

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA



TESI DI DOTTORATO IN GASTROENTEROLOGIA

Ciclo XXVI

Settore scientifico disciplinare: MED/12

**LA RIDUZIONE DEI MACROFAGI CD68+ TISSUTALI E LA DIMINUIZIONE NELL'ESPRESSIONE MUCOSALE DI INTERLEUCHINA 17 SONO STRETTAMENTE CORRELATI CON LA RISPOSTA ENDOSCOPICA E CON LA GUARIGIONE DELLA MUCOSA A SEGUITO DI TERAPIA CON INFLIXIMAB IN PAZIENTI CON MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI**

Dottoranda

Clorinda Ciafardini

Matricola n. R09062

Relatore: Chiar.mo Prof. Dario Conte

Correlatore: Chiar.mo Dr Flavio Caprioli

Anno Accademico 2012-2013

## INDICE

### INTRODUZIONE

LE MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI	3
<i>1.1 L'immunologia nelle malattie infiammatorie croniche intestinali</i>	8
<i>1.2 Il trattamento nelle malattie infiammatorie croniche intestinali: farmaci anti tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i>	13
<i>1.3 Infliximab</i>	14
SCOPO DELLA TESI	17
MATERIALI E METODI	
<i>Casistica</i>	19
<i>Immunofluorescenza</i>	20
<i>Estrazione di RNA totale, preparazione di cDNA e PCR real time</i>	22
<i>Valutazione morte cellulare programmata per apoptosi</i>	23
<i>Analisi statistica</i>	24
RISULTATI	25
DISCUSSIONE	29
BIBLIOGRAFIA	32
TABELLE E FIGURE	40

## INTRODUZIONE

### LE MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI

La malattia di Crohn (MC) e la rettocolite ulcerosa (RCU), comunemente note come malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI o secondo la nomenclatura anglosassone IBD, inflammatory bowel diseases), sono patologie idiopatiche caratterizzate da uno stato flogistico del tratto gastroenterico ad andamento cronico-recidivante. Sono condizioni poco frequenti ma non rare: l'incidenza, in Italia, è di 6-8 nuovi casi/anno/100.000 persone per la RCU e di 3,4 nuovi casi/anno/100.000 persone per la MC (1), senza differenze tra i sessi e con un picco di incidenza solitamente compreso tra i 15 ed i 35 anni, pur potendosi presentare in qualsiasi fascia di età. La loro prevalenza si attesta, invece, su 80-100 casi per 100.000 persone. Se consideriamo il quadro europeo è possibile notare come ci sia un "gradiente nord-sud" nell'incidenza con una maggiore incidenza nei paesi nordici ed una progressiva diminuzione nel sud Europa: per la RCU 11.8/100.000 nel nord Europa e 8.7/100.000 nel sud, 7.0/100.000 e 3.9/100.000 per la MC, rispettivamente (2). Le due malattie si differenziano in base alla localizzazione (la RCU interessa solo il colon, la MC potenzialmente tutto l'apparato digerente) ed al diverso interessamento della parete (solo mucosale e senza soluzioni di continuità per la RCU, trasmurale e con lesioni a salto nella MC).

La malattia di Crohn è una malattia infiammatoria cronica intestinale che può potenzialmente interessare tutti i tratti dell'apparato gastroenterico ma che, solitamente, riguarda la porzione intestinale. Tipicamente le lesioni sono di tipo trasmurale ed interessano in modo discontinuo l'apparato digerente ("skip lesions") conferendo un caratteristico aspetto endoscopico e radiografico (ad acciottolato). Già in passato è stata proposta una classificazione, recentemente revisionata in parametri noti come criteri di

Montreal. Sulla base di questi criteri la MC si classifica in relazione all'età al momento della diagnosi (sotto i 16 aa, tra i 17 e i 40 aa e oltre i 40 aa), alla localizzazione (ileale, colica, ileo-colica e isolata del tratto gastroenterico superiore) ed in base al suo comportamento (non stenotante e non fistolizzante, stenotante, fistolizzante e con interessamento perianale) (3). La presentazione clinica è variabile in relazione a localizzazione e gravità presentandosi con dolori addominali, diarrea, febbre, stati subocclusivi o francamente occlusivi, questi ultimi presenti in prevalenza nelle forme stenotanti.

La colite ulcerosa è una malattia della sola mucosa, che interessa sempre il retto e che, senza soluzioni di continuità, si estende prossimalmente con il coinvolgimento di una parte o di tutto il colon. A differenza della malattia di Crohn è coinvolta soltanto la mucosa e non si ha formazione di granulomi. In relazione alla sua distribuzione si distingue in: proctite (E1), se è coinvolto soltanto il retto, colite sinistra (E2), se il colon è coinvolto sino alla flessura splenica, colite estesa (E3) se va oltre la flessura splenica, sino ad arrivare alla pancolite (3). In taluni rari casi l'infiammazione può estendersi in una piccola porzione di ileo (backwash ileitis). I pazienti presentano tipicamente diarrea ematica (spesso post prandiale o notturna), presenza di muco o pus con le feci, tenesmo, urgenza e dolori addominali crampiformi. Essendo limitata alla mucosa la RCU non dà origine a tramiti fistolosi o stenosi.

Va inoltre ricordata, in entrambe le patologie, la possibile concomitante presenza di manifestazioni extraintestinali alcune delle quali correlate all'attività infiammatoria della colite. Particolare rilevanza ha l'interessamento articolare, oculare (uveiti, iriti), dermatologico (eritema nodoso e pioderma gangrenoso) e manifestazioni orali, in special modo afte determinate dal malassorbimento vitaminico a livello ileale, inoltre possono concomitare patologie dovute alla disfunzione del piccolo intestino (colelitiasi,

nefrolitiasi e uropatie ostruttive), queste ultime due più tipicamente associate alla MC. Altre ancora specifiche manifestazioni extraintestinali sono l'osteoporosi, patologie epatobiliari e l'amiloidosi (4).

Dal punto di vista diagnostico non esistono test inequivocabili, ma la diagnosi viene posta dall'insieme di rilievi anamnestici (familiarità, fumo), clinici (sintomi come dolore, diarrea, febbre), laboratoristici (indici infiammatori come PCR, VES, emocromo), tecniche di imaging (RX addome, ecografia addome e per anse, tomografia computerizzata, risonanza magnetica, clisma del tenue), endoscopici ed istologici. Tutto ciò è fondamentale in quanto, per la corretta impostazione della terapia è necessario determinare di quale IBD si tratti, stabilirne estensione e distribuzione, valutare la presenza di eventuali manifestazioni extraintestinali, determinare la severità della malattia. Per quanto riguarda quest'ultimo punto vengono usati score clinici ed endoscopici. Per quanto riguarda la MC la valutazione clinica può essere fatta mediante l'Harvey-Bradshaw index: tale indice valuta 5 parametri (benessere generale, dolore addominale, numero di scariche liquide al giorno, masse addominali, complicanze) assegnando punteggi variabili (5), mentre dal punto di vista endoscopico può essere utilizzato il Simple Endoscopic Score per la malattia di Crohn (SES-CD) che valuta la dimensione delle ulcere mucose, la superficie ulcerata, l'estensione endoscopica e la presenza di stenosi. Nel caso della RCU, invece, i principali indici clinici sono rappresentati dall'activity index di Truelove and Witts o dal Mayo score che analizza 4 parametri (numero di scariche, ematochezia, stato della mucosa e valutazione complessiva del medico) (6), mentre dal punto di vista endoscopico è spesso utilizzato il subscore endoscopico Mayo che considera la presenza di eritema, pattern vascolare, fragilità della mucosa, erosioni ed ulcere (7).

