare), e la purezza del preparato è stata ripetutamente controllata.

### **Citometria a flusso**

Cellule mononucleate della lamina propria, provenienti da mucosa coinvolta da UC sono state usate per un'analisi tramite citometria a flusso. Le sospensioni cellulari sono state preparate in PBS contenente 2% FBS. Un numero di cellule pari a  $10^6$  è

stato colorato con appropriate combinazioni di anticorpi contro CD4 (RPA-T4), CD8 (HIT8a), CD11b (ICRF44) (BD Pharmingen USA) e CD68 (Y1/82A) (eBiosciences) umani, marcati con appropriate combinazioni di fluorocromi (FITC, PE e Pacific Blue). Un anticorpo policlonale IgG goat anti-human IL-33 (AF3625) e un anticorpo policlonale IgG goat anti-human ST2 (AF523) (R&D System) sono stati usati in combinazione con anticorpi secondari IgG donkey anti-goat, marcati con fluorocromi FITC e APC (F0108 and F0109) (R&D System). La colorazione intracellulare per IL-33 é stata eseguita con il kit di permeabilizzazione di eBioscience. La raccolta e l'analisi dei dati di citometria a flusso é stata eseguita utilizzando un macchinario BD LSRII e il software BD FACS diva (Becton Dickinson).

### **Culture cellulari**

La linea cellulare di neoplasia epiteliale intestinale HT-29 (ATCC) é stata fatta crescere fino all'80% di confluenza in RPMI 1640, arricchito con 10% FBS e 2% penicillina/streptomina (Invitrogen/GIBCO), e coltivate in presenza e assenza di rhTNF (10 ng/ml; Peprotech) per 0, 2, 6, 12, 24 e 48h. I supernatanti sono stati immediatamente raccolti, aliquotati e congelati a -20°C; le cellule sono state raccolte per l'estrazione delle proteine totali.

### **Estrazione dell'RNA e retrotrascrizione**

Le biopsie endoscopiche, gli ilei murini, le cellule epiteliali isolate e le cellule HT-29, coltivate come descritto in precedenza, sono state poste in RNA Later (Applied Biosystem), lasciate a 4°C per tutta la notte, quindi congelate e conservate a -80°C. L'RNA totale é stato isolato utilizzando il kit RNeasy (Qiagen) e retrotrascritto

utilizzando il kit Superscript III (Invitrogen).

### **Preparazione e quantificazione degli estratti proteici**

Estratti proteici sono stati preparati dalle biopsie endoscopiche, dagli ilei murini, dalle cellule epiteliali isolate e dalle cellule HT-29, coltivate come descritto in precedenza<sup>122</sup>. I campioni sono stati posti in RIPA lysis and extraction buffer contenente Halt protease inhibitor cocktail e Halt phosphatase inhibitor cocktail (Pierce Biotechnology), omogeneizzando le biopsie per 30 secondi utilizzando un omogenizzatore Brinkmann. Le proteine sono state estratte anche dalle frazioni citoplasmica e nucleare di cellule HT-29 utilizzando il kit NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction reagents (Thermo Scientific). Gli estratti proteici da tessuto e da cellule sono stati quindi centrifugati ed immediatamente congelati a -20°C. Gli estratti proteici sono stati quantificati utilizzando il test colorimetrico di Bradford (Bio-Rad Protein Assay; Bio-Rad Laboratories).

### **Quantificazione di ST2 e dei livelli di citochine**

Le concentrazioni di IL-33 umana nel siero dei pazienti e nei supernatanti di colture cellulari sono stati misurati tramite sandwich ELISA (Apotech Corporation) o con il human IL-33 Duo Set kit (R&D System). Le concentrazioni di sST2 nel siero e nei supernatanti di colture cellulari sono stati anch'essi misurati tramite sandwich ELISA (Medical & Biological Laboratories Co., Ltd. or ST2 Duo Set, R&D Systems). I livelli di IL-33 murina nel siero sono stati misurati, dopo denaturazione con calore (15 minuti a 60°C), con mouse IL-33 Duo Set ELISA kit (R&D System). I livelli di citochine presenti nelle colture di cellule da linfonodi mesenterici e di splenociti sono

stati misurati tramite Quansys multiplex ELISA array (Quansys Bioscience).

## RT-PCR per IL-33 e ST2

L'espressione dell'mRNA per IL-33 e ST2, sST2 e ST2L umani e per IL-33 e ST2 murini relativa al GAPDH umano e alla  $\beta$ -actina murina (housekeeping genes) é stata misurata nelle biopsie endoscopiche, nel tessute ileale murino e nelle IEC utilizzando i seguenti primers: human IL-33 sense (5'-CACCCCTCAAATGAATCAGG-3'), human IL-33 antisense (5'-GGAGCTCCACAGAGTGTTC-3')<sup>140</sup>, human ST2 sense (5'-GACGGCGACCAGGTCCTT-3'), human ST2 antisense (5'-GGGCTCCGATTACTGGAAACA-3'), human ST2L sense (5'-CGTGTAGAGCACTTTGTTCA-3'), human ST2L antisense (5'-GGCAAACCTCCTTATTGTGAG-3'), human sST2 sense (5'-GAAAAACGCAAACCTAACT-3'), human sST2 antisense (5'-TCAGAAACACTCCTTACTTG-3')<sup>157</sup>, human GAPDH sense (5'-CCATCACCATCTTCCAGGAG-3'), human GAPDH antisense (5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTG-3')<sup>158</sup>, mouse IL-33 sense (5'-TCCTTGCTTGGCAGTATCCA-3'), mouse IL-33 antisense (5'-TGCTCAATGTGTCAACAGACG-3')<sup>159</sup>, mouse ST2 sense (5'-GCAATTCTGACACTTCCCATG-3'), mouse ST2 antisense (5'-ACGATTTACTGCCCTCCGTA-3')<sup>159</sup>, mouse  $\beta$ -actina sense (5'-AGCTGCGTTTTACACCCTTT-3') e mouse  $\beta$ -actina antisense (5'-AAGCCATGCCAATGTTGTCT-3')<sup>159</sup>. Le reazioni di RT-PCR sono state eseguite (38), utilizzando un macchinario Bio-Rad iCycler iQ Real Time Detection System e il relativo software (Bio-Rad Laboratories). Le reazioni sono state eseguite in un

volume di 25 µl, utilizzando i reagenti per SYBR Green (Applied Biosystems) e una concentrazione finale di primer 250 nM. Le condizioni usate per la reazione sono: 95°C per 2 minuti, seguiti da 42 cicli di 95°C per 15 secondi, 60°C per 15 secondi, e 72°C per 15 secondi.

### **Western blot**

L'analisi mediante Western blot degli estratti proteici ottenuti dalle biopsie endoscopiche, dagli ilei murini, dalle cellule epiteliali isolate e dalle HT-29 e dei sieri diluiti 1:100 è stata eseguita seguendo le seguenti procedure <sup>122</sup>. I campioni sono stati mischiati 1:1 con il Laemmli buffer e ugualmente caricati (25 µg di proteine totali per corsia), previa esecuzione di denaturazione, su un gel al 10,5-14% Tris-HCl, preconstituito (Bio-Rad Laboratories); IL-33 ricombinante, umana o murina, (Alexis) è stata usata come controllo positivo per IL-33; ST2 ricombinante umano (Medical & Biological Laboratories Co., Ltd. or R&D System) è stato usato come controllo positivo per ST2. I campioni sono stati separati mediante corsa elettroforetica e trasferiti su una membrana di nitrocellulosa (Bio-Rad Laboratories). Le membrane sono state quindi bloccate in una soluzione al 5% di latte privo di lipidi in TBS e incubate con anticorpi primari specifici: anticorpi policlonali IgG goat anti-human IL-33 (AF3625), specifico per il dominio Ser<sub>112</sub>-Thr<sub>270</sub> C-ter di IL-33 (R&D System) e goat anti-mouse IL-33 IgG (AF3626) a una diluizione di 1:250, anticorpi policlonali IgG goat anti-human ST2 (AF523) e goat anti-mouse ST2 (AF1004) a una diluizione di 1:250 (R&D System), anticorpi monoclonali (clone AC-74) mouse anti-β-actin (A2228) a una diluizione di 1:5000 (Sigma), anti tubulin (ab7750, Abcam), o anti-TATA box binding protein (ab818, Abcam). Dopo lavaggi ripetuti in TBS contenente 0.1% Tween 20 (Sigma), le membrane sono state incubate con un anticorpo

policlonale rabbit anti-goat IgG, coniugato con HRP (HAF017) a una diluizione di 1:1000 (R&D System) o con anticorpo policlonale goat anti-mouse IgG coniugato con HRP (Cat # 12-349) a una diluizione di 1:2000 (Upstate Cell Signaling Solutions). Le membrane, dopo ripetuti lavaggi in TBS contenente 0.1% Tween 20 (Sigma), sono state sviluppate con substrato per chemiluminescenza (Pierce).

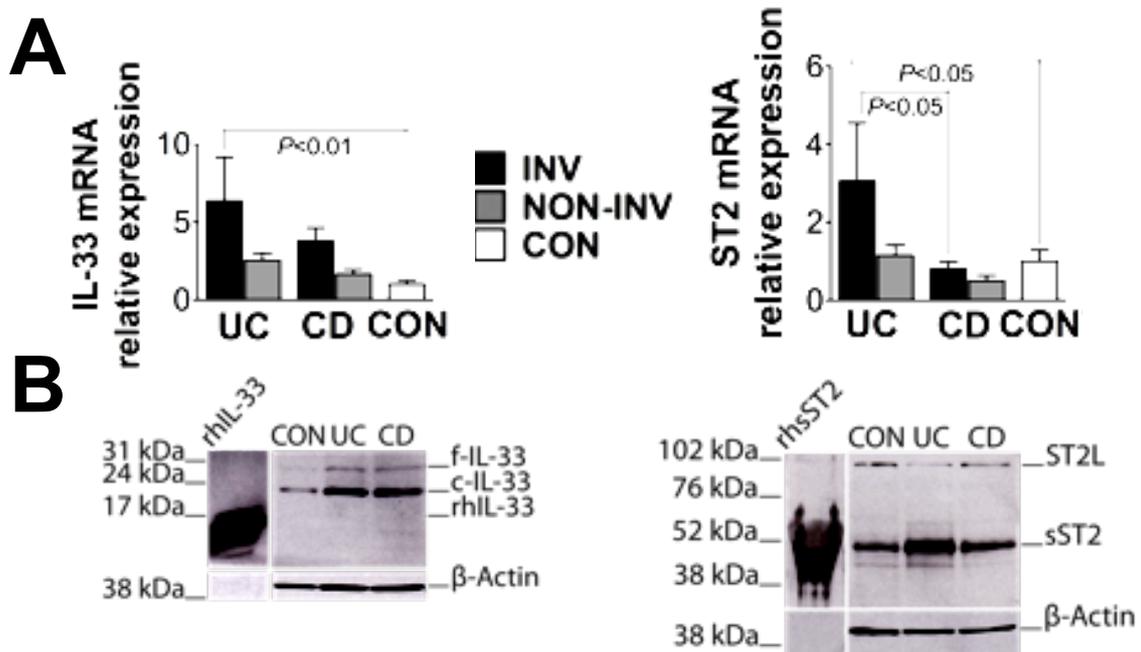
### **Immunoistochimica**

Le colorazioni di immunoistochimica sono state eseguite <sup>122</sup> utilizzando un anticorpo policlonale IgG goat anti-human IL-33 (AF3625; R&D Systems) o un anticorpo policlonale IgG goat anti-mouse IL-33 (AF3626; R&D Systems) a una diluizione di 1:200 e un anticorpo monoclonale IgG (clone HB12) mouse anti-human ST2 (D065-3-Medical & Biological Laboratories Co., LTD) o un anticorpo policlonale IgG goat anti-mouse ST2 (AF1004; R&D Systems) a una diluizione di 1:100. I campioni di tessuto sono stati fissati in formalina al 10% (Thermo Scientific), processati, inclusi in paraffina; quindi sono state tagliate sezioni di 3 µm e successivamente poste su vetrini. Le sezioni sono state deparaffinate e bloccate in siero (Vector Labs) per i legami aspecifici. I campioni sono stati bloccati anche per l'attività endogena della perossidasi utilizzando 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dopo una notte di incubazione con gli anticorpi primari a 4° C, i vetrini sono stati lavati con PBS e incubati con appropriati anticorpi secondari biotinilati (Vector Labs). I vetrini sono stati lavati con PBS e incubati con Vectastain ABC Kit (Vector Labs) per 30 minuti. Le cellule positive per le colorazioni sono state visualizzate tramite l'aggiunta di substrato di diaminobenzidina (Vector Labs) ed è stata eseguita una colorazione in ematossilina. I controlli negativi sono stati preparati utilizzando le medesime condizioni, ma sostituendo l'anticorpo primario con un isotipo IgG.

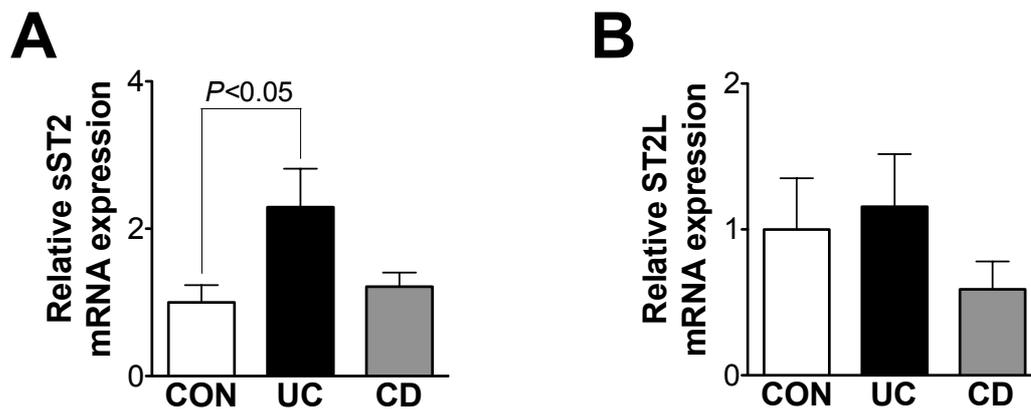
## **RISULTATI**

### ***IL-33 e ST2 sono aumentati nella mucosa infiammata di pazienti affetti da colite ulcerosa.***

Abbiamo inizialmente misurato i livelli di IL-33 e ST2 nelle biopsie endoscopiche provenienti da mucosa colica in regioni coinvolte e non coinvolte dall'infiammazione in pazienti affetti da CD o da UC e in CON non infiammati. I trascritti di mRNA per IL-33 sono risultati piú abbondanti nelle biopsie di mucosa da tratti coinvolti dalla colite ulcerosa, rispetto ai CON(aumento di 6.4 volte,  $P<0.01$ ), mentre non sono state rilevate differenze tra i tessuti non infiammati (Fig. 1A, pannello di sinistra). I Western blot hanno mostrato la presenza di bande di 30 e 20-22 kDa corrispondenti alla forma full-length (f-) e alla forma clivata (c-) di IL-33, rispettivamente. Entrambe le forme sono apparse piú espresse nella colite ulcerosa e malattia di Crohn attive (INV UC e INV CD) rispetto ai CON (Fig. 1B, pannello di sinistra). Livelli aumentati di mRNA per ST2 sono stati osservati nella colite ulcerosa coinvolta dal processo infiammatorio (INV UC) rispetto ai CON (aumento di 3.1 volte,  $P<0.05$ ) (Fig. 1A, pannello di destra), con un specifico incremento dei trascritti di mRNA per la variante di splice sST2 splice variant (aumento di 2.3 volte,  $P<0.05$ ) e della proteina relativa, mentre non sono state rilevati cambiamenti significativi per ST2L (Fig. 2 e 1B, pannello di destra). Nel complesso, questi dati suggeriscono che sia l'espressione di IL-33 che quella di ST2 sono aumentati nelle malattie infiammatorie croniche intestinali, localmente, nella mucosa infiammata. Inoltre, l'aumento di IL-33 e sST2 potrebbe essere piú specifico per attività di malattia nella UC rispetto al CD.



**Fig. 1.** *IL-33 e ST2 sono specificamente aumentati nella mucosa infiammata nella UC.* Biopsie coliche sono state raccolte da aree coinvolte (INV) e non coinvolte (NON-INV) da pazienti affetti da UC (N=40) e CD (N=64) e da controlli non infiammati (CON) (N=30), e sono stati estratti l'RNA totale e le proteine e quindi processate per l'esecuzione di RT-PCR e WB. (A) IL-33 (pannello di sinistra) e ST2 (pannello di destra) sono stati normalizzati con il GAPDH e i livelli relativi di mRNA calcolati come rapporto di espressione rispetto ai controlli. L'analisi statistica è stata eseguita tramite test one-way ANOVA. (B) Western blot rappresentativo di 6 diversi esperimenti per IL-33 (pannello di sinistra) e ST2 (pannello di destra) su biopsie provenienti da INV IBD e CON. rhIL-33 e rsST2 sono stati usati come controlli positivi, e β-actina come controllo interno di carico. IL-33 di completa lunghezza e IL-33 clivata, f- and c-IL-33. (Dati pubblicati in Pastorelli L. et al, PNAS 2010<sup>160</sup>).



**Fig. 2.** *sST2, ma non ST2L, é incrementato nella mucosa infiammata durante UC.*

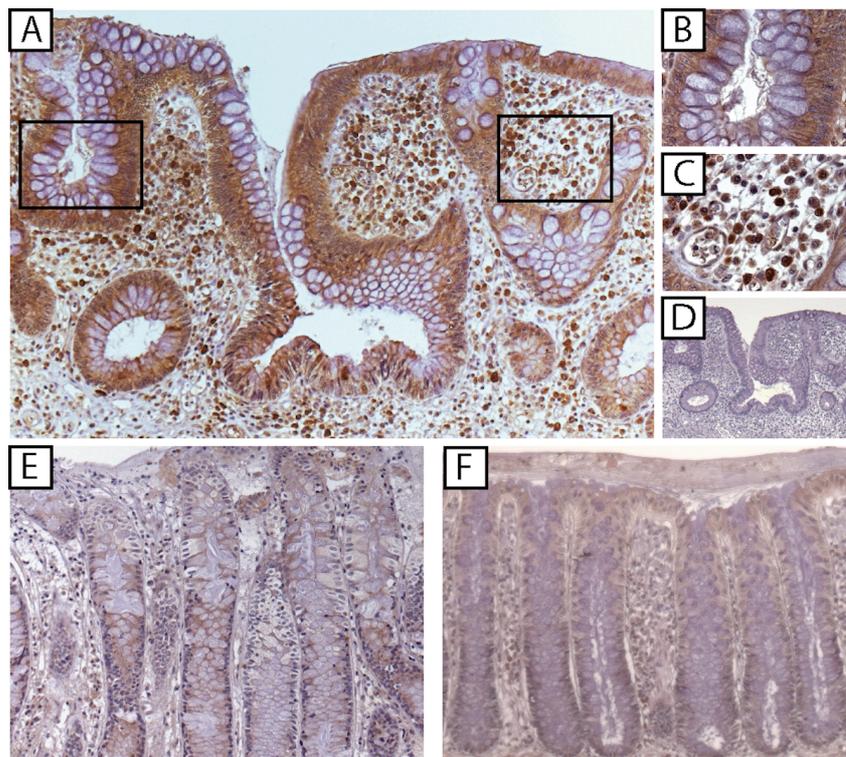
Biopsie coliche sono state raccolte da aree infiammate di pazienti affetti da UC (N=10), CD (N=9), e CON non infiammati (N=9), e l'RNA totale estratto e processato per la RT-PCR. (A) sST2 (pannello di sinistra) e ST2L (pannello di destra) sono stati normalizzati al GAPDH e i livelli relativi di mRNA calcolati come rapporti rispetto ai controlli. (Dati pubblicati in Pastorelli L. et al, PNAS 2010<sup>160</sup>).

### **Localizzazione dell'espressione di IL-33 e ST2 nelle malattie infiammatorie croniche intestinali.**

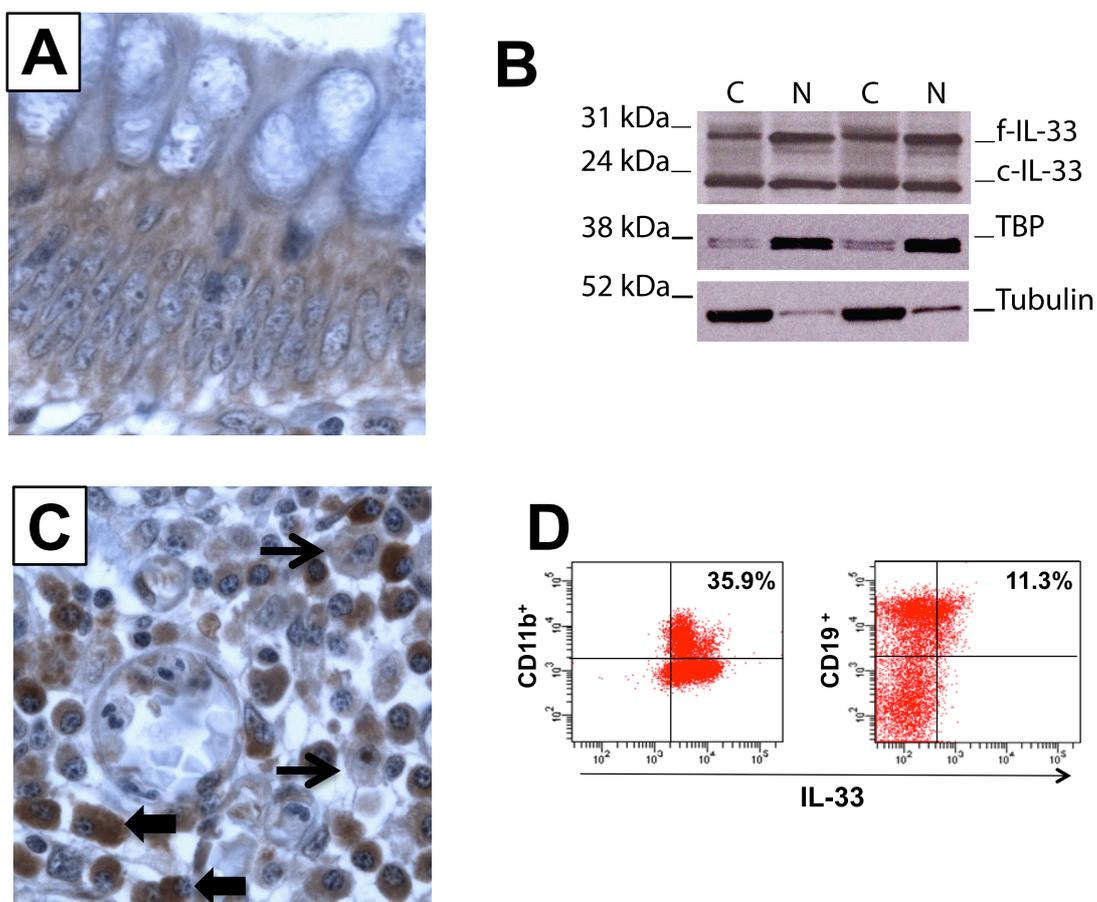
Allo scopo di localizzare l'espressione di IL-33 e ST2 a livello della mucosa intestinale, abbiamo eseguito tecniche di immunistochemica su campioni di parete colica a tutto spessore, ottenuti da pezzi operatori da pazienti affetti da malattia infiammatoria cronica intestinale (IBD) e da controlli non infiammati. Abbiamo individuato il segnale per IL-33 nel citoplasma e nel nucleo delle cellule epiteliali e nelle cellule mononucleate della lamina propria (LPMC) in tutti i campioni analizzati, anche se l'intensità e la distribuzione del segnale variava nei differenti gruppi sperimentali (Fig. 3 e 4A). La localizzazione a livello del citoplasma e del nucleo delle cellule epiteliali intestinali é stata confermata attraverso Western blot per IL-33

delle frazioni citoplasmatica e nucleare di cellule HT-29 (Fig. 4B). Abbiamo individuato un segnale per IL-33 di maggiore intensità nei campioni provenienti da pazienti affetti da UC (Fig. 3A,B,C); più specificamente IL-33 era localizzata principalmente all'epitelio (Fig. 3B) e in cellule mononucleate della lamina propria (LPMC) infiltranti il tessuto infiammato, caratterizzate da abbondante citoplasma e da grandi nuclei granulari, di forma "a rene", o da un nucleo posizionato eccentricamente, di aspetto "a ruota di carro", identificabili, per le caratteristiche morfologiche, come macrofagi tissutali (istiociti) e plasmacellule, rispettivamente (Fig. 3C e 4C). L'analisi citofluorimetrica dei mononucleati della lamina propria isolati dalla mucosa coinvolta dalla UC ha confermato l'espressione di IL-33 nei macrofagi e nei linfociti B (Fig. 4D). Al contrario della UC, una colorazione meno intensa è stata osservata nel CD (Fig. 3E) e nei CON (Fig. 3F). La colorazione per IL-33, durante l'infiammazione, si localizza anche agli adipociti presenti nella parete intestinale e alle cellule endoteliali (Fig. 7), similmente a quanto già descritto in altri organi e tessuti<sup>125, 140</sup>. Un intenso segnale per ST2 è stato analogamente osservato nella UC, anche se sostanzialmente limitato alle cellule infiammatorie della lamina propria (Fig. 5A,B), in particolare in grosse cellule mononucleate, con abbondante citoplasma e in un altro tipo cellulare, caratterizzato da una forma rotonda, un grosso nucleo condensato e scarso citoplasma, verosimilmente macrofagi tissutali e linfociti, rispettivamente (Fig. 5B e 6A,B, frecce). L'analisi con citofluorimetria ha confermato questi risultati, localizzando l'espressione di ST2 primariamente a cellule CD11b+ e CD4+ (Fig. 6C). Di contro, ST2 è risultato assente/diminuito nelle cellule epiteliali nella UC. Anche se di minore entità, una simile tendenza era presente nel CD. Interessantemente, nei campioni CON non infiammati la fonte primaria di ST2 è risultato essere l'epitelio intestinale, anche se un certo segnale è stato identificato in rari LPMC (Fig. 5E). Questi dati indicano che IL-33 viene prodotta dalle IEC e dai

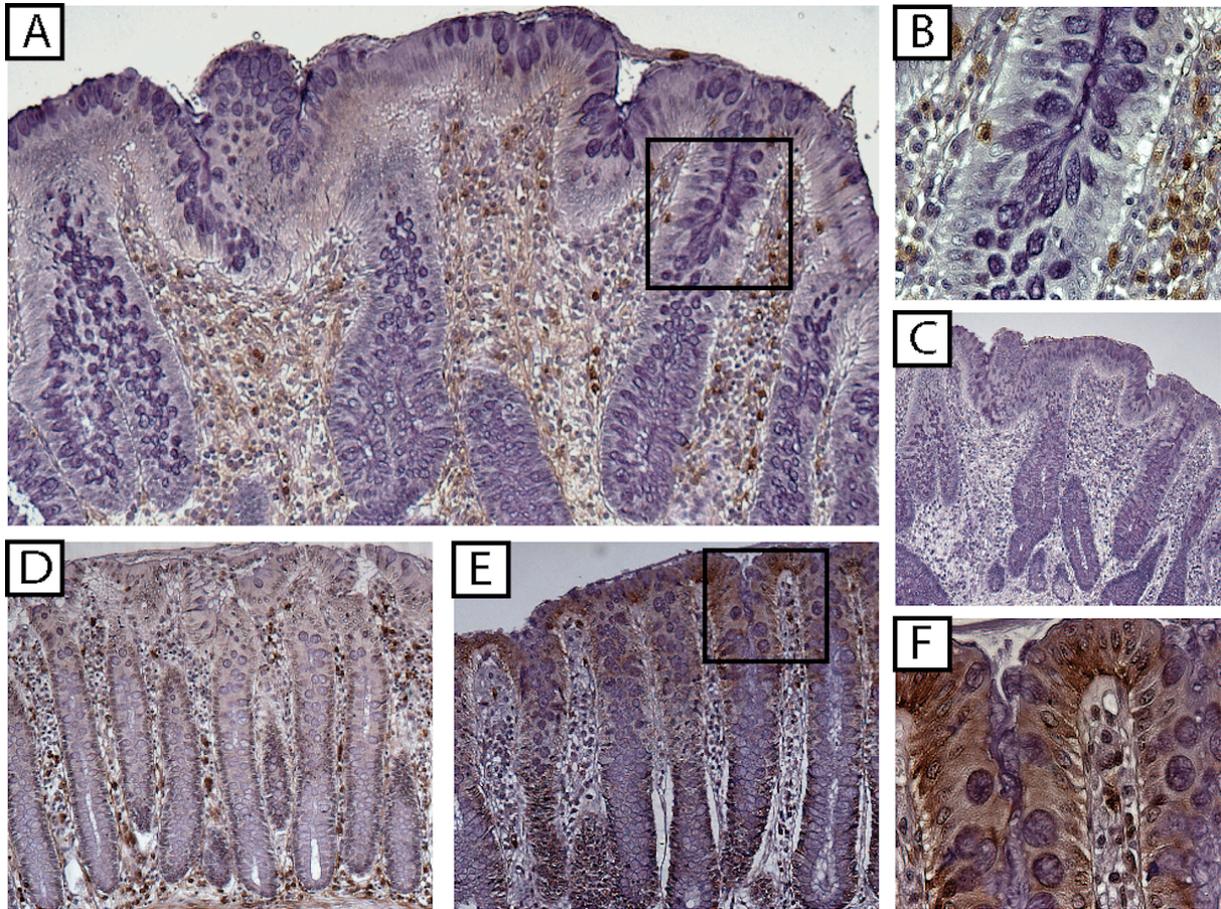
LPMC nella mucosa intestinale durante l'infiammazione, e la sua espressione é aumentata durante la UC attiva, rispetto alla CD e ai CON. D'altro canto, anche se ST2 é presente e aumentato nei LPMC nella UC attiva, la perdita dell'espressione epiteliale di ST2 potrebbe essere specifico per le IBD, in quanto ST2 di origine epiteliale é stato individuato in altri tipi di colite, come nelle coliti infettive e nelle diverticoliti (Fig. 8).