Come accennato l'eziologia della malattie infiammatorie croniche intestinali non è ancora nota ma è attualmente ipotizzata un'origine multifattoriale. Diversi sono gli aspetti che si stanno indagando: le ricerche in particolare in ambito genetico e sullo studio di fattori scatenanti o favorenti come elementi ambientali e anche psicologici.

Certamente la predisposizione genetica è uno degli elementi preponderanti come dimostra l'aumentata percentuale di IBD nei parenti di persone affette ed in modo ancora maggiore negli studi di concordanza tra gemelli (37% nei gemelli monozigoti per la MC e 10% per la RCU) (8). Riguardo i geni responsabili, sono ancora pochi i dati certi a disposizione, ma sono state identificate regioni di suscettibilità in almeno 12 cromosomi. Il primo gene per cui è stata dimostrata un'associazione con le malattie infiammatorie croniche intestinali è il gene CARD15, localizzato sul cromosoma 16, che codifica per NOD2: esso presenta mutazioni omozigoti in almeno il 10-15% dei pazienti (9). NOD2 è un pattern recognition receptor a localizzazione citoplasmatica che regola l'attività di fattore nucleare kB (NF-kB) entrando così in gioco nella produzione di citochine proinfiammatorie e nei pathways dell'apoptosi. Si ritiene che mutazioni a carico di questo gene determinino un aumento della suscettibilità ai componenti della flora intestinale e ad antigeni esogeni (10).

Sulla predisposizione genetica individuale, responsabile di una maggiore suscettibilità all'attivazione del sistema immunitario soprattutto mucosale, si inseriscono poi uno o più fattori che contribuiscono a scatenare la malattia. Tra questi uno dei principali è il fumo di sigaretta che, vari studi, hanno dimostrato essere l'elemento che, nella MC, peggiora il decorso della malattia, favorisce le complicanze, il ricorso alla chirurgia incrementando inoltre recidive post chirurgiche (11).

Nella patogenesi delle IBD l'elemento più importante è l'alterazione dell'equilibrio immunitario a livello della mucosa intestinale che determina una risposta inappropriata

ad antigeni normalmente presenti nel lume intestinale, tra cui la flora batterica. Il preciso meccanismo ancora non è conosciuto ma gli eventi che si pensa siano maggiormente associati a questa attivazione sono: l'alterazione della barriera mucosale, data da meccanismi non ancora completamente chiariti, con aumento della permeabilità e più facile penetrazione di antigeni luminali con conseguente attivazione della risposta immunitaria (12); un'alterazione nel riconoscimento dell'antigene e del suo processamento da parte delle cellule presentanti l'antigene (APC) legato probabilmente ad un'esagerata risposta all'attivazione dei pattern recognition receptor (13), con rilascio di citochine favorevoli alla differenziazione dei linfociti T verso sottopopolazioni a carattere proinfiammatorio quali le Th1 e le Th17 e riduzione delle cellule T regolatorie; l'acquisizione della capacità di presentazione dell'antigene e di attivazione dei linfociti da parte di cellule diverse dalle APC professionali (es. da parte delle cellule epiteliali intestinali) (14); alterazione dei meccanismi di clearance, quali tolleranza e apoptosi, dei linfociti T reattivi (15) e conseguente squilibrio nel bilancio tra cellule regolatorie e cellule reattive (16).

La produzione di citochine infiammatorie da parte dei linfociti attivati determina il rilascio di molecole chemoattraenti e l'aumento di molecole di adesione come la E-selectina, e la P-selectina che promuovono la migrazione leucocitaria a livello mucosale. Nella mucosa i leucociti rilasciano numerosi metaboliti, quali ossido nitrico, radicali liberi, metaboliti dell'acido arachidonico, e metalloproteinasi (MMP), enzimi in grado di danneggiare il tessuto, e determinare la formazione di ulcere e fistole favorendo la proliferazione e l'attivazione di fibroblasti che, deponendo collagene, portano alla formazione di stenosi nella malattia di Crohn (17).

### *1.1 L'immunologia nelle malattie infiammatorie croniche intestinali*

Sebbene le manifestazioni cliniche delle IBD siano note dalla prima metà del XX secolo, l'esatta eziologia di queste patologie non è stata ancora completamente compresa. Come accennato, si ritiene che le IBD originino in soggetti geneticamente predisposti, a seguito di una esagerata attivazione del sistema immunitario (18) nei confronti di antigeni, non ancora identificati, presenti nel lume intestinale. Inizialmente è stata considerata l'ipotesi che tale attivazione potesse dipendere da microrganismi infettivi esogeni, ma nessun agente causale è mai stato identificato. Più probabilmente essa dipende da componenti della normale flora batterica intestinale. In particolare Niess *et al.* (19) hanno dimostrato come, in una linea murina, la normale microflora sia essenziale per l'espansione, nella lamina propria di ileo e colon, (le aree principalmente interessate nelle IBD), di specifici linfociti CD4+ pro infiammatori (Th17). Infatti, cruciali per l'origine ed il mantenimento del processo infiammatorio intestinale sono i linfociti T helper (Th) CD4+, la cui capacità di innescare ed espandere la reazione immunitaria mucosale dipende dalla produzione di specifici mediatori solubili, le citochine (20).

E' da tempo nota l'esistenza di due sottopopolazioni di T helper (21), Th1 e Th2, che si distinguono sulla base del loro ruolo nell'organismo e del pattern citochinico utilizzato: i Th1, deputati al controllo dei patogeni intracellulari, producono principalmente interferone  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ) sotto lo stimolo dell'IL12, mentre i Th2, coinvolti soprattutto nelle patologie allergiche e nella difesa dagli organismi extracellulari, producono IL4, IL5 ed IL13. Essi derivano da un comune progenitore, la cellula naive CD4+, che si differenzia in senso Th1 sotto lo stimolo dell'IL12 e dell' IFN  $\gamma$  o in senso Th2 principalmente in presenza di IL4 ed IL5.

Queste popolazioni linfocitarie sono coinvolte in modo differente nelle due malattie. Parronchi *et al.* (22) hanno dimostrato che nella mucosa dei pazienti con MC attiva c'è un'aumentata produzione di IL12 dai macrofagi, di IFN  $\gamma$  linfocitario associata ad una riduzione di IL4. Queste osservazioni, in aggiunta al riscontro di elevati livelli di STAT4 e T-bet, fattori di trascrizione Th1-associati, hanno portato per anni a definire la MC come Th1 mediata. Analogamente nella RCU è stato dimostrato un maggior coinvolgimento Th2: Heller *et al.* (23) hanno dimostrato come le cellule mononucleate della lamina propria di pazienti con colite ulcerosa producano molta più IL13 dei pazienti con MC, elemento che depone a favore della mediazione dei Th2.

Questa visione, semplicistica, dell'assetto immunitario nelle due patologie deve essere riconsiderata alla luce di nuove evidenze che hanno mostrato il ruolo nella patogenesi della infiammazione intestinale di nuove classi di linfociti T helper recentemente identificate, nello specifico i linfociti Th17 e i linfociti T regolatori (Tregs).

I Th17 originano, come i Th1 e i Th2, dal precursore T linfocitario ma a differenza di questi ultimi non richiedono per la differenziazione le loro stesse molecole effettrici. Essi infatti si sviluppano sotto lo stimolo del TGF $\beta$  in presenza delle principali citochine infiammatorie quali IL1 $\beta$ , IL6 e IL21 (24, 25). Un ruolo chiave è svolto dall'IL23 che interviene però successivamente ed è essenziale per il mantenimento della differenziazione e probabilmente per sopravvivenza dei linfociti Th17 (26).

L' IL23 è un eterodimero costituito da 2 subunità, la p19 e la p40, quest'ultima in comune con l'IL12. Essa viene rilasciata dalle cellule presentanti l'antigene (antigen presenting cells APC) intestinali dopo stimolazione di alcuni recettori superficiali (noti come toll-like receptors, TLR) e del recettore intracellulare NOD2 da parte dei prodotti batterici (27). I macrofagi di pazienti con MC esprimono livelli basali più elevati di IL12/IL23p40 rispetto ai controlli (28), e questo suggerisce che mutazioni di questi recettori, che determinano un aumento della produzione citochinica, siano uno degli

elementi predisponenti la malattia. Il recettore dell'IL23 viene espresso sulla cellula CD4+ naive soltanto dopo la stimolazione dell'IL6 o dell'IL21 (26) e sue mutazioni sono variamente associate ad una maggiore o minore suscettibilità nello sviluppo delle malattie infiammatorie croniche intestinali (29). L'importanza del ruolo dell'IL23, e quindi dei Th17, nello sviluppo della colite è dimostrato dallo studio di Yen *et al* (30) nel quale topi knockout per IL10 sviluppavano colite in presenza di IL23 più che di IL12, ed è supportata anche da trials clinici con anticorpi anti IL23p40 (Ustekinumab) che si sono dimostrati efficaci nella malattia di Crohn moderato-severa (31).

I linfociti Th17, prevalentemente localizzati a livello mucosale, ed in particolare nella lamina propria intestinale, sono essenziali nella difesa immunitaria nei confronti di microrganismi extracellulari di natura batterica e fungina. Recenti studi hanno suggerito come questi linfociti possano ricoprire un ruolo chiave in diversi processi di natura autoimmunitaria, come l'artrite reumatoide e la sclerosi multipla (32). Analogamente, alcuni studi hanno dimostrato un'elevata infiltrazione di linfociti Th17 nella lamina propria di pazienti con IBD (33).

I linfociti Th17 esprimono selettivamente il fattore di trascrizione retinoid-related orphan receptor- $\gamma$ T (ROR $\gamma$ T) ed un recettore di chemochine a livello di membrana, noto come CCR6. Come gli altri linfociti, svolgono il loro ruolo (pro infiammatorio) grazie ad un pattern citochinico specifico costituito soprattutto da IL17A, IL17F, IL21, IL22, IL26, TNF $\alpha$  e CCL20 che vengono secrete sia da cellule CD3+ (linfociti) sia da cellule CD68+ (monociti-macrofagi). Tra queste citochine, il principale mediatore Th17-correlato è l'IL17. Si tratta in realtà di una famiglia comprendente 6 membri (IL17A, IL17B, IL17C, IL17D, IL17E, IL17F), che hanno *in vitro* ed *in vivo*, un potente effetto pro infiammatorio svolto attraverso la stimolazione della produzione di citochine, quali IL6 e TNF $\alpha$ , chemochine (MCP-1, MIP-2), e metalloproteinasi della matrice.

Il ruolo dell'IL17 nelle IBD è testimoniato da due differenti studi che hanno dimostrato come nella mucosa intestinale sia dei pazienti con MC attiva che con RCU ci siano degli aumentati livelli di mRNA per l'IL17A (33) e per l' IL17F (34). Soprattutto l'IL17A, attraverso l'attivazione di pathways infiammatori come quelli di NF-kB e delle proteinchinasi mitogeno-attivata (MAPK), stimola le cellule epiteliali intestinali, cellule endoteliali, macrofagi e fibroblasti a rilasciare mediatori dell'infiammazione tra cui IL1 $\beta$ , IL6, TNF $\alpha$ , CCL20 che richiamano e attivano granulociti e cellule dell'infiammazione.

Tra le principali citochine infiammatorie Th17-correlate sicuramente una delle molecole chiave nell'attivazione e nel mantenimento della flogosi, non solo nelle IBD ma anche in altri disordini infiammatori cronici quali l'artrite reumatoide, la psoriasi e la spondiloartropatia, è il tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) che, insieme con la linfotossina, rappresenta il capostipite di una superfamiglia di citochine accomunate da omologie strutturali (superfamiglia TNF) che mediano proliferazione, sopravvivenza ed apoptosi cellulare. Diversi studi hanno dimostrato la presenza di aumentati livelli di TNF $\alpha$  nel siero, nella mucosa e nelle feci di pazienti affetti da IBD (35, 36).

Il TNF $\alpha$  viene prodotto principalmente dai macrofagi e dai linfociti T attivati, ma anche da altri tipi cellulari quali cellule endoteliali, fibroblasti e cellule nervose. Si trova in due forme, entrambe stabilmente organizzate in omotrimeri: una legata alla membrana cellulare da una coda transmembrana (memTNF) ed una forma solubile (sTNF) derivata dal taglio proteolitico della memTNF ad opera dell'enzima TNF $\alpha$  converting enzyme (TACE) (37). Esso svolge il suo ruolo interagendo con due specifici recettori appartenenti anch'essi ad una superfamiglia: TNF-R1 (recettore per il TNF di tipo 1; CD120a; p55/60) che è in grado di legare entrambe le forme e si ritrova nella maggior parte dei tessuti, ed il TNF-R2 (recettore per il TNF di tipo 2; CD120b; p75/80) che interagisce solo con la forma legata alla membrana ed è espresso dalle cellule del

sistema immunitario, dato che enfatizza il suo ruolo nella regolazione dei processi immuni. L'attivazione di questi recettori può avere diversi effetti, dal reclutamento ed attivazione delle caspasi, che determinano apoptosi, all'attivazione di NF- $\kappa$ B, fattore di trascrizione implicato nella sopravvivenza cellulare e nella infiammazione. I principali effetti pro infiammatori del TNF $\alpha$  consistono in: aumento della produzione delle metalloproteinasi della matrice che contribuiscono al danno tissutale (38), incremento della produzione di citochine pro infiammatorie, quali IL8, oltre che di molecole di adesione quali intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) dalle cellule epiteliali (39), stimolazione della produzione di chemochine dalle cellule epiteliali che contribuiscono al reclutamento di leucociti (40), upregolazione della produzione di IFN $\gamma$  dalle cellule T mucosali.

Un dato importante ai fini del nostro studio è l'evidenza che i linfociti T isolati da pazienti con MC sono resistenti a stimoli pro apoptotici, probabilmente per uno squilibrio tra proteine anti apoptotiche quali Bcl2 e quelle proapoptotiche come BAX (15). L'elemento più interessante è che antagonizzando il TNF $\alpha$ , elemento verosimilmente responsabile di tale prolungata sopravvivenza, si induce l'apoptosi di queste cellule (41).

Tra le altre citochine l'IL21 regola la differenziazione delle Th17. La sua espressione è aumentata nei pazienti con MC, particolarmente nei linfociti della lamina propria (42) e aumenta la produzione di metalloproteinasi (MMPs) dai fibroblasti (43), l'IL22 ha probabilmente un ruolo bidirezionale della MC: da una parte aumenta la produzione di citochine pro infiammatorie quali IL8 e TNF $\alpha$ , prodotti dalle cellule epiteliali intestinali e dai miofibroblasti (44), dall'altra sembra aumentare l'espressione di elementi protettivi per la mucosa intestinale quali la  $\beta$  defensina-2. Per quanto riguarda l'IL26, i cui livelli di mRNA sono elevati nei pazienti con malattie infiammatorie intestinali, il ruolo è ancora poco chiaro.

Un dato interessante riguardo le popolazioni linfocitarie coinvolte, proviene dagli studi di Annunziato *et al* ( 45) che hanno dimostrato come nell'intestino di pazienti affetti da MC sia presente un sottogruppo di Th17 che producono sia IL17, loro citochina caratteristica, sia IFN $\gamma$ , tipica dei Th1: la sottopopolazione Th17/Th1. Il loro ruolo nei soggetti sani e nei pazienti deve ancora essere completamente compreso.