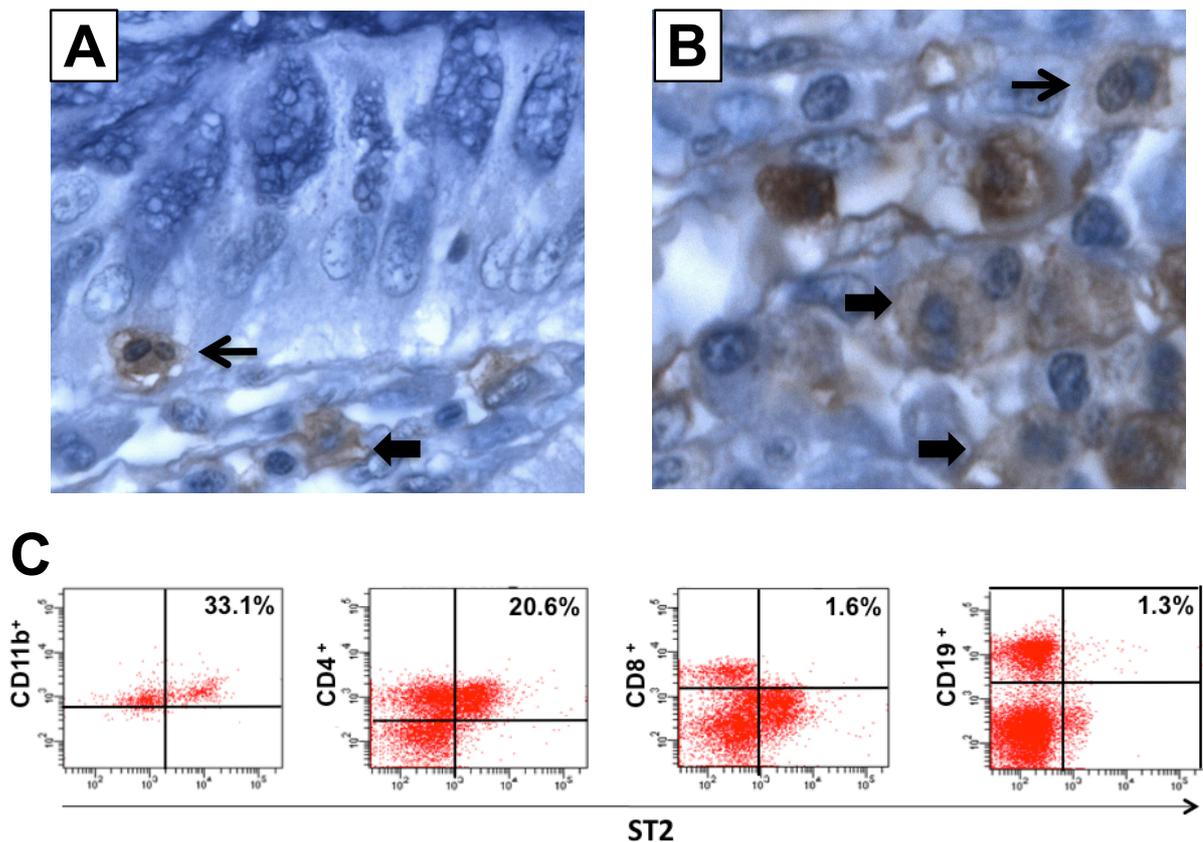
**Fig. 3.** *IL-33 é localizzata a livello delle IEC e LPMC colici, ed é marcatamente aumentata nella UC attiva.* Tessuto colico a tutto spessore da pazienti affetti UC, CD e da CON non infiammatori (N=4/exp group) sono stati valutati tramite immunohistochimica per IL-33. (A) Mucosa infiammata in corso di UC. (B,C) Ingrandimento di (A) che mostra l'espressione di IL-33 nelle IEC (B) e nei LPMC (C, teste di freccia). (D) Colorazione di controllo con anticorpi isotipo di sezioni di (A). (E) Mucosa infiammata in corso di CD, e (F) CON non infiammati. Ingrandimento originale di (A,D,E,F) X10 e (B,C) X80. (Dati pubblicati in Pastorelli L. et al, PNAS 2010<sup>160</sup>).



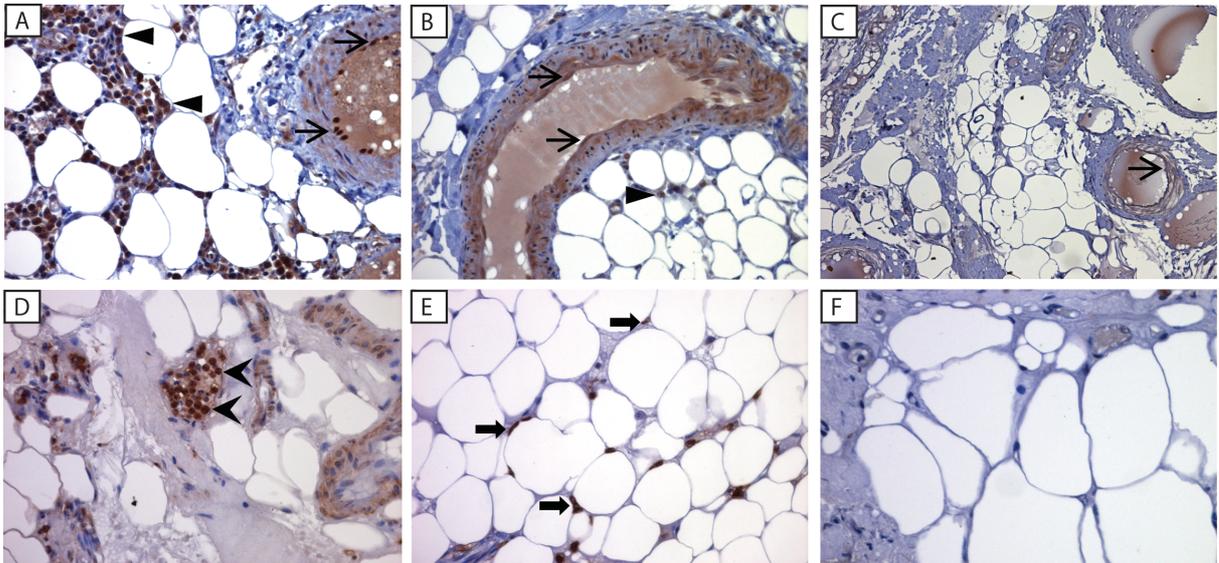
**Fig. 4.** *IL-33 é localizzata nel citoplasma e nel nucleo delle IEC, ed é espressa da macrofagi e linfociti B/plasmacellule nella lamina propria intestinale.* (A) Localizzazione citoplasmatica e perinucleare di IL-33 mostrata dall'immunoistochimica nel tessuto colico in corso di UC (N=4). (B) Western blot rappresentativo per IL-33 degli estratti citoplasmatici (C) e nucleari (N) da cellule HT-29. Tubulina e TATA box binding protein (TBP) sono stati usati come controlli interni di carico per le frazioni citoplasmatica e nucleare, rispettivamente. (C) L'immunoistochimica su tessuti colici di pazienti affetti da UC (N=4) localizza IL-33 in cellule di aspetto suggestivo per macrofagi (frecche) e plasmacellule (frecche spesse). (D) Analisi citofluorimetrica rappresentativa degli LPMC isolati dalla mucosa colica coinvolta da UC utilizzando anticorpi contro IL-33, CD11b e CD19 coniugati con fluorocromi. Ingrandimento originale di (A,C), X63. (Dati pubblicati in Pastorelli L. et al, PNAS 2010<sup>160</sup>).



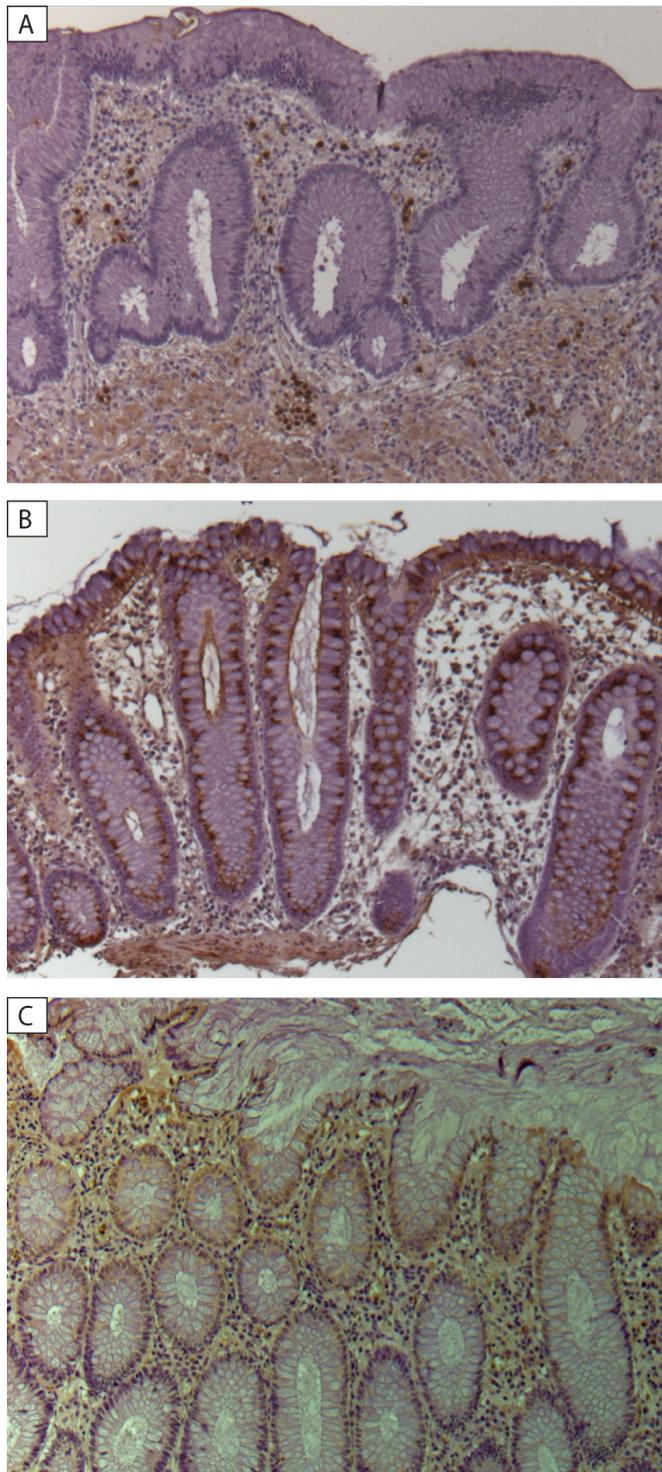
**Fig. 5.** ST2 é specificamente ridotto nell'epitelio delle IBD. Tessuto colico a tutto spessore da pazienti affetti UC, CD e da CON non infiammatori (N=4/exp group) sono stati valutati tramite immunohistochimica per ST2. (A) Mucosa infiammata in corso di UC. (B) Ingrandimento di (A) dimostrante la localizzazione specifica di ST2 a livello degli LPMC (teste di freccia). (C) Colorazione di controllo con anticorpi isotipo di sezioni di (A). (D) Mucosa infiammata in corso di CD, e (E) CON non infiammati. (F) Ingrandimento di (E) dimostrante la colorazione per ST2 a livello delle IEC. Ingrandimento originale di (A,C,D,E) X10 e (B,F) X80. (Dati pubblicati in Pastorelli L. et al, PNAS 2010<sup>160</sup>).



**Fig. 6.** *ST2* é espresso dai linfociti T CD4<sup>+</sup> T e dai macrofagi nella lamina propria in corso di UC. (A,B) Le immagini ad alto ingrandimento dell'immunoistochimica per ST2 su tessuto colico in corso di UC (N=4) identifica specificamente cellule morfologicamente suggestive per linfociti (freccie) e macrofagi (freccie spesse). (C) LPMC sono stati isolati da un pezzo chirurgico di colon ottenuto da un paziente affetto da UC. Analisi citofluorimetrica rappresentativa degli LPMC isolati dalla mucosa colica coinvolta da UC utilizzando anticorpi contro ST2, CD11b, CD4, CD8 e CD19 coniugati con fluorocromi. Ingrandimento originale di (A,B), X63. (Dati pubblicati in Pastorelli L. et al, PNAS 2010<sup>160</sup>).



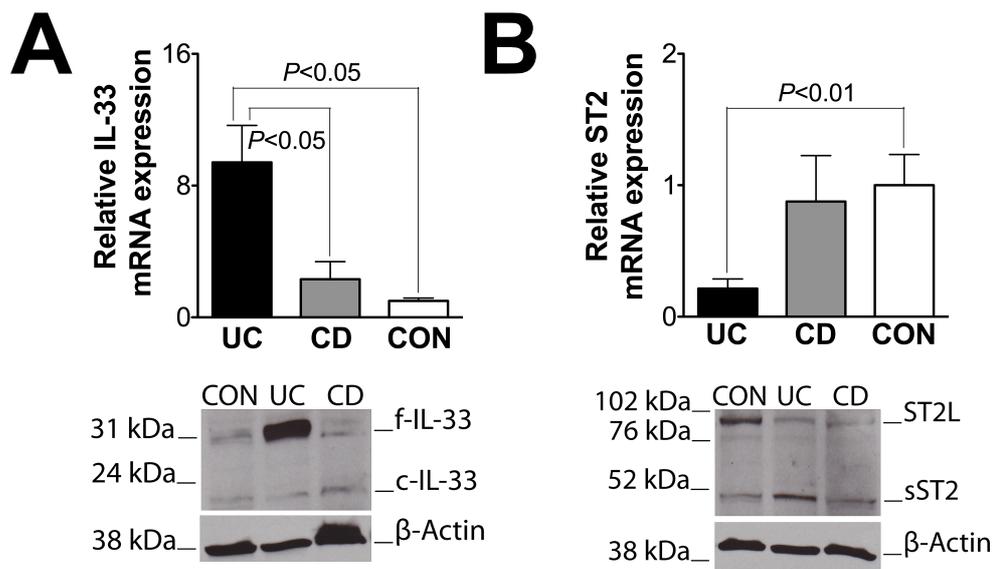
**Fig. 7.** *IL-33 e ST2 sono localizzati nel tessuto adiposo e nelle cellule endoteliali coliche.* Immunoistochimica per IL-33 e ST2 di tessuto colico di pazienti affetti da UC, CD e CON non infiammatori (N=4/gruppo). (A,B) Colorazione per IL-33 delle cellule endoteliali (freccie), e delle cellule infiammatorie nel tessuto adiposo (teste di freccia) in UC INV (A) e CD INV (B). (C) Colorazione per IL-33 delle cellule endoteliali e del tessuto adiposo nei CON. (D) Raggruppamento di cellule infiammatorie colorate per ST2 (teste di freccia) nel tessuto adiposo in corso di UC. (E) ST2 si localizza negli adipociti (freccie) e in cellule infiammatorie in corso di CD. (F) Colorazione per ST2 del tessuto adiposo colico in CON non infiammatori. Ingrandimento originale di (A,B,D,E,F), X20; Ingrandimento originale di (C), X10. (Dati pubblicati in Pastorelli L. et al, PNAS 2010<sup>160</sup>).