### *1.2 Il trattamento nelle malattie infiammatorie croniche intestinali: farmaci anti tumor necrosis factor $\alpha$*

La strategia terapeutica ideale per i pazienti con malattie infiammatorie croniche intestinali dovrebbe essere in grado di indurre remissione e mantenerla a lungo termine senza riacutizzazioni, senza interventi chirurgici e con una buona qualità di vita. Le terapie che abbiamo attualmente a disposizione sono rappresentate dai salicilati, gli steroidi (topici e sistemici), dagli immunomodulatori/immunosoppressori (azatioprina, 6-mercaptopurina e metotrexate) e dai nuovi farmaci biologici, gli anticorpi anti TNF- $\alpha$  come Infliximab ed Adalimumab.

L'utilizzo di anticorpi monoclonali diretti al blocco del tumor necrosis factor  $\alpha$  (anti TNF- $\alpha$ ) è oggi ampiamente diffuso nel trattamento di patologie infiammatorie ed autoimmuni come le malattie infiammatorie croniche intestinali, l'artrite reumatoide e patologie dermatologiche come la psoriasi. In particolare nell'ambito gastroenterologico la terapia con infliximab e adalimumab, due anticorpi monoclonali contro il TNF $\alpha$  si è dimostrata efficace nella malattia di Crohn luminale e fistolizzante ed ancora nel trattamento delle manifestazioni extraintestinali della patologia. Si sta altresì dimostrando la loro efficacia clinica nella rettocolite ulcerosa resistente alle terapie tradizionali. Attualmente non esistono studi che confrontino l'efficacia di questi farmaci. La scelta è quindi determinata principalmente da valutazioni costo-benefici,

preferenza del medico, e del paziente per garantire la migliore compliance, considerando la diversa via di somministrazione (e.v. per infliximab, s.c. per adalimumab). Soprattutto nella malattia severa le attuali linee guida suggeriscono un uso rapido dei farmaci anti TNF $\alpha$  che sembrano essere efficaci nell'indurre un rapido mucosal healing, parametro che sembra predittivo del mantenimento in remissione della malattia (46). Tali farmaci sono indicati nella MC moderata-severa, con malattia luminale steroide refrattaria, nella malattia fistolizzante e nella RCU (da moderato a severa) refrattaria al trattamento cortisonico o immunomodulante essendo in grado di indurre rapida remissione clinica, in modo da garantire una guarigione della mucosa ed una riduzione nella probabilità di intervento chirurgico.

### *1.3 Infliximab*

L'infliximab è un anticorpo monoclonale chimerico anti TNF- $\alpha$  costituito dalla regione variabile murina e dalla regione costante di una immunoglobulina umana IgG1. Diversi studi hanno dimostrato che questo farmaco è efficace nel trattamento della malattia di Crohn e nella rettocolite ulcerosa moderato-severa e refrattaria agli steroidi inducendo una risposta clinica ed endoscopica.

I primi studi di Targan (47) hanno dimostrato l'efficacia di infliximab nell'ottenere una risposta clinica nella MC luminale rispetto al placebo. Ancora nel trial Accent I (48) si è dimostrata l'efficacia di infliximab non solo nell'induzione ma anche nel mantenimento della remissione clinica senza bisogno di steroidi per 52 settimane. Dati analoghi sono stati ottenuti da Present *et. al* (49) in merito all'induzione della remissione e da Sands *et al.* (50) nel mantenimento della MC fistolizzante. I trials Act I e II (51) hanno dimostrato l'efficacia di infliximab nell'indurre e mantenere la remissione nella rettocolite ulcerosa.

L'infliximab è somministrato per via endovenosa alla dose di 5 mg/kg con un ciclo di induzione che prevede infusioni alle settimane 0, 2 e 6, seguite da infusioni di 5 mg/kg ogni 8 settimane per il mantenimento. In caso di perdita di risposta al farmaco è possibile ridurre l'intervallo temporale tra le infusioni di mantenimento o aumentare il dosaggio a 10 mg/kg.

Nonostante la dimostrazione di efficacia clinica, il meccanismo d'azione degli anticorpi anti TNF $\alpha$  nel trattamento dell'infiammazione intestinale è, ad oggi, ancora oggetto di discussione. In particolare l'attenzione si sta focalizzando sulla capacità da parte di infliximab di indurre morte programmata (apoptosi) di cellule infiammatorie quali linfociti T e di cellule mononucleate che sono aumentate nella lamina propria di pazienti con IBD, contribuendo alla riduzione dell'infiltrato infiammatorio a livello della mucosa. Il primo studio in merito condotto da Luger *et al* (52) ha valutato e dimostrato la capacità di infliximab di indurre apoptosi dei monociti della lamina propria di pazienti con MC attraverso un meccanismo caspasi dipendente ma indipendente da FAS. Più precisamente tali autori hanno dimostrato che infliximab lega la forma di membrana del TNF $\alpha$  o del TNF che lega il proprio recettore upregolando, attraverso meccanismi non ancora noti, proteine proapoptiche come Bax e Bak, della famiglia di Bcl2, che incrementano il rilascio di Citocromo C dai mitocondri. Attraverso l'interazione di quest'ultimo con Apaf1 vengono quindi attivate le caspasi 8, 9 ed infine 3 determinando la morte per apoptosi dei monociti, tra i principali produttori di TNF e citochine pro infiammatorie. Un altro studio di ten Hove del 2002 (53) ha dimostrato che il trattamento anti TNF $\alpha$  induce l'apoptosi anche dei linfociti T attivati presenti nella lamina propria dell'intestino di pazienti con MC, cellule che giocano un ruolo centrale nella patogenesi di tale patologia. Più nello specifico è stato dimostrato che il trattamento con anti TNF $\alpha$  determina un rapido e specifico incremento del numero di apoptosi nei linfociti T della mucosa intestinale, ma non dei linfociti nel sangue

periferico. Il possibile meccanismo per cui il blocco del TNF $\alpha$ , che ha effetti proapoptici in determinati tipi cellulari, possa determinare la morte programmata dei linfociti T consiste verosimilmente nella riduzione dell'attività di NF-kB, attivato dal TNF $\alpha$ , che ha effetti antiapoptotici in questa linea cellulare (53).

Un'altra azione ipotizzata della terapia con anticorpi anti TNF $\alpha$ , potrebbe essere la modulazione di espressione ed attività delle metalloproteinasi della matrice, prodotte dai fibroblasti intestinali e possibili responsabili del danno mucosale. E' stato infatti dimostrato come il trattamento con infliximab sia in grado di determinare una riduzione, nel siero e nella mucosa intestinale dei pazienti, della metalloproteinasi 9 (MMP-9) ed un incremento della metalloproteinasi 2 (MMP-2) (54). Un altro recente studio del 2007 di Di Sabatino *et al.* (55), ha evidenziato come a seguito del trattamento non si verifici una riduzione significativa delle metalloproteinasi 3 e 12 (MMP-3, MMP-12), ma che si verifichi, invece, un incremento dose dipendente dell'inibitore tissutale delle metalloproteinasi (tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMP-1). Questi dati suggeriscono come la modulazione dell'attività di tali enzimi possa essere uno dei meccanismi chiave nel mucosal healing indotta dai farmaci anti TNF.

Questi studi nel complesso confermano che la neutralizzazione del TNF- $\alpha$  possa essere in grado di modulare l'equilibrio Th17/Tregs sia influenzando l'attività di queste cellule, sia incidendo sulla loro differenziazione e distribuzione compartimentale e ciò si pensa possa essere determinante per l'efficacia terapeutica di questa classe di farmaci.