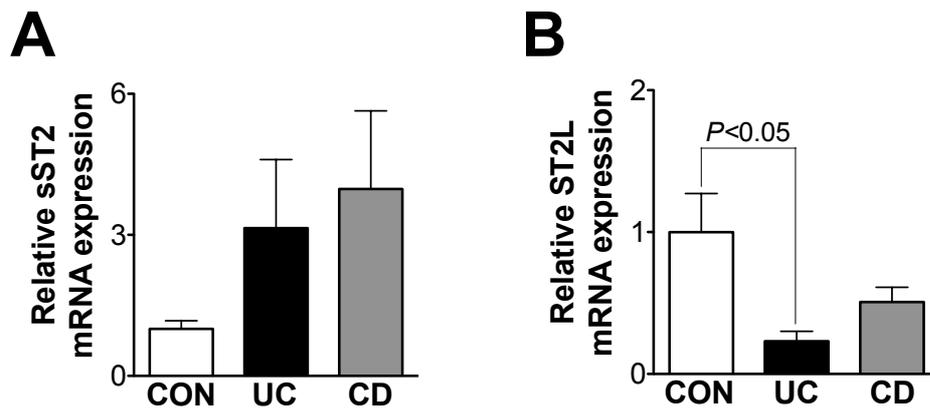
**Fig. 8.** *Espressione differenziale di ST2 nell'epitelio in corso di UC rispetto a controlli infiammatori.* Immunoistochimica per ST2 di tessuto colico da pazienti affetti da UC e CON infiammatori (N=4/gruppo). (A,B,C) Assenza di localizzazione epiteliale di ST2 nella UC attiva (A), ma non nelle coliti infettive (B) e nelle diverticoliti (C). Ingrandimento originale di (A,B,C), X10. (Dati pubblicati in Pastorelli L. et al, PNAS 2010<sup>160</sup>).

### **Aumentata espressione di IL-33 e diminuiti livelli di ST2L nelle IEC ottenute da pazienti affetti da UC.**

Per esaminare ulteriormente l'espressione epiteliale di IL-33 e ST2 nelle IBD, IEC sono state isolate da campioni di tessuto chirurgico provenienti da pazienti affetti da UC e CD e da CON non infiammati, e, quindi, sono stati misurati i livelli di espressione di IL-33 e ST2. L'analisi tramite RT-PCR ha confermato il quadro apparente alla immunohistochimica: nelle IEC provenienti da pazienti con UC i livelli di mRNA per IL-33 erano incrementati rispetto ai valori misurati nelle IEC raccolte da pazienti affetti da CD o dai CON (entrambi  $P < 0.05$ ) (Fig. 9A, pannello superiore). I Western blot hanno rivelato un'abbondanza di f-IL-33 nelle IEC da UC in confronto a quelle da CD e CON, con scarsa modificazione post-translazionale verso la forma clivata, che era ugualmente bassa in tutti i gruppi (Fig. 9A, pannello inferiore). I livelli totali di mRNA per ST2 sono risultati diminuiti nelle IEC da UC vs. CON ( $P < 0.05$ ), mentre una sensibile variabilità è stata riscontrata nelle cellule ottenute da pazienti affetti da CD (Fig. 9B, pannello superiore). Più specificamente, ST2L è risultato costantemente più espresso nelle IEC dei CON rispetto alle UC ( $P < 0.05$ ), mentre sST2 si è dimostrato leggermente più abbondante nelle IEC raccolte nei pazienti affetti da IBD (Fig. 10 e 9B, pannello inferiore). Nell'insieme questi dati indicano che f-IL-33 è la forma predominante espressa dalle IEC durante UC attiva, e che la perdita di ST2 durante gli eventi infiammatori caratteristici delle IBD è dovuto alla diminuzione di ST2L. Inoltre, la modesta, ma comunque aumentata presenza di sST2 nelle IEC da UC è in accordo con i risultati precedentemente menzionati, indicanti elevati livelli complessivi di ST2 nella mucosa colica infiammata durante UC attiva.



**Fig. 9.** *f-IL-33 é abbondantemente espressa e ST2L é ridotto nelle IEC dei pazienti affetti da UC.* IEC sono state raccolte da tessuto colico a tutto spessore infiammato di pazienti affetti da UC (N=18) e CD (N=10), e CON non infiammati (N=7). Sono stati estratti l'RNA totale e le proteine e quindi processate per l'esecuzione di RT-PCR e WB. (A) Livelli di mRNA di IL-33 (pannello superiore) e ST2 (pannello inferiore). L'analisi statistica é stata eseguita tramite test one-way ANOVA. (B) Western blot rappresentativo di 4 diversi esperimenti per IL-33 (pannello superiore) e ST2 (pannello inferiore) di IEC raccolte da colon coinvolte da IBD e CON non infiammati.  $\beta$ -actina é stata utilizzata come controllo interno di carico. (Dati pubblicati in Pastorelli L. et al, PNAS 2010<sup>160</sup>).

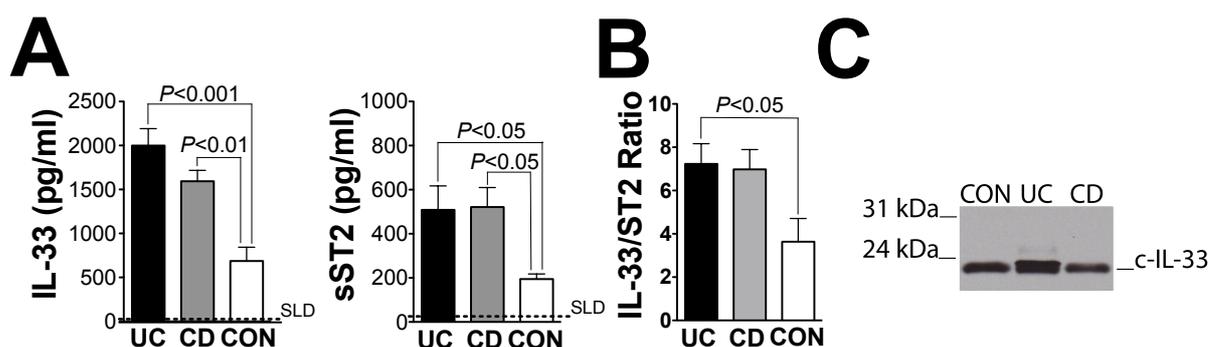


**Fig. 10.** L'mRNA per ST2L é specificamente ridotto nelle IEC nei pazienti affetti da UC. IEC sono state isolate da tessuto colico di pazienti affetti da UC (N=6) e CD (N=7), e CON non infiammatori(N=9). L'RNA totale é stato estratto e processato per l'esecuzione di RT-PCR. (A,B) Livelli di mRNA di sST2 (A) e ST2L (B). L'analisi statistica é stata eseguita utilizzando i test one-way ANOVA e di Tukey per comparazioni multiple. (Dati pubblicati in Pastorelli L. et al, PNAS 2010<sup>160</sup>).

### **I livelli sierici di IL-33 e ST2 sono aumentati nelle IBD.**

Dopo aver stabilito che sia IL-33 che ST2 sono aumentati localmente nella mucosa colica infiammata durante le IBD, in modo particolare nella UC, abbiamo valutato se queste proteine potessero avere un ruolo come biomarker circolanti per la UC o il CD. I livelli sierici di IL-33 e sST2 sono stati misurati nei pazienti affetti da IBD con malattia attiva e nei controlli sani (CON). I livelli di IL-33 sono risultati elevati nei pazienti affetti da UC e CD rispetto ai CON ( $P < 0.001$  e  $P < 0.01$ , rispettivamente); e anche se é stata osservata una tendenza verso valori piú elevati nella UC rispetto al CD, questa differenza non é risultata statisticamente significativa (Fig. 11A, pannello di sinistra). Similarmente, anche i livelli di sST2 circolante sono risultati piú elevati sia nella UC che nel CD rispetto ai CON (both  $P < 0.05$ ) (Fig. 11A, pannello di destra). Considerato il noto ruolo di sST2 come decoy receptor, abbiamo anche calcolato il

rapporto tra i valori di IL-33 e sST2 per ogni soggetto, per avere una stima della potenziale biodisponibilità dell'IL-33 circolante. Sia nei pazienti affetti da UC che in quelli affetti da CD sono stati misurati rapporti IL-33/sST2 più elevati rispetto ai CON, anche se solo nei pazienti affetti da UC questa differenza è risultata statisticamente significativa ( $P < 0.05$ ) (Fig. 11B). Solo la forma di IL-33 di peso molecolare pari a 20-22 kDa è stata riscontrata nel siero umano (Fig. 11C), dimostrando che c-IL-33 probabilmente rappresenta l'unica forma circolante di IL-33, e anche se la concentrazioni sieriche sia di c-IL-33 che di sST2 sono risultate più elevate nei pazienti affetti da IBD, il rapporto IL-33/sST2, a livello sistemico, è stato riscontrato aumentato solo nella UC.

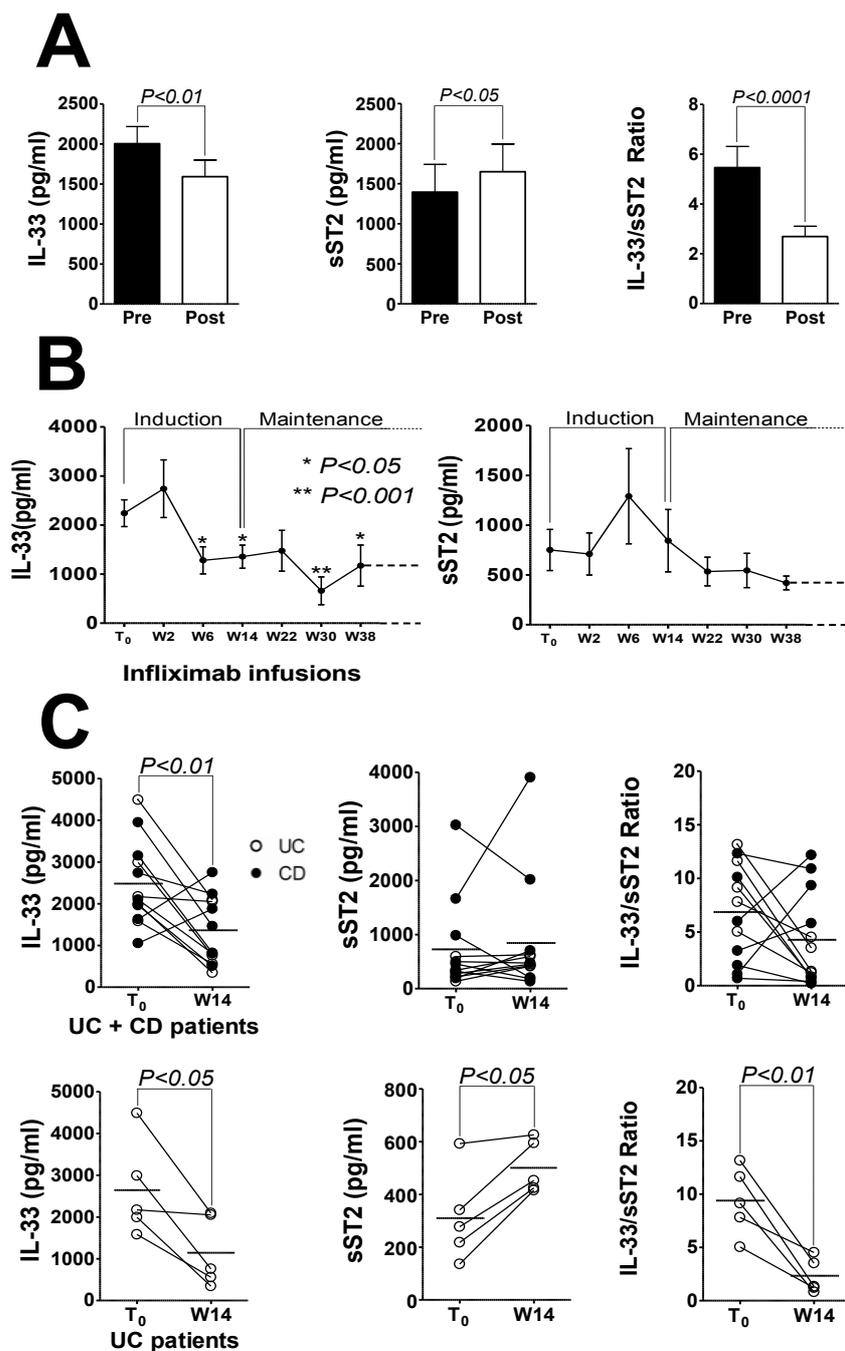


**Fig. 11.** I livelli circolanti di IL-33 e sST2 sono significativamente aumentati nelle IBD, e solo la forma clivata di IL-33 è rintracciabile nel siero umano. Campioni di siero sono stati ottenuti da pazienti affetti da UC (N=59) e CD (N=72), e CON sani (N=19). Le concentrazioni di IL-33 e sST2 sono stati misurati tramite ELISA e Western. (A) Concentrazioni sieriche di IL-33 (pannello di sinistra), sST2 (pannello di destra), e (B) rapporto IL-33/sST2. L'analisi statistica è stata eseguita tramite test di Kruskal-Wallis. Limite punteggiato=limite di detezone degli standard (SLD). (C) Western blot rappresentativo di 4 diversi esperimenti per IL-33 di siero proveniente da pazienti affetti da IBD e CON sani. (Dati pubblicati in Pastorelli L. et al, PNAS 2010<sup>160</sup>).

## **La terapia con anticorpi anti-TNF modula i livelli circolanti di IL-33 e ST2 nelle IBD.**

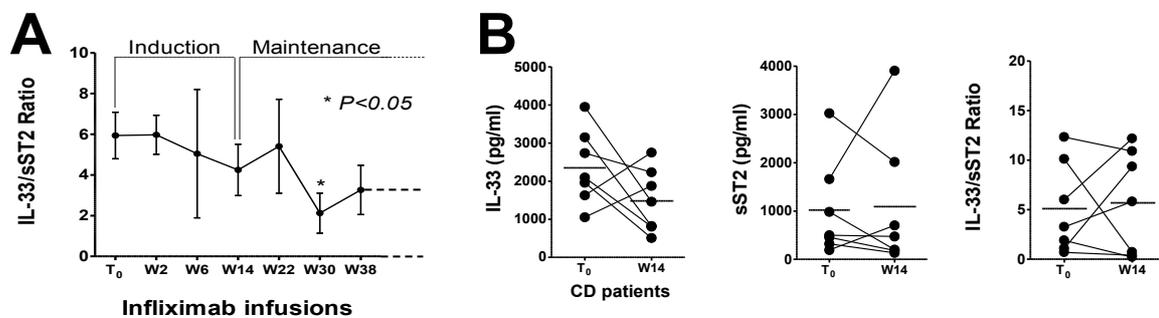
Successivamente abbiamo valutato se i livelli circolanti di IL-33, sST2 e/o il rapporto IL-33/sST2 potessero essere modulati durante la terapia con anticorpi monoclonali anti-TNF (Infliximab). Per valutare gli effetti acuti del blocco del TNF, campioni di siero sono stati raccolti da pazienti affetti da IBD 1h prima (Pre-Infusione) e 2h dopo (Post-Infusione) dell'infusione di Infliximab. La neutralizzazione del TNF è stato in grado di ridurre acutamente i livelli sistemici di IL-33 ( $P<0.01$ ), e di incrementare quelli di sST2 ( $P<0.05$ ), riducendo il rapporto IL-33/sST2 ( $P<0.0001$ ) (Fig. 12A). Quindi, abbiamo esplorato la modulazione dei livelli di IL-33/sST2 durante il trattamento a lungo termine con anti-TNF, dalla Pre-Infusione (T0), durante il regime di induzione, e attraverso la fase di mantenimento (fino alla settimana 38). I livelli di IL-33 sierica, misurati prima dell'ultima infusione di farmaco alla sesta settimana (wk 6) sono risultati diminuiti, rispetto al baseline (T0) ( $P<0.05$ ). IL-33 circolante è quindi rimasta ridotta durante la terapia di mantenimento, con infusioni eseguite alla settimana 14 (wk 14), 30 (wk 30) e 38 (wk 38) (Fig. 12B, pannello di sinistra). In contrasto, sST2 non ha mostrato cambiamenti significativi rispetto al T0 durante la terapia con anti-TNF (Fig. 12B, pannello di destra); comunque, una riduzione del rapporto IL-33/sST2 rispetto al T0 è stata raggiunta alla wk 30 ( $P<0.05$ ) (Fig. 13A). L'Analisi dei dati individuali dal T0 fino alla fine del trattamento di induzione (wk 14), ha dimostrato una modulazione differenziale dell'asse IL-33/sST2 nella UC rispetto al CD. Infatti, dopo il regime di induzione alla wk 14, i livelli di IL-33 si sono ridotti nell'intero gruppo delle IBD ( $P<0.01$ ) (Fig. 12C, pannello superiore); separando i dati per sottogruppi di malattia, la significatività statistica è stata mantenuta nella UC ( $P<0.05$ ), ma non nel CD (Fig. 12C, pannello in basso a sinistra e 13B, pannello

sinistra). Allo stesso modo, nessuna differenza è stata riscontrata nei livelli di sST2 e del rapporto IL-33/ST2 nell'intero gruppo delle IBD (Fig. 12C, pannello superiore al centro & superiore destro); di contro, nella UC, ma non CD, è stato possibile dimostrare un incremento nei livelli di sST2 circolante ( $P<0.05$ ) e una diminuzione del rapporto IL-33/sST2 ( $P<0.01$ ) (Fig. 12C, pannelli inferiore al centro & inferiore a destra e Fig. 13B pannello centrale & sinistro). Quindi, questi dati hanno evidenziato che la neutralizzazione del TNF modula l'asse IL-33/ST2, in vivo, nell'uomo, durante uno stato di malattia, come le IBD. Inoltre, la terapia con anti-TNF ha avuto sia effetti acuti che nel lungo termine sui livelli sistemici di IL-33 e ST2, con maggiore impatto sulla UC che sul CD.



**Fig. 12.** *La terapia con anti-TNF modula i livelli sierici di IL-33 e sST2 nei pazienti affetti da IBD.* Campioni di siero raccolti da pazienti con IBD (UC N=9; CD N=11) sottoposti a terapia con Infliximab (5-10 mg/kg, e.v.) sono stati utilizzati per misurare i livelli di IL-33 e sST2 mediante ELISA. (A) Livelli di IL-33 (pannello di sinistra), sST2 (pannello centrale), e rapporto IL-33/sST2 (pannello di destra) osservati 1h prima (Pre) e 2h dopo (Post) l'infusione di Infliximab. (B) IL-33 (pannello di sinistra) e sST2 (pannello di destra) misurati 1h prima di ogni infusione di Infliximab durante il

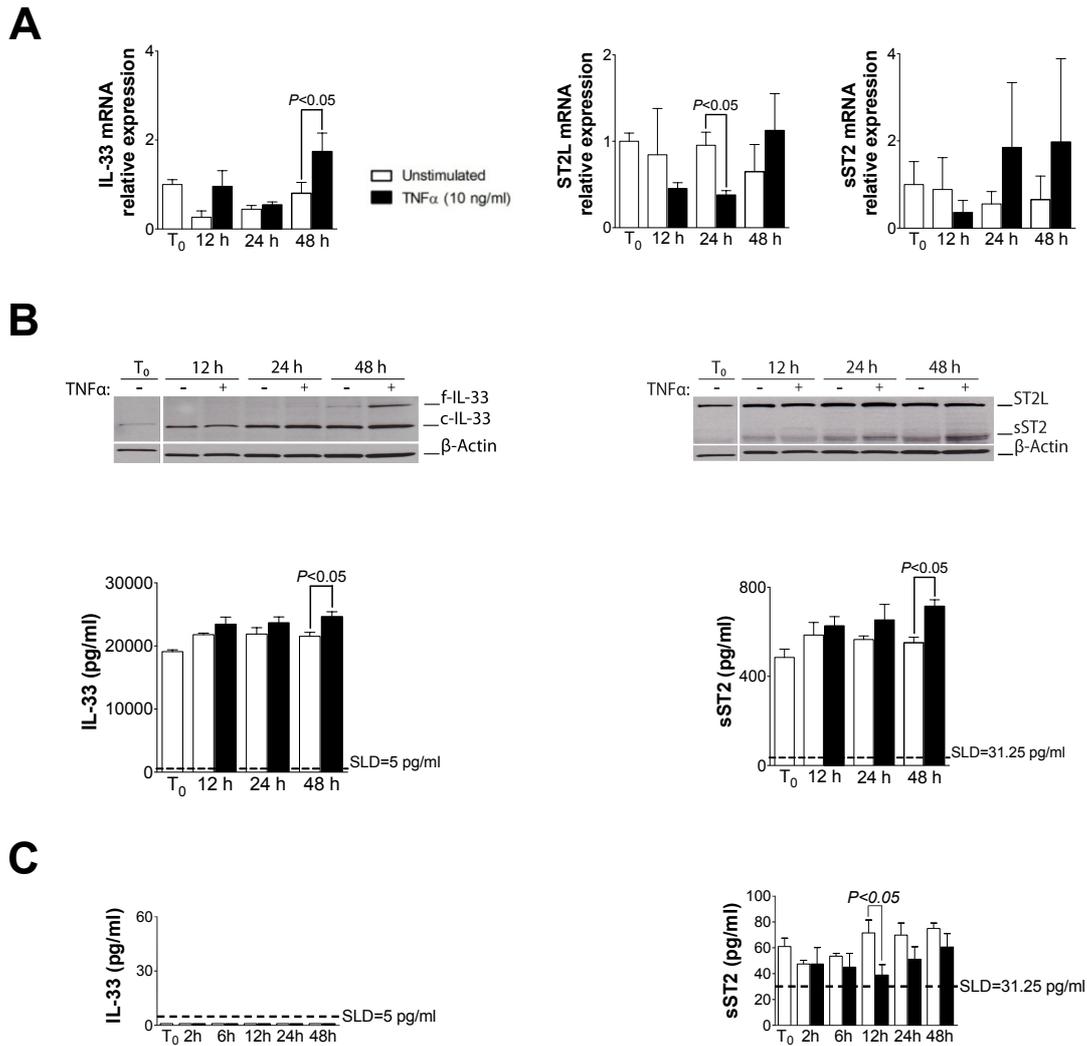
trattamento ( $T_0$ -N=15; W2-N=15; W6-N=11; W14-N=12; W22-N=10; W30-N=9; W38-N=5); W=settimana. (C) Dati individuali dei pazienti al  $T_0$  e al termine del regime di induzione (W14) di pazienti affetti da CD e UC (N=12). IL-33 (pannelli di sinistra), sST2 (pannelli centrali), e rapporto IL-33/sST2 (pannelli di destra) per tutti i pazienti affetti da IBD (riga superiore) e solo per quelli affetti da UC (N=5) (riga inferiore). L'analisi statistica é stata eseguita attraverso test t per dati appaiati. (Dati pubblicati in Pastorelli L. et al, PNAS 2010<sup>160</sup>).



**Fig. 13.** Il trattamento con anti-TNF modula il rapporto IL-33/sST2 nei pazienti affetti da IBD, con effetto maggiore nella UC rispetto al CD. Campioni di siero sono stati ottenuti da pazienti affetti da UC (N=9) e CD (N=11) sottoposti a terapia con Infliximab (5-10 mg/kg, e.v.). Il sangue é stato prelevato 1h prima e 2h dopo ogni infusione (numero totale di infusioni=100). I livelli sierici di IL-33 e sST2 sono stati misurati tramite ELISA. (A) Rapporto IL-33/sST2 misurato 1h prima di ogni infusione di Infliximab durante tutto il trattamento ( $T_0$ -N=15; W2-N=15; W6-N=11; W14-N=12; W22-N=10; W30-N=9; W38-N=5); W=settimana. (B) Dati individuali dei pazienti affetti da CD (N=7) al  $T_0$  e alla fine del regime di induzione (W14). L'analisi statistica é stata eseguita attraverso test t per dati appaiati. (Dati pubblicati in Pastorelli L. et al, PNAS 2010<sup>160</sup>).

### **La stimolazione con TNF modula direttamente IL-33 e ST2 nelle IEC.**

Per studiare gli effetti diretti del TNF sui livelli epiteliali di IL-33 e ST2, abbiamo eseguito esperimenti in vitro utilizzando le cellule HT-29 stimulate con rhTNF. Quantità aumentate di mRNA per IL-33 e della proteina f-IL-33 sono stati osservati dopo la stimolazione con TNF per 48h (Fig. 14A,B, pannelli di sinistra); di particolare interesse, IL-33 è stata mantenuta intracellulare, in assenza di livelli misurabili nel supernatante delle colture cellulari, durante la stimolazione (Fig. 14A,B,C, pannelli di sinistra). Un simile pattern di espressione è stato osservato nelle IEC isolate dai pazienti affetti da UC, nelle quali elevati livelli di f-IL-33 sono stati identificati intracellularmente, con una minima modulazione della forma clivata (Fig. 9A, pannello inferiore). I livelli intracellulari di sST2 sono stati rilevati incrementati a 24 e 48h di stimolazione con TNF (Fig. S8A,B, pannelli di destra), similmente a quanto descritto per il pattern di espressione di sST2 nelle IEC da pazienti affetti da UC (Fig. 9B). Inoltre, nessun chiaro cambiamento di ST2L è stato osservato dopo lo stimolo con TNF (Fig. 14A,B, pannello di destra). Questi dati suggeriscono che la stimolazione con TNF delle IEC induce l'accumulo intracellulare, ma non la secrezione, di f-IL-33, e allo stesso tempo aumenta sST2 intracellulare.



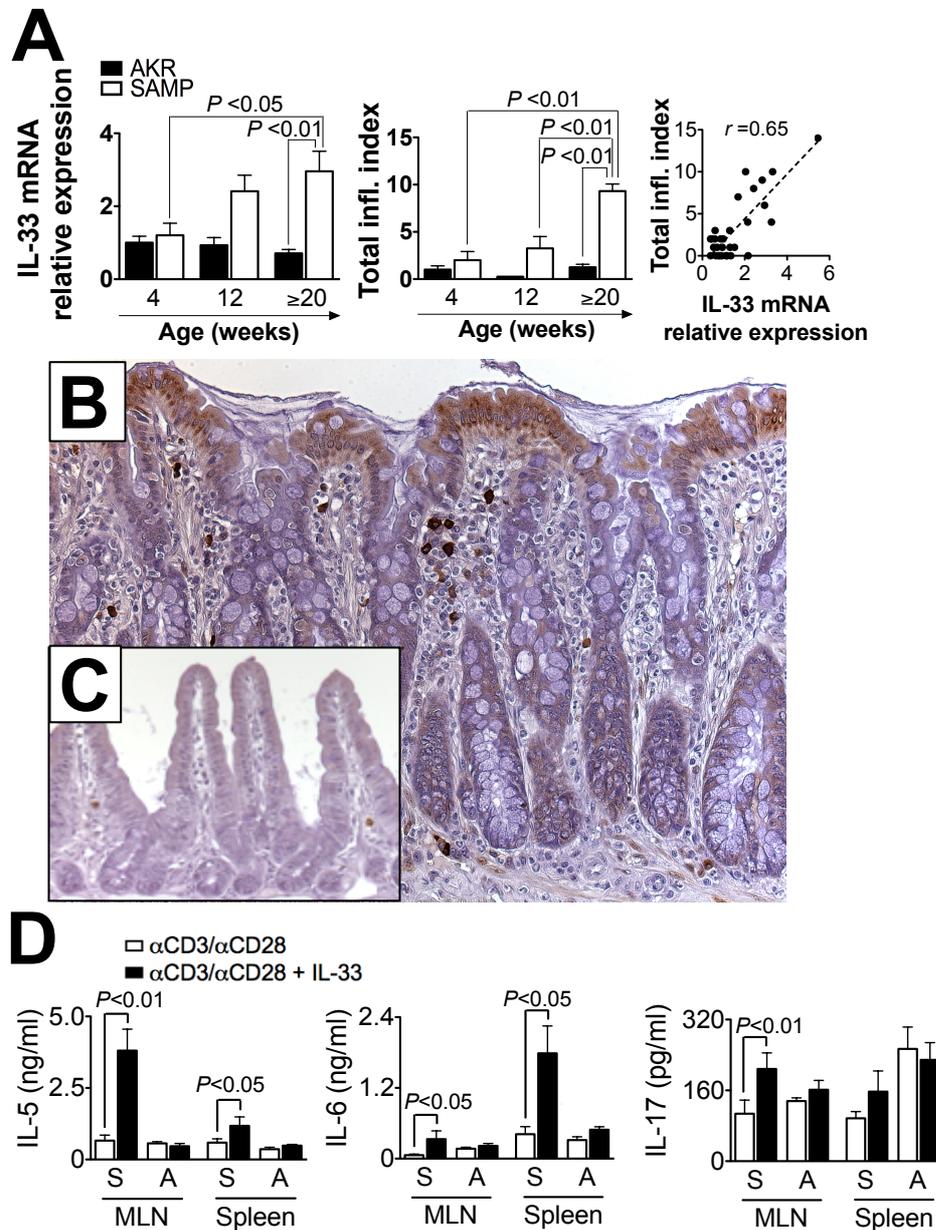
**Fig. 14.** La stimolazione con TNF aumenta l'espressione intracellulare di f-IL-33 e sST2 nelle IEC. Cellule HT-29 sono state coltivate +/- TNF (10 ng/ml) per 0, 2, 6, 12, 24, e 48h (N=4/condizione). L'RNA totale e le proteine sono stati estratti dalle IEC e quindi processate per l'esecuzione di RT-PCR, WB e ELISA, e i supernatanti raccolti per test ELISA. (A) I livelli di mRNA per IL-33 (pannello di sinistra), sST2 (pannello centrale) e ST2L (pannello di destra) sono stati normalizzati rispetto a GAPDH ed espressi come rapporti di espressione rispetto ai campioni non stimolati. (B) Western blots (pannelli superiori) ed ELISA (pannelli inferiori) su lisati cellulari di HT-29 per IL-33 (pannelli di sinistra) e ST2 (pannelli di destra) (C) Livelli di IL-33 (pannello di sinistra) e sST2 (pannello di destra) misurati con ELISA nei supernatanti

delle colture di cellule HT-29. L'analisi statistica é stata eseguita attraverso test t per dati appaiati. Linea punteggiata = SLD. (Dati pubblicati in Pastorelli L. et al, PNAS 2010<sup>160</sup>).