## SCOPO DELLA TESI

Infliximab rappresenta ad oggi uno dei farmaci più efficaci nel trattamento delle malattie infiammatorie, come le IBD, e altre patologie a eziologia autoimmune come la psoriasi e l'artrite reumatoide. Nonostante sia stato introdotto con efficacia nella pratica clinica da alcuni anni, gli esatti meccanismi che sottendono la sua azione non sono ancora stati completamente chiariti. Soprattutto in ambito gastroenterologico, al momento, non esistono studi riguardanti l'alterazione della polarizzazione linfocitaria e del profilo citochinico a seguito della terapia con anticorpi anti TNF $\alpha$  nei pazienti con malattie infiammatorie croniche intestinali.

A questo proposito, studi recenti hanno evidenziato un ruolo preponderante nella genesi dell'infiammazione intestinale da parte di una classe di linfociti T helper recentemente descritta nota come Th17. I linfociti Th17 si sono dimostrati fondamentali nella genesi dell'infiammazione intestinale associata alle IBD, attraverso la secrezione di citochine a carattere pro infiammatorio quali IL17A, IL17F, TNF $\alpha$ , IL22.

L'obiettivo del nostro studio è stato quello di valutare come la terapia con infliximab fosse in grado di modulare a breve termine l'espressione dell'RNA messaggero (mRNA) specifico per una serie di mediatori di processi infiammatori e immunitari di tipo adattivo e innato in pazienti con malattie infiammatorie croniche intestinali e per controllo in soggetti non affetti da IBD. L'espressione dell'mRNA è stata effettuata al momento dell'arruolamento del paziente e dopo sei settimane di terapia.

Per valutare se la modulazione dell'espressione genica di fattori infiammatori selezionati indotta da infliximab fosse associata alla risposta endoscopica alla terapia, tutti i risultati sono stati correlati con le variazioni degli score endoscopici per la severità in RCU e MC e (Mayo score per la RCU, Simple Endoscopic Score per la MC).

Al fine di confermare a livello proteico la variazione del profilo di espressione genica mucosale, si è deciso di effettuare una immunofluorescenza su biopsie prelevate dallo stesso paziente, nella stessa regione colica, prima e dopo il trattamento con infliximab. Inoltre si è voluto valutare quale fosse l'effetto della terapia anti TNF $\alpha$  sull'infiltrato linfocitario e macrofagico a livello della lamina propria.

## **MATERIALI E METODI**

### **CASISTICA**

Sono stati studiati complessivamente 16 pazienti con IBD in fase attiva e 13 soggetti di controllo.

Pazienti con IBD. Questo gruppo includeva 9 pazienti con CD d'età media 28 anni, e 7 pazienti con UC d'età media 46 anni, con indicazione clinica alla terapia anti TNF $\alpha$  con infliximab. Tutti i pazienti sono stati classificati sulla base dell'estensione di malattia, stato di attività, patologie concomitanti, terapia (5-ASA, aziotioprina/6 mercaptopurina, metotrexate, steroidi) e fumo di sigaretta. L'attività clinica è stata valutata sulla base dell' Harvey Bradshaw index (HBI) per MC, e del Mayo score per la RCU. L'attività endoscopica è stata valutata mediante il Simple Endoscopic Score per la MC (SES-CD) e l'endoscopic Mayo score per la RCU. L'infliximab è stato somministrato per via endovenosa alla dose di 5 mg/kg con un ciclo di induzione che prevede infusioni alle settimane 0, 2 e 6. Al momento dell'arruolamento e 6 settimane dopo l'inizio della terapia sono stati prelevati per ogni paziente quattro campioni di mucosa, mediante rettosigmoidoscopia. Due biopsie sono state fissate immediatamente in azoto liquido e conservate a - 80°C e usate per l'immunofluorescenza, e due incluse in RNA later (Life Technologies, Milano, Italia) e usati per l'estrazione di RNA.

Controlli. Questo gruppo era costituito da 13 soggetti d'età media 34 anni. Essi erano affetti da sindrome dell'intestino irritabile.

Tutti i partecipanti hanno dato il loro consenso informato scritto, allo studio, che è stato approvato dal Comitato Etico della Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano.

## Imunofluorescenza

Le biopsie di mucosa di colica ottenute in corso di rettosigmoidoscopia sono state fissate in azoto liquido e conservate a  $-80^{\circ}\text{C}$  fino al momento del dosaggio. I campioni bioptici sono stati tagliati al criostato in sezioni dello spessore di  $5\ \mu\text{m}$ .

La reazione di immunofluorescenza doppia per l'IL-17A/CD3 e per l'IL-17A/CD14 è stata effettuata utilizzando il kit TSA<sup>TM</sup> 22 (Invitrogen, Italia). Le sezioni sono state poste in camera umida e fissate con formalina 4 % e saccarosio 2 % in tampone fosfato salino (PBS, Sigma-Aldrich, Italia) per 10 minuti a temperatura ambiente. Successivamente sono state incubate con perossido d'idrogeno 1% in PBS per un'ora a temperatura ambiente e per un'altra ora con il blocking reagent 1% in PBS. Le sezioni utilizzate come controllo negativo sono state incubate solo con blocking reagent 1% in PBS, mentre nelle altre venivano aggiunti  $40\ \mu\text{l}$  di anticorpo primario monoclonale murino che riconosce l'IL17A umana (R&D Systems, Abingdon, UK), diluito 1:100 con albumina di siero bovino 1% (BSA, Sigma-Aldrich, Italia), e l'incubazione veniva effettuata per 24 ore a  $+4^{\circ}\text{C}$ . Il giorno successivo le sezioni così trattate erano quindi incubate a temperatura ambiente prima con un anticorpo secondario anti-murino biotinilato (Vector Laboratories, UK), diluito 1:200 in PBS/siero di cavallo 1:200 per 30 minuti, poi con Streptavidina, diluita 1:100 in perossido di idrogeno per 30 minuti, e infine con Tyramide 488 (Invitrogen, Italia), diluita 1:100 in amplification buffer per 5 minuti. Successivamente veniva aggiunto un anticorpo policlonale di coniglio diretto contro CD3 umano (Dako-Cytomation, Milano, Italia) diluito 1:50 in albumina di siero bovino 1% o un anticorpo policlonale di coniglio diretto contro CD14 umano (Abcam, Cambridge, UK) diluito 1:100 in albumina di siero bovino 1% e incubate a  $+4^{\circ}\text{C}$  per 24 ore. I preparati istologici venivano riportati a temperatura ambiente, e incubati con l'anticorpo secondario fluorescente anti-coniglio 568 (Alexa, Invitrogen, Italia), diluito

1:200 in BSA, e l'incubazione continuava per un ora a temperatura ambiente. A questo punto le sezioni erano incubate per 5 minuti con DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, Sigma-Aldrich, Italia), alla concentrazione di 100 ng/mL. Infine ai vetrini con le sezioni venivano aggiunti 30  $\mu$ L di montante sintetico, si copriva il tutto con il vetrino copri oggetti, e si lasciava asciugare a temperatura ambiente fino al momento dell'osservazione al microscopio confocale (Leica Microsystem Microscope), utilizzando il programma Leica Q-Fluoro. Per lo staining dei macrofagi sono stati usati gli anticorpi diretti contro CD14 umano nell'immunofluorescenza doppia con IL17A anziché gli anticorpi diretti contro CD68 umano perché la procedura per la determinazione dei CD68 non era ottimale per determinazione dell' IL 17A.