### **IL-33 é incrementata e correla con la severitá di malattia in una enterite sperimentale a componente mista Th1/Th2.**

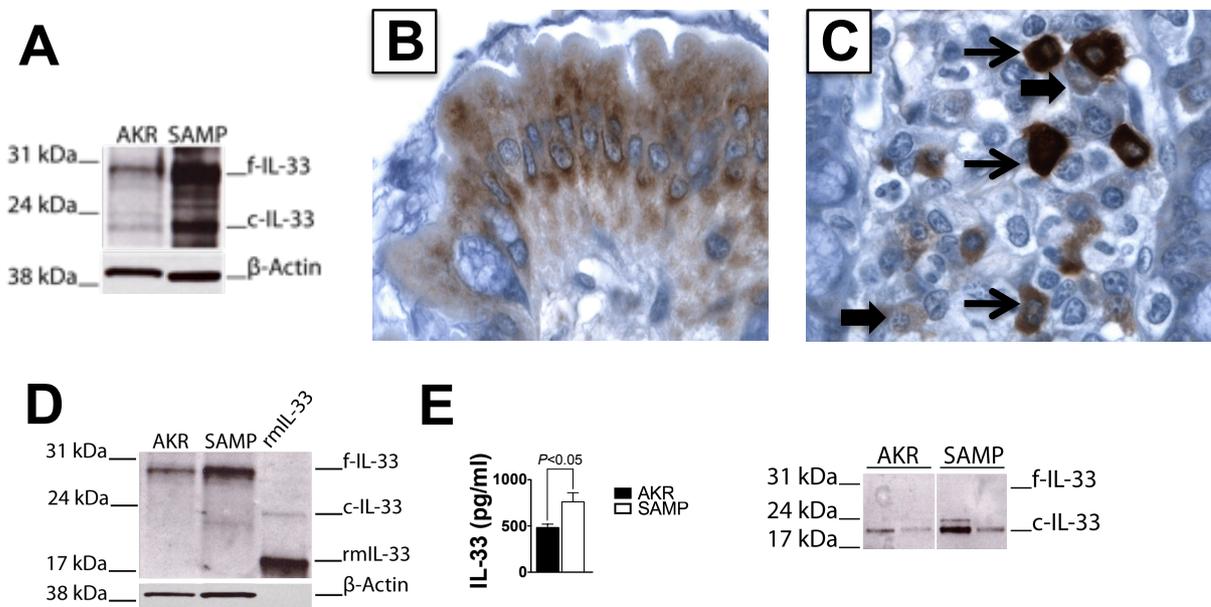
Per determinare se IL-33 contribuisce allo sviluppo dell'infiammazione cronica intestinale, i topi SAMP sono stati studiati sia in uno stato pre-infiammatorio (4 settimane di età), all'esordio dell'infiammazione (12 settimane di età) e durante la malattia conclamata (>20 settimane di età) (19). Livelli di espressione di IL-33, sia mRNA che proteici (sia f- che c-IL-33), in progressivo aumento con l'età, sono stati osservati negli ilei a tutto spessore dei topi SAMP rispetto ai topi AKR (linea murina parentale di controllo) (a >20 settimane di età,  $P<0.01$ ) (Fig. 15A, pannello sinistro e 16A), con i livelli di mRNA in correlazione positiva con la severitá dell'infiammazione intestinale (Fig. 15A, pannello centrale e di destra). In accordo con i dati sull'uomo, IL-33 era localizzata nei LPMC (con caratteristiche morfologiche di macrofagi e plasmacellule) e nelle IEC negli ilei infiammati dei topi SAMP ed era virtualmente assente nei topi AKR (Fig. 15B,C e 16C). Solo f-IL-33 é stata individuata nelle IEC, mentre c-IL-33 circolante era aumentata nei SAMP rispetto agli AKR ( $P<0.05$ ) ed era l'unica forma rintracciabile nel siero (Fig. 16D,E). Inoltre, la stimolazione con IL-33 di cellule isolate dai linfonodi mesenterici e dalle milze dei topi SAMP (ma non degli AKR), pre-attivate con anti-CD3/CD28, é stata in grado di indurre potentemente IL-5 e IL-6 ( $P<0.05$ ) (Fig. 15D, pannelli di sinistra e centrale), citochine note per il loro importante ruolo nella patogenesi dell'enterite di questo modello animale (20, 21). Le cellule dei linfonodi mesenterici dei topi SAMP, ma non gli splenociti, stimolati con IL-

33 hanno, inoltre, prodotto alti livelli di IL-17 ( $P < 0.01$ ) (Fig. 15D, pannello di destra), suggerendo che IL-33 potrebbe iniziare risposte pro-infiammatorie e immuni di tipo Th2, critiche per la patogenesi dell'infiammazione cronica intestinale.



**Fig. 15.** Livelli aumentati di IL-33 correlano con la severit  dell'ileite nei topi SAMP e inducono la produzione di citochine proinfiammatorie dalle cellule immuni della mucosa. Gli ilei di topi SAMP e AKR di pari et  ( $N \geq 4$ /et ) sono stati raccolti e processati per l'estrazione di RNA e valutazione istologica ed immunoistochimica. Cellule estratte da MLN e milze di topi SAMP e AKR di 20 settimane ( $N = 5$ /gruppo)

sono state coltivate +/- IL-33 (10 ng/ml) in presenza di anti-CD3 ( $\alpha$ CD3)/ $\alpha$ CD28 per 48h. (A) Regressione lineare (pannello di destra) dei livelli di mRNA per IL-33 normalizzati alla  $\beta$ -actina (pannello di sinistra) e gli indici di infiammazione totale (Total infl. Index, pannello centrale). (B,C) Immunoistochimica per IL-33 negli ilei di SAMP (B) e AKR (C). (D) Livelli di IL-5, IL-6 e IL-17 nelle colture di cellule estratte da MLN e milze. SAMP, S. AKR, A. L'analisi statistica é stata eseguita mediante one-way ANOVA, regressione lineare e t test per dati appaiati. Ingrandimento originale di (B,C) X20. (Dati pubblicati in Pastorelli L. et al, PNAS 2010<sup>160</sup>).



**Fig. 16.** La localizzazione e l'espressione di IL-33 nell'enterite dei SAMP enteritis riproducono quelle dell'IBD umana. Gli ilei di topi SAMP ed AKR di 20 settimane sono stati raccolti ( $N \geq 4$ ), e processati per l'estrazione proteica o per la valutazione istologica ed immunoistochimica. IEC sono state isolate dall'ileo e il sangue prelevato dai topi sperimentali. (A,D) Western blot, rappresentativi di 4 diversi esperimenti, per IL-33 su tessuto ileale (A) e sulle IEC (D). (B,C) Immagine ad alto ingrandimento dell'immunoistochimica per IL-33 dell'ileo dei topi SAMP che dimostra una localizzazione citoplasmatica e perinucleare nelle IEC (B) e nei macrofagi

(frecce) e plasmacellule (frecce spesse) della lamina propria (C). (E) IL-33 é stata misurata nel siero di topi SAMP ed AKR mediante ELISA specifici (pannello di sinistra) e individuata attraverso Western blot (pannello di destra). (Dati pubblicati in Pastorelli L. et al, PNAS 2010<sup>160</sup>).

## **DISCUSSIONE**

Sempre piú dati hanno supportato il ruolo critico della famiglia dei recettori Toll/IL-1 nella patogenesi delle IBD <sup>161, 162</sup>. Nel presente studio riportiamo la specifica disregolazione di una citochina recentemente caratterizzata, appartenente alla famiglia dell'IL-1, IL-33, e del suo recettore, ST2, nell'infiammazione cronica intestinale. Inoltre, valutiamo la potenziale rilevanza biologica delle isoforme di IL-33 e ST2 <sup>129, 130</sup> in una malattia specifica. La specificitá dell'aumento di IL-33 nella UC e nell'enterite caratteristica dei topi SAMP é in accordo con il relativo sbilanciamento verso una polarizzazione di tipo Th2 nella UC, al contrario di quello che succede nel CD, che é principalmente caratterizzato da un fenotipo Th1 <sup>163</sup>, e nei topi SAMP, un modello di infiammazione intestinale a componente mista Th1/Th2 <sup>155</sup>. Pertanto é ragionevole pensare che l'aumento di espressione di IL-33 rappresenti uno dei piú precoci eventi nella patogenesi delle IBD e che possa polarizzare l'infiammazione intestinale verso un fenotipo Th2/UC o piuttosto un fenotipo Th1/CD.

Durante la UC attiva e l'enterite dei topi SAMP, IL-33 é marcatamente overespressa, principalmente nelle IEC e negli LPMC infiltranti la mucosa, e anche se simili cellule esprimono ST2, il pattern di espressione é chiaramente differente nei CON non infiammati, rispetto ai pazienti affetti da IBD. Nei CON non infiammati, ST2 é principalmente riscontrato nell'epitelio, mentre nella mucosa colica cronicamente infiammata, sia nella UC che nel CD, la fonte maggiore di ST2 si ritrova nelle cellule infiammatorie della lamina propria, e l'espressione é virtualmente assente nelle IEC. La diminuzione o l'assenza di ST2 nelle IEC, sia nella UC che nel CD, potrebbe essere specifica per le IBD, in quanto altri tipi, non specifici, di colite, come le coliti infettive e le diverticoliti, non sembrano presentaro questo deficit specifico dell'epitelio.

Certamente, l'epitelio é una componente critica del sistema immune mucosale, in quanto rappresenta una barriera primaria tra l'organismo ospite e gli antigeni ambientali. Le IEC hanno la capacità di riconoscere i patogeni attraverso i recettori dell'immunità innata, rispondendo con il rilascio di peptidi antimicrobici <sup>164</sup>, e modulando gli eventi iniziali della risposta immune attraverso, per esempio, la secrezione di mediatori pro- e anti-infiammatori e citochine <sup>165</sup>. L'aumento dell'espressione di IL-33 specificamente nelle IEC nella UC infiammata e negli ilei dei SAMP, in particolare della forma di 30 kDa, dotata di maggiori proprietà pro-infiammatorie <sup>129</sup>, potrebbe essere la conseguenza dell'interazione con microorganismi sia commensali che patogeni, innescando le risposte infiammatorie e perpetuando una colite cronica, mediata da risposte Th2. Al momento attuale, le infestazioni elmintiche, che classicamente innescano risposte di tipo Th2, sono l'unico stimolo attualmente identificato a poter indurre l'espressione intestinale di IL-33, evento ritenuto di importanza cardinale per poter debellare l'infestazione <sup>166</sup>. Inoltre, numerosi studi di genetica nei pazienti affetti da IBD e in modelli murini di colite enfatizzano il ruolo dei difetti nelle funzioni dell'immunità innata nella generazione di stress epiteliale, di disfunzioni di barriera e della conseguente insorgenza di infiammazione intestinale cronica <sup>167-169</sup>. In questo contesto, IL-33 potrebbe anche avere il ruolo di "allarmina" epiteliale <sup>127, 129</sup>; sempre più dati suggeriscono che in maniera simile a HMGB1 e IL-1 $\alpha$ , IL-33 possa essere rilasciata come "segnale di pericolo" dalle cellule danneggiate, sotto stress o necrotiche, in modo tale da allertare il sistema immunitario di un pericolo locale. I livelli di mRNA per IL-33 correlano con la severità dell'infiammazione intestinale, e, in vitro, la stimolazione con IL-33 delle cellule isolate dai linfonodi mesenterici, provenienti principalmente dall'intestino infiammato, aumenta marcatamente la produzione di IL-5 e IL-6, citochine con un ruolo critico nella patogenesi dell'enterite dei SAMP, dato

che trattamenti con anticorpi neutralizzanti anti-IL-5 e anti-IL-6 migliorano significativamente l'infiammazione in questo modello murino <sup>170, 171</sup>. Inoltre, anche se il ruolo nell'ileite dei SAMP deve essere ancora definito, è ben noto che IL-17 e le risposte immuni Th17 giocano un ruolo centrale nell'infiammazione cronica intestinale <sup>172</sup>, e l'induzione di questa citochina da parte di IL-33 è in accordo con quanto descritto in altri sistemi d'organo <sup>138, 173</sup>. Pertanto, IL-33 prodotta localmente potrebbe rappresentare un importante mediatore primario nel promuovere una robusta risposta immune mucosale pro-infiammatoria, capace di scatenare l'infiammazione intestinale cronica. Forse in risposta all'aumento di IL-33 o forse per un semplice difetto intrinseco di ST2, abbiamo osservato una diminuzione significativa di ST2L, il recettore transmembrana di IL-33, nell'epitelio della UC. Di contro, sST2 è aumentato sia nella biopsie coliche che nella circolazione sistemica dei pazienti affetti da UC, essendo prodotta principalmente dagli LPMC, in minor misura dalle IEC, e potenzialmente dalle cellule mononucleate circolanti sistemicamente. Infatti, livelli sierici incrementati di sST2 (e IL-33) potrebbero essere indicativi di una malattia attiva, e servire come un potenziale biomarker per le IBD, in particolare per la UC, in cui il rapporto IL-33/sST2 è risultato significativamente aumentato.

Un importante concetto riguardo il sistema IL-33/ST2, condiviso da altri membri della famiglia dell'IL-1 (ad esempio, IL-1 e IL-18) è il bilancio tra la citochina, recettore, e antagonista del recettore/recettore trappola/regolatori negativi che influenza la bioattività complessiva della citochina <sup>174</sup>. Uno sbilanciamento sia dei sistemi dell'IL-1 che dell'IL-18 è stato proposto come uno dei meccanismi alla base della patogenesi della UC e del CD, rispettivamente <sup>161, 175</sup>. È stato riportato che sST2 possiede proprietà anti-infiammatorie, come l'inibizione del recettore di IL-1 di tipo I e di TLR4 <sup>176</sup>; inoltre, sST2 è un recettore trappola, capace di legarsi a IL-33, e quindi

di competere con ST2L<sup>177</sup>. Certamente, anche se abbiamo trovato un rapporto IL-33/ST2 significativamente aumentato, e pertanto la quota di IL-33 biodisponibile dovrebbe essere maggiore nell'UC, elevati livelli di sST2 sono riscontrabili sia nella mucosa che nel siero dei pazienti con UC rispetto ai CON. Ad oggi, comunque, i diretti effetti di IL-33 sulla regolazione sia del suo signaling e dell'espressione del suo recettore "trappola" non sono ancora stati stabiliti. A tal proposito, è stato riportato che il legame tra una citochina e il suo recettore solubile può risultare nell'incremento della sua emivita e della sua bioattività complessiva; questo fenomeno, per esempio, è stato descritto per il sistema IL-6/recettore solubile di IL-6R<sup>178</sup>. Anche se questo tipo di interazione tra IL-33 e sST2 non è mai stato riportato, questa possibilità esiste ancora. Abbiamo riscontrato, sia nel siero umano che murino, solo c-IL-33 che ha una bioattività marcatamente diminuita rispetto a f-IL-33<sup>127, 129</sup>, suggerendo l'esistenza di proteasi extracellulari specifiche, capaci di clivare f-IL-33 di 30 kDa in forme di 20-22 kDa, dato che quantità significative di f-IL-33 sono state ritrovate nella mucosa infiammata dei pazienti affetti da UC e dei topi SAMP, particolarmente a livello intracellulare nelle IEC. Può essere pertanto speculato che la presenza di questo meccanismo possa ridurre i complessivi, deleteri effetti che possono essere innescati da alti livelli sistemici di IL-33, come quanto accade nello shock anafilattico indotto da IL-33<sup>135</sup>.

TNF ha la capacità di regolare la produzione *in vitro* di IL-33<sup>126, 138</sup>. Pertanto, ci si è presentata l'opportunità ideale per valutare se IL-33 e/o ST2 possono essere modulati dal TNF *in vivo*, dato che la terapia anti-TNF rappresenta, al momento attuale, lo "stato dell'arte" per il trattamento delle IBD<sup>106</sup>. Nel complesso, i nostri risultati dimostrano che la neutralizzazione del TNF ha la capacità di modificare i livelli sia di IL-33 che di sST2 nella malattia umana, e ha sia effetti acuti che nel lungo termine nei pazienti affetti da IBD; infatti, a livello sistemico, è in grado di

ridurre le concentrazioni di IL-33 e di aumentare quelle di sST2, risultando in una complessiva riduzione nel rapporto IL-33/sST2. Un maggiore effetto della modulazione di IL-33/sST2 è stata osservata nella UC rispetto al CD in seguito al trattamento con Infliximab, suggerendo un differente meccanismo di risposta alla terapia anti-TNF nelle due malattie. Infatti, in tutti i pazienti affetti da UC che sono stati valutati, la somministrazione di anti-TNF ha significativamente diminuito i livelli circolanti di IL-33, mentre nel CD la risposta è stata meno prevedibile. Inoltre, i livelli sierici di sST2 nella UC, ma non nel CD, sono uniformemente aumentati in seguito alla terapia con anti-TNF, anche se il range dei livelli “baseline” di sST2, prima del trattamento, era molto meno omogeneo nel CD rispetto alla UC. E’ pertanto ipotizzabile che la regolazione TNF/anti-TNF-dipendente dell’asse IL-33/ST2 sia differente nella UC rispetto al CD, con profilo molto più prevedibile, consistente nella riduzione del rapporto IL-33/ST2 nella UC.