Per la reazione di immunofluorescenza CD68 le sezioni sono state fissate in acetone freddo per 10 minuti a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Successivamente le sezioni sono state poste in camera umida dopo ripetuti lavaggi in PBS, sono state incubate con anticorpo primario monoclonale ottenuto nei topi diretto contro i CD68 umano (Dako-Cytomation, Milano, Italia) diluito 1:250 in albumina di siero bovino e con un anticorpo policlonale di coniglio diretto contro IL 23p19 umano (Abcam, Cambridge, UK) diluito 1:500 in albumina di siero bovino e incubate a  $+4^{\circ}\text{C}$  per 24 ore. Il giorno successivo le sezioni sono state incubate con un anticorpo secondario fluorescente rispettivamente anti-murino e anti-coniglio (Alexa, Life Technologies) diluiti 1:200 in albumina di siero bovino. Infine ai vetrini con le sezioni venivano aggiunti 30  $\mu$ L di montante sintetico, si copriva il tutto con il vetrino copri oggetti, e si lasciava asciugare a temperatura ambiente fino al momento dell'osservazione al microscopio confocale (Leica Microsystem Microscope), utilizzando il programma Leica Q-Fluoro.

### Estrazione di RNA, preparazione di cDNA e PCR real-time

L'RNA totale è stato estratto dalle biopsie di mucosa del colon ottenute in corso di rettosigmoidoscopia. L'estrazione è stata effettuata mediante TRIZOL (Invitrogen, Italia) secondo la procedura indicata dal produttore. In breve, le biopsie congelate e i pellet cellulari erano omogenizzati e lisati in 1mL di TRIZOL, alla miscela venivano quindi aggiunti 200  $\mu$ L di cloroformio (Sigma-Aldrich, Italia) e i campioni erano centrifugati per 15 minuti a 4°C a 12,000 g. La fase acquosa della soluzione (400  $\mu$ L), contenente l'RNA, era quindi raccolta, miscelata con 500  $\mu$ L di alcool isopropilico (Sigma-Aldrich, Italia), per precipitare l'RNA, e centrifugata per 15 minuti a 4° C a 12,000 g. Il pellet di RNA era lavato con 1 mL di alcool etilico al 70 % (Sigma-Aldrich, Italia) e, dopo evaporazione dell'alcool, risospeso in 20  $\mu$ L di acqua trattata con dietilpirocarbonato (DEPC, Biochemika, Italia). La concentrazione di RNA totale è stata valutata mediante spettrofotometro Nanodrop ND-100 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE) e Bioanalyzer 2100 (Agilent RNA 6000 Nano kit; Agilent Technologies, Inc. Waldbronn, Germany) utilizzando l'assorbanza a 260 nm ( $A_{260}$ ). Successivamente, un' uguale quantità di RNA (500/1000 ng/per campione) è stata retrotrascritta in DNA complementare (cDNA). La reazione di retrotrascrizione è stata effettuata utilizzando il kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Monza, Italia).

Per la PCR quantitativa (real-time PCR) è stato utilizzato TaqMan Low-Density Array Gene Signature Panel (Human Immune Panel; Applied Biosystems, Monza, Italia), che permette la valutazione simultanea dell'espressione di 96 geni correlati alla risposta immunitaria e ai processi infiammatori. La valutazione dell'espressione relativa ai geni è stata effettuata mediante calcolo del delta Ct ( $\Delta$ Ct) utilizzando la media dei geni  $\beta$ -actina, 18S e GAPDH come housekeeping. Come ciclo soglia (Ct) è definito il primo

ciclo di amplificazione in corrispondenza del quale il segnale di fluorescenza supera il segnale di base.

#### Valutazione della morte cellulare programmata per apoptosi

L'apoptosi delle cellule CD68<sup>+</sup> è stata determinata con il metodo TUNEL (In Situ Cell death Detection System, Fluorescein: Roche, Milano, Italia) che è in grado di evidenziare il DNA frammentato presente nelle cellule apoptotiche attraverso l'incorporazione di fluorescina 12-dUTP al terminale 3-OH del DNA substrato per la terminal deossinucleotidil transferasi (TdT). Le sezioni sono state inizialmente fissate in acetone per 10 minuti a -20 °C, poi impermeabilizzate con 0.1% Triton X-100 diluito in 0.1% sodio citrato per due minuti in ghiaccio. Dopo lavaggio con PBS sono state incubate con miscela di reattivo TUNEL (deossinucleotide transferasi terminale e nucleotidi legati a isotiocianato fluorescente) un ora a + 37 °C. Dopo ripetuti lavaggi con PBS le sezioni sono state incubate con anticorpo ottenuto nei topi diretto contro CD68 umano (Dako-Cytomation, Milano, Italia) diluito 1:50 in albumina di siero bovino 1% per 24 ore a + 4 °C. Il giorno successivo, le sezioni sono state incubate con anticorpo secondario antimurino (Alexa, Invitrogen) diluito 1:200 per un'ora a temperatura ambiente. Infine alle sezioni è stato aggiunto un montante (Dako-Cytomation, Milano, Italia) ed esaminato al microscopio a fluorescenza.

### Analisi statistica

I risultati sono stati espressi come media più o meno deviazione standard (SD). Per l'analisi dell'espressione genica è stato usato il software MeV v4.6 (TM4 microarray software). Le differenze tra gruppi sono state valutate mediante test di Wilcoxon per i dati appaiati, e test di Mann-Whitney per i dati non appaiati. La correlazione tra le diverse variabili è stata valutata con il test di Spearman's. Un valore di  $P < 0.05$  è stato considerato statisticamente significativo.

## RISULTATI

Le principali caratteristiche cliniche ed endoscopiche dei pazienti e dei controlli sono riassunte nella **tabella 1**.

I nostri risultati mostrano come alla sesta settimana di terapia con infliximab in tutti i pazienti sia stato osservato un miglioramento del quadro clinico, rappresentato dalla riduzione dell'indice di Harvey-Bradshaw nei pazienti con malattia di Crohn da  $5.7 \pm 4.3$  a  $1.0 \pm 1.6$  ( $P < 0.05$ ), e dalla riduzione dello score Mayo nei pazienti con rettocolite ulcerosa da  $8.6 \pm 2.2$  a  $2.8 \pm 3.0$  ( $P < 0.005$ ). E' interessante osservare come in tutti i pazienti con CD e 4 dei 7 pazienti con UC sia stata raggiunta una remissione clinica.

Dal punto di vista endoscopico l'infliximab ha determinato una riduzione degli score endoscopici. In particolare il SES-CD è diminuito da  $6.4 \pm 2.3$  a  $3.1 \pm 3.6$  ( $P = 0.05$ ) nei pazienti con MC e, il subscore endoscopico Mayo è diminuito da  $2.3 \pm 0.5$  a  $0.8 \pm 1.2$  ( $P = 0.003$ ) nei pazienti con RCU. Sei dei 9 pazienti con CD e 5 dei 7 pazienti con UC hanno raggiunto la guarigione della mucosa dopo trattamento con infliximab.

L'analisi dell'espressione genica a livello della mucosa colica in pazienti con malattie infiammatorie croniche intestinali sottoposti a terapia con infliximab in paragone a controlli sani è riportata nella **fig. 1**. Tutti i pazienti con IBD sono stati considerati indipendentemente dalla risposta clinica ed endoscopica. Nella **Fig. 1 A** si osserva la variazione nell'espressione genica dopo sei settimane di terapia con infliximab rispetto alla condizione basale, in 16 pazienti con malattie infiammatorie intestinali (9 con malattia di crohn e 7 con rettocolite ulcerosa), 32 geni vengono downregolati dalla terapia, mentre 6 sono upregolati. Nella **Fig. 1B** è stata riportato il raggruppamento dei geni la cui espressione è significativamente upregolata rispetto ai controlli al momento dell'arruolamento (a sinistra) e downregolata dopo la terapia con infliximab (a destra). L'intersezione evidenzia i geni upregolati rispetto ai controlli che

vengono ridotti significativamente dalla terapia. In particolare, il marcatore del lineage macrofagico *Cd68*, il gene ossido nitrico sintetasi inducibile (*Nos2a*), i geni delle citochine *Il17*, *Il1 $\beta$* , e *Tnf*, e i geni dei recettori delle chemochine *Ccl3*, *Ccl19*, *Ccr7* e i geni espressi dalle cellule presentanti l'antigene mature (*Cd80* e *Cd86*) ritornano ai livelli normali dopo terapia con infliximab.