I nostri esperimenti *in vitro* experiments hanno mostrato che il TNF induce l’accumulo intracellulare di f-IL-33, ma non la sua secrezione extracellulare da parte delle IEC. Questi risultati sono in accordo con precedenti studi che hanno dimostrato che il TNF da solo, o in sinergia con IL-1 $\beta$  è in grado di aumentare la produzione di IL-33 da parte di fibroblasti<sup>138</sup> e adipociti/preadipociti<sup>126</sup>, e nei quali è stata riscontrata solo una produzione intracellulare di IL-33, ma nessuna secrezione. Pertanto, un modello a 2 stadi potrebbe essere ipotizzato per l’induzione della produzione di IL-33 da parte del TNF: TNF potrebbe essere uno stimolo importante alla produzione intracellulare di IL-33, ma un meccanismo diverso potrebbe essere responsabile della secrezione attiva di IL-33, come altre citochine, o come l’attivazione di specifici “pattern recognition receptor” (PRR), recettori dell’immunità innata, o come proposto da altri, il danno cellulare diretto<sup>127, 129</sup>. In alternativa, la secrezione di IL-33 potrebbe essere ristretta a specifici tipi cellulari e, nelle IEC come in altre cellule,

IL-33 intracellulare potrebbe agire principalmente come un fattore nucleare o come un'allarmina <sup>140</sup>.

Riassumendo, il nostro studio fornisce evidenze che IL-33 e ST2 potrebbero essere mediatori critici nella patogenesi della UC, nello specifico, dimostrando uno sbilanciamento tra IL-33 e ST2. Nel contesto della UC, abbiamo anche suggerito che le isoforme di IL-33 potrebbero differenzialmente contribuire alla patogenesi della malattia, con f-IL-33, proveniente dalle IEC capace potentemente di iniziare e sostenere una risposta mucosale locale di tipo Th2, mentre specifiche proteasi extracellulari che clivano IL-33 in forme meno attive da 20-22 kDa. Alti livelli di c-IL-33 si riscontrano invece nel siero dei pazienti affetti da IBD e potrebbero essere utilizzati come biomarker circolanti, in particolare per la UC. Forniamo inoltre il razionale per l'utilizzo di strategie anti-IL-33 per il trattamento della UC. Infatti, questo approccio è stato già utilizzato in modelli murini di infiammazione delle vie aeree e articolare con risultati incoraggianti <sup>173, 177</sup>. La neutralizzazione di IL-33 in modelli sperimentali di colite e in pazienti affetti da UC fornirà la prova definitiva a supporto del ruolo patogenetico del sistema IL-33/ST2 nelle IBD.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Loftus EV, Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004;126:1504-17.
2. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, et al. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* 1996;39:690-7.
3. Malaty HM, Fan X, Opekun AR, et al. Rising incidence of inflammatory bowel disease among children: a 12-year study. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2010;50:27-31.
4. Garcia Rodriguez LA, Gonzalez-Perez A, Johansson S, et al. Risk factors for inflammatory bowel disease in the general population. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2005;22:309-15.
5. Spehlmann ME, Begun AZ, Burghardt J, et al. Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin cohort: results of a nationwide study. *Inflammatory bowel diseases* 2008;14:968-76.
6. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603.
7. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603-6.
8. Van Limbergen J, Russell RK, Nimmo ER, et al. The genetics of inflammatory bowel disease. *The American journal of gastroenterology* 2007;102:2820-31.
9. Ahmad T, Marshall SE, Jewell D. Genetics of inflammatory bowel disease: the role of the HLA complex. *World journal of gastroenterology : WJG* 2006;12:3628-35.

10. Ferguson LR, Huebner C, Petermann I, et al. Single nucleotide polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha gene affects inflammatory bowel diseases risk. *World journal of gastroenterology : WJG* 2008;14:4652-61.
11. Ho GT, Soranzo N, Nimmo ER, et al. ABCB1/MDR1 gene determines susceptibility and phenotype in ulcerative colitis: discrimination of critical variants using a gene-wide haplotype tagging approach. *Human molecular genetics* 2006;15:797-805.
12. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006;314:1461-3.
13. Taylor KD, Targan SR, Mei L, et al. IL23R haplotypes provide a large population attributable risk for Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases* 2008;14:1185-91.
14. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nature genetics* 2007;39:207-11.
15. Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, et al. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nature genetics* 2007;39:596-604.
16. Csongei V, Jaromi L, Safrany E, et al. Interaction of the major inflammatory bowel disease susceptibility alleles in Crohn's disease patients. *World journal of gastroenterology : WJG* 2010;16:176-83.
17. Saitoh T, Fujita N, Jang MH, et al. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature* 2008;456:264-8.
18. Silverberg MS. OCTNs: will the real IBD5 gene please stand up? *World journal of gastroenterology : WJG* 2006;12:3678-81.

19. Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA, et al. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nature genetics* 2004;36:471-5.
20. Stoll M, Corneliussen B, Costello CM, et al. Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease. *Nature genetics* 2004;36:476-80.
21. Dumonceau JM, Adler M, Cremer M, et al. The role of infectious agents in Crohn's disease. *Acta gastro-enterologica Belgica* 1994;57:301-5.
22. Ohkusa T, Nomura T, Sato N. The role of bacterial infection in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Internal medicine* 2004;43:534-9.
23. Tamboli CP, Neut C, Desreumaux P, et al. Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut* 2004;53:1-4.
24. Greenstein RJ. Is Crohn's disease caused by a mycobacterium? Comparisons with leprosy, tuberculosis, and Johne's disease. *The Lancet infectious diseases* 2003;3:507-14.
25. Juste RA, Elguezabal N, Pavon A, et al. Association between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA in blood and cellular and humoral immune response in inflammatory bowel disease patients and controls. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* 2009;13:247-54.
26. Jergens AE, Wilson-Welder JH, Dorn A, et al. *Helicobacter bilis* triggers persistent immune reactivity to antigens derived from the commensal bacteria in gnotobiotic C3H/HeN mice. *Gut* 2007;56:934-40.
27. Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, et al. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1998;115:1405-13.

28. Glasser AL, Boudeau J, Barnich N, et al. Adherent invasive Escherichia coli strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death. *Infection and immunity* 2001;69:5529-37.
29. Gradel KO, Nielsen HL, Schonheyder HC, et al. Increased short- and long-term risk of inflammatory bowel disease after salmonella or campylobacter gastroenteritis. *Gastroenterology* 2009;137:495-501.
30. Pironi L, Bonvicini F, Gionchetti P, et al. Parvovirus b19 infection localized in the intestinal mucosa and associated with severe inflammatory bowel disease. *Journal of clinical microbiology* 2009;47:1591-5.
31. Weinberg I, Neuman T, Margalit M, et al. Epstein-barr virus-related diarrhea or exacerbation of inflammatory bowel disease: diagnostic dilemma. *Journal of clinical microbiology* 2009;47:1588-90.
32. Montgomery SM, Morris DL, Pounder RE, et al. Paramyxovirus infections in childhood and subsequent inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1999;116:796-803.
33. Geerling BJ, Dagnelie PC, Badart-Smook A, et al. Diet as a risk factor for the development of ulcerative colitis. *The American journal of gastroenterology* 2000;95:1008-13.
34. Rainsford KD. Profile and mechanisms of gastrointestinal and other side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *The American journal of medicine* 1999;107:27S-35S; discussion 35S-36S.
35. van der Heide F, Dijkstra A, Weersma RK, et al. Effects of active and passive smoking on disease course of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflammatory bowel diseases* 2009;15:1199-207.
36. Abraham C, Cho JH. IL-23 and autoimmunity: new insights into the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annual review of medicine* 2009;60:97-110.

37. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, et al. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993;75:263-74.
38. Hahm KB, Im YH, Parks TW, et al. Loss of transforming growth factor beta signalling in the intestine contributes to tissue injury in inflammatory bowel disease. *Gut* 2001;49:190-8.
39. Hanauer SB. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12 Suppl 1:S3-9.
40. Ott C, Obermeier F, Thieler S, et al. The incidence of inflammatory bowel disease in a rural region of Southern Germany: a prospective population-based study. *European journal of gastroenterology & hepatology* 2008;20:917-23.
41. Gollop JH, Phillips SF, Melton LJ, 3rd, et al. Epidemiologic aspects of Crohn's disease: a population based study in Olmsted County, Minnesota, 1943-1982. *Gut* 1988;29:49-56.
42. Peyrin-Biroulet L, Loftus EV, Jr., Colombel JF, et al. The natural history of adult Crohn's disease in population-based cohorts. *The American journal of gastroenterology* 2010;105:289-97.
43. Decker GA, Loftus EV, Jr., Pasha TM, et al. Crohn's disease of the esophagus: clinical features and outcomes. *Inflammatory bowel diseases* 2001;7:113-9.
44. Wise PE, Schwartz DA. Management of perianal Crohn's disease. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 2006;4:426-30.
45. Schwartz DA, Loftus EV, Jr., Tremaine WJ, et al. The natural history of fistulizing Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota. *Gastroenterology* 2002;122:875-80.
46. Froehlich F, Juillerat P, Mottet C, et al. Obstructive fibrostenotic Crohn's disease. *Digestion* 2005;71:29-30.

47. Best WR, Beckett JM, Singleton JW, et al. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 1976;70:439-44.
48. Nikolaus S, Schreiber S. Diagnostics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2007;133:1670-89.
49. Heresbach D, Alexandre JL, Branger B, et al. Frequency and significance of granulomas in a cohort of incident cases of Crohn's disease. *Gut* 2005;54:215-22.
50. Munkholm P, Langholz E, Davidsen M, et al. Disease activity courses in a regional cohort of Crohn's disease patients. *Scandinavian journal of gastroenterology* 1995;30:699-706.
51. Ramadas AV, Gunesh S, Thomas GA, et al. Natural history of Crohn's disease in a population-based cohort from Cardiff (1986-2003): a study of changes in medical treatment and surgical resection rates. *Gut* 2010;59:1200-6.
52. Bernell O, Lapidus A, Hellers G. Risk factors for surgery and postoperative recurrence in Crohn's disease. *Annals of surgery* 2000;231:38-45.
53. Ikeuchi H, Nakano H, Uchino M, et al. Intestinal cancer in Crohn's disease. *Hepato-gastroenterology* 2008;55:2121-4.
54. Wellmann A, Fogt F, Hollerbach S, et al. Polymorphisms of the apoptosis-associated gene DP1L1 (deleted in polyposis 1-like 1) in colon cancer and inflammatory bowel disease. *Journal of cancer research and clinical oncology* 2010;136:795-802.
55. Devon KM, Brown CJ, Burnstein M, et al. Cancer of the anus complicating perianal Crohn's disease. *Diseases of the colon and rectum* 2009;52:211-6.
56. Meucci G, Vecchi M, Astegiano M, et al. The natural history of ulcerative proctitis: a multicenter, retrospective study. Gruppo di Studio per le Malattie Infiammatorie Intestinali (GSMII). *The American journal of gastroenterology* 2000;95:469-73.

57. Gan SI, Beck PL. A new look at toxic megacolon: an update and review of incidence, etiology, pathogenesis, and management. *The American journal of gastroenterology* 2003;98:2363-71.
58. Roys G, Kaplan MS, Juler GL. Surgical management of toxic megacolon. *The American journal of gastroenterology* 1977;68:161-6.
59. Kudo T, Matsumoto T, Esaki M, et al. Mucosal vascular pattern in ulcerative colitis: observations using narrow band imaging colonoscopy with special reference to histologic inflammation. *International journal of colorectal disease* 2009;24:495-501.
60. Usaj S, Tarabar D, Cuk V, et al. The histological diagnosis of dysplastic and neoplastic lesions in inflammatory bowel disease: a pathological perspective. *Acta chirurgica iugoslavica* 2004;51:109-16.
61. Hoie O, Wolters FL, Riis L, et al. Low colectomy rates in ulcerative colitis in an unselected European cohort followed for 10 years. *Gastroenterology* 2007;132:507-15.
62. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 2001;48:526-35.
63. Fogt F, Urbanski SJ, Sanders ME, et al. Distinction between dysplasia-associated lesion or mass (DALM) and adenoma in patients with ulcerative colitis. *Human pathology* 2000;31:288-91.
64. Kulaylat MN, Dayton MT. Ulcerative colitis and cancer. *Journal of surgical oncology* 2010;101:706-12.
65. Bojarski C. Malignant transformation in inflammatory bowel disease: prevention, surveillance and treatment - new techniques in endoscopy. *Digestive diseases* 2009;27:571-5.

66. Bernstein CN, Blanchard JF, Rawsthorne P, et al. The prevalence of extraintestinal diseases in inflammatory bowel disease: a population-based study. *The American journal of gastroenterology* 2001;96:1116-22.
67. Williams H, Walker D, Orchard TR. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Current gastroenterology reports* 2008;10:597-605.
68. Monsen U, Sorstad J, Hellers G, et al. Extracolonic diagnoses in ulcerative colitis: an epidemiological study. *The American journal of gastroenterology* 1990;85:711-6.
69. Salvarani C, Fornaciari G, Beltrami M, et al. Musculoskeletal manifestations in inflammatory bowel disease. *European journal of internal medicine* 2000;11:210-214.
70. Orchard TR, Wordsworth BP, Jewell DP. Peripheral arthropathies in inflammatory bowel disease: their articular distribution and natural history. *Gut* 1998;42:387-91.
71. Calin A, Porta J, Fries JF, et al. Clinical history as a screening test for ankylosing spondylitis. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 1977;237:2613-4.
72. Huaux JP, Fiassse R, De Bruyere M, et al. HLA B27 in regional enteritis with and without ankylosing spondylitis or sacroiliitis. *The Journal of rheumatology. Supplement* 1977;3:60-3.
73. Yuksel I, Basar O, Ataseven H, et al. Mucocutaneous manifestations in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases* 2009;15:546-50.
74. Saich R, Chapman R. Primary sclerosing cholangitis, autoimmune hepatitis and overlap syndromes in inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology : WJG* 2008;14:331-7.
75. Brentnall TA, Haggitt RC, Rabinovitch PS, et al. Risk and natural history of colonic neoplasia in patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1996;110:331-8.