Nella **Fig 2A** si può osservare la relazione tra la variazione dell'espressione genica mucosale e la risposta endoscopica alla terapia con infliximab. Tra i geni che sono significativamente modulati dalla terapia con infliximab solo una piccola quota correla con la risposta endoscopica. Nei pazienti con malattie infiammatorie croniche intestinali, il miglioramento endoscopico era significativamente associato con la down regolazione del gene *Cd68* ( $\rho = -0.788$ ,  $P= 0.0003$ ), *Nos2a* ( $\rho = -0.583$ ,  $P= 0.017$ ), il fattore stimolante le colonie granulocitarie e macrofagiche *Csf2* ( $\rho = -0.543$ ,  $P=0.0029$ ) e *Il18* ( $\rho = -0.0496$ ,  $P= 0.05$ ). Infine una significativa correlazione è stata trovata tra il miglioramento endoscopico e la riduzione dell'espressione genica dell'*Il17a* ( $\rho = -0.554$ ,  $P= 0.025$ ) e *stat 3* ( $\rho = -0.525$ ,  $P= 0.036$ ).

Per avere una conferma dei dati ottenuti dall'analisi di correlazione abbiamo confrontato la variazione di espressione genica nei pazienti in cui si è avuta una guarigione della mucosa (buona risposta alla terapia) con quella di pazienti in cui non si è avuta la guarigione della mucosa (bassa risposta alla terapia) dopo trattamento con infliximab. Come si può osservare, nella **Fig. 2B**, i pazienti in cui si è avuta la guarigione sono caratterizzati da una significativa riduzione dell'espressione genica di *Cd68*, *Nos2a*, e *Il17a* ( $P= 0.026$ ,  $0.031$ , e  $0.041$  rispettivamente) rispetto ai pazienti in cui non si è osservata la guarigione della mucosa. Questo suggerisce come la riduzione dell'infiltrazione macrofagica e dell'espressione genica di *Il17a* mediata da infliximab possa risultare rilevante nel determinare la guarigione della mucosa intestinale nei pazienti con IBD.

Inoltre è stato osservato come la diminuzione dell'espressione genica di *Il17a* correlasse significativamente con la riduzione dell'espressione genica di *Cd68* ( $\rho = 0.626$ ,  $P = 0.009$ ) e come entrambe le variazioni dell'espressione genica di *Il17a* e di *Cd68* correlassero significativamente con la variazione di espressione genica dell'*Il23p19* ( $\rho = 0.591$ ,  $P = 0.02$  e  $\rho = 0.596$ ,  $P = 0.024$  rispettivamente) (**Fig 3**).

Per valutare se la riduzione osservata nell'espressione di IL17A fosse correlata o secondaria a un ridotto infiltrato linfocitario a livello della lamina propria, abbiamo analizzato simultaneamente l'espressione di IL17A e del marker linfocitario CD3 su sezioni di biopsie di mucosa colica al momento dell'arruolamento e alla sesta settimana di terapia con infliximab mediante immunofluorescenza doppia. Come visibile dalla **Fig. 4** una riduzione significativa dell'espressione mucosale di IL17A non risultava associata a una concomitante riduzione globale dell'infiltrato linfocitario CD3+.

L'analisi citofluorimetrica delle cellule mononucleate della lamina propria isolate dalla mucosa intestinale sia di pazienti con IBD che dei controlli ha permesso di identificare la percentuale di cellule CD3+, CD14+ e CD11b+. Per confermare se ci fosse un'associazione tra la riduzione dell'infiltrato macrofagico e la diminuzione dell'espressione genica dell'*Il17a* è stata effettuata una immunofluorescenza doppia con IL17A e il marker macrofagico CD14.

Come si può osservare nella **fig 5** la terapia con infliximab induce una concomitante riduzione dell'espressione mucosale di IL17A e dei macrofagi CD14 nei pazienti con IBD in cui si è avuta la guarigione della mucosa. L'aspetto interessante che è emerso dall'analisi al FACS delle cellule mononucleate della lamina propria è stato che tutte le cellule CD14+ esprimessero CD68.

Parallelamente è stata valutata la variazione di espressione di CD68 e Il23p19 nei pazienti con IBD in terapia con infliximab ed è stato osservato una significativa

riduzione sia dell'infiltrato macrofagico che dell'espressione mucosale di Il23p19 nei pazienti in cui si è avuta la guarigione della mucosa (**Fig. 6**).

Per quantificare i diversi effetti della terapia con infliximab nella modulazione dell'infiltrazione linfocitaria e macrofagica della lamina propria è stata effettuata una immunistochemica quantitativa per le cellule CD3+ e CD68+, su sezioni di mucosa prelevati al momento dell'arruolamento e dopo sei settimane dal trattamento. Si è osservato come la terapia con infliximab riduca significativamente il numero dei macrofagi Cd68+ ( $249 \pm 56$  cellule/5high power field (hpf) al momento dell'arruolamento *versus*  $157 \pm 35$  cellule /5hpf dopo sei settimane di terapia,  $P=0.029$ ) senza alterare l'infiltrato linfocitario.

Per chiarire quale fosse il meccanismo responsabile della riduzione dei macrofagi CD68+ osservato nella mucosa intestinale dopo la terapia con infliximab è stato effettuato il dosaggio TUNEL su sezioni di mucosa prelevate al momento dell'arruolamento e dopo sei settimane di terapia. Nella **fig. 7** si osserva come il trattamento con anti TNF- $\alpha$  porti a un aumento del numero di apoptosi delle cellule CD68+ (da  $2 \pm 1$  cellule/hpf al momento dell'arruolamento a  $7 \pm 3$  cellule/hpf dopo trattamento con infliximab;  $P<0.05$ ), questo indica che l'infusione di infliximab fosse in grado di indurre l'apoptosi delle cellule CD68+.

## DISCUSSIONE

Nonostante la dimostrazione dell'efficacia degli anticorpi anti TNF $\alpha$  nel trattamento delle IBD, oltre che di altre patologie determinate da disordini immunitari, il meccanismo sotteso è ancora oggetto di studio e di discussione. Particolare attenzione si sta ponendo sulle capacità di infliximab di modulare la componente immunitaria e citochinica, responsabile di tale infiammazione.

Dopo le iniziali dimostrazioni del coinvolgimento di linfociti CD4+ Th1 prevalentemente nella malattia di Crohn (22) e dei linfociti CD4+ Th2 prevalentemente nella RCU (23) mediante dimostrazione degli aumentati livelli delle citochine specifiche per queste due popolazioni linfocitarie nella mucosa dei pazienti affetti da tali patologie, l'attenzione si è spostata verso una nuova sottopopolazione linfocitaria CD4+, i Th17. Valutando la presenza di specifici fattori di trascrizione (ROR $\gamma$ T) e l'espressione mucosale delle principali citochine prodotte da queste cellule, IL17A in primis, è stato possibile concludere che tali linfociti, attraverso la produzione di IL17A e, a cascata, di altre citochine infiammatorie come IL1 e TNF $\alpha$ , giochino un ruolo essenziale nello sviluppo delle IBD (32).