76. Perdigoto R, Carpenter HA, Czaja AJ. Frequency and significance of chronic ulcerative colitis in severe corticosteroid-treated autoimmune hepatitis. *Journal of hepatology* 1992;14:325-31.
77. Pitchumoni CS, Rubin A, Das K. Pancreatitis in inflammatory bowel diseases. *Journal of clinical gastroenterology* 2010;44:246-53.
78. Orchard TR, Chua CN, Ahmad T, et al. Uveitis and erythema nodosum in inflammatory bowel disease: clinical features and the role of HLA genes. *Gastroenterology* 2002;123:714-8.
79. Kehoe EL, Newcomer KL. Thromboembolic Phenomena in Ulcerative Colitis. Two Case Reports. *Archives of internal medicine* 1964;113:711-5.
80. Bernstein CN, Blanchard JF, Houston DS, et al. The incidence of deep venous thrombosis and pulmonary embolism among patients with inflammatory bowel disease: a population-based cohort study. *Thrombosis and haemostasis* 2001;85:430-4.
81. Spina L, Saibeni S, Battaglioli T, et al. Thrombosis in inflammatory bowel diseases: role of inherited thrombophilia. *The American journal of gastroenterology* 2005;100:2036-41.
82. Webberley MJ, Hart MT, Melikian V. Thromboembolism in inflammatory bowel disease: role of platelets. *Gut* 1993;34:247-51.
83. Saibeni S, Bottasso B, Spina L, et al. Assessment of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) plasma levels in inflammatory bowel diseases. *The American journal of gastroenterology* 2004;99:1966-70.
84. Meucci G. What is the incidence, prevalence, and natural history of indeterminate colitis? *Inflammatory bowel diseases* 2008;14 Suppl 2:S159-60.
85. Simpson P, Papadakis KA. Endoscopic evaluation of patients with inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases* 2008;14:1287-97.

86. Nylund K, Hausken T, Gilja OH. Ultrasound and inflammatory bowel disease. *Ultrasound quarterly* 2010;26:3-15.
87. Sinha R, Murphy P, Hawker P, et al. Role of MRI in Crohn's disease. *Clinical radiology* 2009;64:341-52.
88. Moscandrew ME, Loftus EV, Jr. Diagnostic advances in inflammatory bowel disease (imaging and laboratory). *Current gastroenterology reports* 2009;11:488-95.
89. Vermeire S, Vermeulen N, Van Assche G, et al. (Auto)antibodies in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology clinics of North America* 2008;37:429-38, vii.
90. Gupta N, Cohen SA, Bostrom AG, et al. Risk factors for initial surgery in pediatric patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2006;130:1069-77.
91. Reumaux D, Sendid B, Poulain D, et al. Serological markers in inflammatory bowel diseases. *Best practice & research. Clinical gastroenterology* 2003;17:19-35.
92. Baert F, Caprilli R, Angelucci E. Medical therapy for Crohn's disease: top-down or step-up? *Digestive diseases* 2007;25:260-6.
93. Bebb JR, Scott BB. How effective are the usual treatments for ulcerative colitis? *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2004;20:143-9.
94. James SL, Irving PM, Geary RB, et al. Management of distal ulcerative colitis: frequently asked questions analysis. *Internal medicine journal* 2008;38:114-9.
95. Pastorelli L, Pizarro TT, Cominelli F, et al. Emerging drugs for the treatment of ulcerative colitis. *Expert opinion on emerging drugs* 2009;14:505-21.
96. Saibeni S, Virgilio T, D'Inca R, et al. The use of thiopurines for the treatment of inflammatory bowel diseases in clinical practice. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 2008;40:814-20.

97. Hanauer SB. The case for using 5-aminosalicylates in Crohn's disease: pro. *Inflammatory bowel diseases* 2005;11:609-12.
98. Seow CH, Benchimol EI, Griffiths AM, et al. Budesonide for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane database of systematic reviews* 2008:CD000296.
99. Benchimol EI, Seow CH, Otley AR, et al. Budesonide for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane database of systematic reviews* 2009:CD002913.
100. Morrison G, Headon B, Gibson P. Update in inflammatory bowel disease. *Australian family physician* 2009;38:956-61.
101. Prantera C, Scribano ML. Antibiotics and probiotics in inflammatory bowel disease: why, when, and how. *Current opinion in gastroenterology* 2009;25:329-33.
102. Sandborn WJ, Hanauer S, Loftus EV, Jr., et al. An open-label study of the human anti-TNF monoclonal antibody adalimumab in subjects with prior loss of response or intolerance to infliximab for Crohn's disease. *The American journal of gastroenterology* 2004;99:1984-9.
103. D'Haens G. Anti-TNF therapy for Crohn's disease. *Current pharmaceutical design* 2003;9:289-94.
104. Cottone M, Mocciaro F, Modesto I. Infliximab and ulcerative colitis. *Expert opinion on biological therapy* 2006;6:401-8.
105. Barrie A, Regueiro M. Biologic therapy in the management of extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases* 2007;13:1424-9.
106. Rutgeerts P, Vermeire S, Van Assche G. Biological therapies for inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2009;136:1182-97.
107. Sands BE, Winter HS. Biologic agents: data in adults and children. *Inflammatory bowel diseases* 1998;4:125-7; discussion 127-31.

108. Lee JS, Lee JH, Lee HJ, et al. Efficacy of early treatment with infliximab in pediatric Crohn's disease. *World journal of gastroenterology : WJG* 2010;16:1776-81.
109. Schnitzler F, Fidder H, Ferrante M, et al. Long-term outcome of treatment with infliximab in 614 patients with Crohn's disease: results from a single-centre cohort. *Gut* 2009;58:492-500.
110. Behm BW, Bickston SJ. Tumor necrosis factor-alpha antibody for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane database of systematic reviews* 2008:CD006893.
111. Peyrin-Biroulet L. Anti-TNF therapy in inflammatory bowel diseases: a huge review. *Minerva gastroenterologica e dietologica* 2010;56:233-43.
112. Ferkolj I. How to improve the safety of biologic therapy in Crohn's disease. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 2009;60 Suppl 7:67-70.
113. Hoentjen F, van Bodegraven AA. Safety of anti-tumor necrosis factor therapy in inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology : WJG* 2009;15:2067-73.
114. Sandborn WJ, Hanauer SB, Katz S, et al. Etanercept for active Crohn's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2001;121:1088-94.
115. Targan SR, Feagan BG, Fedorak RN, et al. Natalizumab for the treatment of active Crohn's disease: results of the ENCORE Trial. *Gastroenterology* 2007;132:1672-83.
116. Ko HH, Bressler B. Natalizumab: pharmacology, clinical efficacy and safety in the treatment of patients with Crohn's disease. *Expert review of gastroenterology & hepatology* 2007;1:29-39.

117. Ito H, Takazoe M, Fukuda Y, et al. A pilot randomized trial of a human anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in active Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004;126:989-96; discussion 947.
118. Sinha A, Nightingale J, West KP, et al. Epidermal growth factor enemas with oral mesalamine for mild-to-moderate left-sided ulcerative colitis or proctitis. *The New England journal of medicine* 2003;349:350-7.
119. Casini-Raggi V, Kam L, Chong YJ, et al. Mucosal imbalance of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. A novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *J Immunol* 1995;154:2434-40.
120. Ferretti M, Casini-Raggi V, Pizarro TT, et al. Neutralization of endogenous IL-1 receptor antagonist exacerbates and prolongs inflammation in rabbit immune colitis. *J Clin Invest* 1994;94:449-53.
121. Dinarello CA. Interleukin-1beta and the autoinflammatory diseases. *N Engl J Med* 2009;360:2467-70.
122. Pizarro TT, Michie MH, Bentz M, et al. IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. *J Immunol* 1999;162:6829-35.
123. Monteleone G, Trapasso F, Parrello T, et al. Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease. *J Immunol* 1999;163:143-7.
124. Baekkevold ES, Roussigne M, Yamanaka T, et al. Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. *Am J Pathol* 2003;163:69-79.
125. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 2005;23:479-90.

126. Wood IS, Wang B, Trayhurn P. IL-33, a recently identified interleukin-1 gene family member, is expressed in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;384:105-9.
127. Cayrol C, Girard JP. The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:9021-6.
128. Talabot-Ayer D, Lamacchia C, Gabay C, et al. Interleukin-33 is biologically active independently of caspase-1 cleavage. *J Biol Chem* 2009;284:19420-6.
129. Luthi AU, Cullen SP, McNeela EA, et al. Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity* 2009;31:84-98.
130. Yanagisawa K, Takagi T, Tsukamoto T, et al. Presence of a novel primary response gene ST2L, encoding a product highly similar to the interleukin 1 receptor type 1. *FEBS Lett* 1993;318:83-7.
131. Fagundes CT, Amaral FA, Souza AL, et al. ST2, an IL-1R family member, attenuates inflammation and lethality after intestinal ischemia and reperfusion. *J Leukoc Biol* 2007;81:492-9.
132. Yin H, Huang BJ, Yang H, et al. Pretreatment with soluble ST2 reduces warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;351:940-6.
133. Hayakawa H, Hayakawa M, Kume A, et al. Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in allergic airway inflammation. *J Biol Chem* 2007;282:26369-80.
134. Liew FY, Pitman NI, McInnes IB. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat Rev Immunol* 2010;10:103-10.
135. Pushparaj PN, Tay HK, H'Ng S C, et al. The cytokine interleukin-33 mediates anaphylactic shock. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:9773-8.
136. Rank MA, Kobayashi T, Kozaki H, et al. IL-33-activated dendritic cells induce an atypical TH2-type response. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:1047-54.

137. Smithgall MD, Comeau MR, Yoon BR, et al. IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. *Int Immunol* 2008;20:1019-30.
138. Xu D, Jiang HR, Kewin P, et al. IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:10913-8.
139. Werman A, Werman-Venkert R, White R, et al. The precursor form of IL-1alpha is an intracrine proinflammatory activator of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:2434-9.
140. Carriere V, Roussel L, Ortega N, et al. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:282-7.
141. Morris GP, Beck PL, Herridge MS, et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989;96:795-803.
142. Mashimo H, Wu DC, Podolsky DK, et al. Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. *Science* 1996;274:262-5.
143. Yamada Y, Marshall S, Specian RD, et al. A comparative analysis of two models of colitis in rats. *Gastroenterology* 1992;102:1524-34.
144. Morrissey PJ, Charrier K, Braddy S, et al. CD4+ T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when transferred into congenic severe combined immunodeficient mice. Disease development is prevented by cotransfer of purified CD4+ T cells. *The Journal of experimental medicine* 1993;178:237-44.
145. Hollander GA, Simpson SJ, Mizoguchi E, et al. Severe colitis in mice with aberrant thymic selection. *Immunity* 1995;3:27-38.
146. Powrie F. T cells in inflammatory bowel disease: protective and pathogenic roles. *Immunity* 1995;3:171-4.

147. Sadlack B, Merz H, Schorle H, et al. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* 1993;75:253-61.
148. Mombaerts P, Mizoguchi E, Grusby MJ, et al. Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice. *Cell* 1993;75:274-82.
149. Sundberg JP, Elson CO, Bedigian H, et al. Spontaneous, heritable colitis in a new substrain of C3H/HeJ mice. *Gastroenterology* 1994;107:1726-35.
150. Kontoyiannis D, Pasparakis M, Pizarro TT, et al. Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity* 1999;10:387-98.
151. Takeda T, Hosokawa M, Takeshita S, et al. A new murine model of accelerated senescence. *Mechanisms of ageing and development* 1981;17:183-94.
152. Matsumoto S, Okabe Y, Setoyama H, et al. Inflammatory bowel disease-like enteritis and caecitis in a senescence accelerated mouse P1/Yit strain. *Gut* 1998;43:71-8.
153. Pizarro TT, Pastorelli L, Bamias G, et al. SAMP1/YitFc mouse strain: A spontaneous model of Crohn's disease-like ileitis. *Inflammatory bowel diseases* 2011.
154. Rivera-Nieves J, Bamias G, Vidrich A, et al. Emergence of perianal fistulizing disease in the SAMP1/YitFc mouse, a spontaneous model of chronic ileitis. *Gastroenterology* 2003;124:972-82.
155. Bamias G, Martin C, Mishina M, et al. Proinflammatory effects of TH2 cytokines in a murine model of chronic small intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2005;128:654-66.
156. Olson TS, Reuter BK, Scott KG, et al. The primary defect in experimental ileitis originates from a nonhematopoietic source. *J Exp Med* 2006;203:541-52.

157. Lecart S, Lecoite N, Subramaniam A, et al. Activated, but not resting human Th2 cells, in contrast to Th1 and T regulatory cells, produce soluble ST2 and express low levels of ST2L at the cell surface. *Eur J Immunol* 2002;32:2979-87.
158. Schwab A, Rossmann H, Klein M, et al. Functional role of Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransport in migration of transformed renal epithelial cells. *J Physiol* 2005;568:445-58.
159. Verri WA, Jr., Guerrero AT, Fukada SY, et al. IL-33 mediates antigen-induced cutaneous and articular hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:2723-8.
160. Pastorelli L, Garg RR, Hoang SB, et al. Epithelial-derived IL-33 and its receptor ST2 are dysregulated in ulcerative colitis and in experimental Th1/Th2 driven enteritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:8017-22.
161. Reuter BK, Pizarro TT. Commentary: the role of the IL-18 system and other members of the IL-1R/TLR superfamily in innate mucosal immunity and the pathogenesis of inflammatory bowel disease: friend or foe? *Eur J Immunol* 2004;34:2347-55.
162. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 2009;27:519-50.
163. Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, et al. Disparate CD4<sup>+</sup> 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* 1996;157:1261-70.
164. Wehkamp J, Koslowski M, Wang G, et al. Barrier dysfunction due to distinct defensin deficiencies in small intestinal and colonic Crohn's disease. *Mucosal Immunol* 2008;1 Suppl 1:S67-74.

165. Saenz SA, Taylor BC, Artis D. Welcome to the neighborhood: epithelial cell-derived cytokines license innate and adaptive immune responses at mucosal sites. *Immunol Rev* 2008;226:172-90.
166. Humphreys NE, Xu D, Hepworth MR, et al. IL-33, a potent inducer of adaptive immunity to intestinal nematodes. *J Immunol* 2008;180:2443-9.
167. Pastorelli L, Vecchi M, Cominelli F, et al. Genetic regulation of epithelial barrier function: Recent insights into the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *IBD Monitor* 2008;8:124-133.
168. Kaser A, Lee AH, Franke A, et al. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell* 2008;134:743-56.
169. Heazlewood CK, Cook MC, Eri R, et al. Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. *PLoS Med* 2008;5:e54.
170. Takedatsu H, Mitsuyama K, Matsumoto S, et al. Interleukin-5 participates in the pathogenesis of ileitis in SAMP1/Yit mice. *Eur J Immunol* 2004;34:1561-9.
171. Mitsuyama K, Matsumoto S, Rose-John S, et al. STAT3 activation via interleukin 6 trans-signalling contributes to ileitis in SAMP1/Yit mice. *Gut* 2006;55:1263-9.
172. Ahern PP, Izcue A, Maloy KJ, et al. The interleukin-23 axis in intestinal inflammation. *Immunol Rev* 2008;226:147-59.
173. Palmer G, Talabot-Ayer D, Lamacchia C, et al. Inhibition of interleukin-33 signaling attenuates the severity of experimental arthritis. *Arthritis Rheum* 2009;60:738-49.
174. Arend WP, Palmer G, Gabay C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunol Rev* 2008;223:20-38.

175. Corbaz A, ten Hove T, Herren S, et al. IL-18-binding protein expression by endothelial cells and macrophages is up-regulated during active Crohn's disease. *J Immunol* 2002;168:3608-16.
176. Brint EK, Xu D, Liu H, et al. ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. *Nat Immunol* 2004;5:373-9.
177. Oshikawa K, Yanagisawa K, Tominaga S, et al. Expression and function of the ST2 gene in a murine model of allergic airway inflammation. *Clin Exp Allergy* 2002;32:1520-6.
178. Peters M, Jacobs S, Ehlers M, et al. The function of the soluble interleukin 6 (IL-6) receptor in vivo: sensitization of human soluble IL-6 receptor transgenic mice towards IL-6 and prolongation of the plasma half-life of IL-6. *J Exp Med* 1996;183:1399-406.