Nel tentativo quindi di chiarire i principali meccanismi d'azione degli anticorpi anti TNF $\alpha$ , abbiamo valutato l'espressione genica per l'*IL 17A*, e per il marcatore del lineage macrofagico Cd68 e Nos2a al momento dell'arruolamento e dopo 6 settimane di terapia con infliximab somministrato e.v. ad un dosaggio di 5 mg/kg. Abbiamo così dimostrato come nella mucosa colica di pazienti affetti da malattie infiammatorie croniche intestinali ci sia un'espressione significativamente maggiore di IL17A rispetto a controlli, e che a seguito della terapia si verificasse un'importante riduzione di tale espressione genica. Questo primo dato ha indicato la rapida capacità del farmaco di indurre delle profonde modifiche funzionali nelle cellule mucosali dei pazienti affetti da

IBD. I nostri risultati rendono conto di una marcata riduzione di IL17A in quasi tutti i pazienti in trattamento.

Questi dati, nel complesso, ci consentono di affermare che nelle IBD ci sia un importante coinvolgimento della popolazione linfocitaria recentemente identificata come Th17, come testimoniato dagli elevati livelli delle loro specifiche citochine nella mucosa dei pazienti affetti da IBD e che l'infliximab agisca andando a modulare, attraverso meccanismi complessi e ancora da definire, il profilo citochinico mucosale determinato da tali cellule. E' altresì vero che il farmaco è in grado anche di agire su altre popolazioni linfocitarie, Th1 soprattutto, fortemente coinvolte nella genesi di tali patologie.

Una volta cominciato a chiarire quali potessero essere i principali meccanismi d'azione di infliximab ci siamo proposti di correlare la risposta endoscopica con la variazione dei livelli di espressione genica dell' IL17A e CD68 a livello mucosale. Ciò che è stato riscontrato è una significativa relazione tra la riduzione nell'espressione genica nella mucosa dei mediatori dell'infiammazione acuta e la risposta endoscopica alla terapia.

Inoltre, dal momento che la guarigione della mucosa (mucosal healing) è uno dei dati che maggiormente correla in clinica con il mantenimento del benessere nel lungo periodo (56) abbiamo deciso di correlare tali variazioni di espressione genica con la guarigione mucosa, ed, in effetti, ulteriori analisi hanno confermato una significativa differenza tra le variazioni di *IL17A*, *CD68* e *Nos2a* nei pazienti che hanno raggiunto o non hanno raggiunto la completa guarigione della mucosa. Questi dati sono importanti non soltanto perché confermano che uno dei principali meccanismi d'azione di infliximab sia la modulazione delle citochine Th17 correlate a livello della mucosa dei pazienti IBD, ma anche perché mostrano una stretta correlazione tra tali citochine e l'attività di malattia, confermando il ruolo che questi linfociti svolgono nella genesi

delle malattie infiammatorie croniche intestinali. Questo può essere così uno spunto per identificare nuove terapie che agiscano modulando il profilo delle cellule immunitarie della mucosa.

Per capire se la riduzione nell'espressione di mediatori dell'infiammazione fosse determinato da una ridotta infiltrazione cellulare piuttosto che da una ridotta espressione di citochine e di altri mediatori abbiamo valutato l'espressione proteica di IL17A e CD68 su campioni biotici di mucosa colica mediante immunofluorescenza doppia IL-17A/CD3 e IL-17A/CD14, CD68 e IL23p19 prima e dopo la terapia con infliximab, dimostrando che è proprio questa seconda ipotesi quella corretta. Si comprende quindi che la terapia anti TNF $\alpha$ , non vada tanto a modificare l'infiltrato linfocitario a livello intestinale, quanto vada, invece, a modulare l'espressione genica e la polarizzazione delle cellule coinvolte nel processo infiammatorio intestinale.

La correlazione tra l'analisi di espressione genica e l'immunofluorescenza indica una significativa associazione tra riduzione dell'infiltrato macrofagico nella lamina propria dopo terapia con infliximab e la riduzione di IL17 A. Ciò suggerisce che esiste un possibile legame tra i due eventi nella fase attiva della malattia e nella guarigione della mucosa nei pazienti con IBD.

Questi dati devono quindi offrire uno spunto per valutare possibili terapie in grado di modificare la polarizzazione linfocitaria a livello mucosale che, alla luce della correlazione con dati clinici ed endoscopici, sembra essere una buona via per il controllo di queste patologie.

## BIBLIOGRAFIA

1. Trallori G, Palli D, Saieva C, Bardazzi G, Bonanomi A, d'Albasio G, et al. A population-based study of inflammatory bowel disease in Florence over 15 years (1978-92). *Scand J Gastroenterol.* 1996;31(9):892-9.
2. Lakatos P. Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: up or down? *World J Gastroenterol.* 2006;12(38):6102-8.
3. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut.* 2006;55(6):749-53.
4. Su C, Judge T, Lichtenstein G. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am.* 2002;31(1):307-27.
5. Harvey RF, Bradshaw JM. A simple index of Crohn's-disease activity. *Lancet.* 1980;1(8167):514.
6. D'Haens G, Sandborn WJ, Feagan BG, Geboes K, Hanauer SB, Irvine EJ, et al. A review of activity indices and efficacy end points for clinical trials of medical therapy in adults with ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 2007;132(2):763-86.
7. Schroeder K, Tremaine W, Ilstrup D. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study. *N Engl J Med.* 1987;317(26):1625-9.
8. Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G, Floderus-Myrhed B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut.* 1988;29(7):990-6.

9. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugerie L, et al. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature*. 1996;379(6568):821-3.
10. Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Strober W. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol*. 2004;5(8):800-8.
11. Seksik P, Nion-Larmurier I, Sokol H, Beaugerie L, Cosnes J. Effects of light smoking consumption on the clinical course of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15(5):734-41.
12. Soderholm JD, Olaison G, Peterson KH, Franzen LE, Lindmark T, Wiren M, et al. Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease. *Gut*. 2002;50(3):307-13.
13. Franchimont D, Vermeire S, El Housni H, Pierik M, Van Steen K, Gustot T, et al. Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut*. 2004;53(7):987-92.
14. Cruickshank SM, McVay LD, Baumgart DC, Felsburg PJ, Carding SR. Colonic epithelial cell mediated suppression of CD4 T cell activation. *Gut*. 2004;53(5):678-84.
15. Ina K, Itoh J, Fukushima K, Kusugami K, Yamaguchi T, Kyokane K, et al. Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance. *J Immunol*. 1999;163(2):1081-90.
16. Martin B, Banz A, Bienvenu B, Cordier C, Dautigny N, Becourt C, et al. Suppression of CD4+ T lymphocyte effector functions by CD4+CD25+ cells in vivo. *J Immunol*. 2004;172(6):3391-8.

17. Charo I, Ransohoff R. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med.* 2006;354(6):610-21.
18. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature.* 2007;448(7152):427-34.
19. Niess JH, Leithauser F, Adler G, Reimann J. Commensal gut flora drives the expansion of proinflammatory CD4 T cells in the colonic lamina propria under normal and inflammatory conditions. *J Immunol.* 2008;180(1):559-68.
20. Ivanov I, Frutos RL, Manel N, Yoshinaga K, Rifkin D, Sartor R, et al. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe.* 2008;4(4):337-49.
21. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 1986;136(7):2348-57.
22. Parronchi P, Romagnani P, Annunziato F, Sampognaro S, Becchio A, Giannarini L, et al. Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am J Pathol.* 1997;150(3):823-32.
23. Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, et al. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology.* 2005;129(2):550-64.
24. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nat Immunol.* 2008;9(6):641-9.

25. Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, Hastings WD, Bettelli E, Oukka M, et al. IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature*. 2008;454(7202):350-2.
26. Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jäger A, Strom T, et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature*. 2007;448(7152):484-7.
27. van Beelen AJ, Zelinkova Z, Taanman-Kueter EW, Muller FJ, Hommes DW, Zaat SA, et al. Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity*. 2007;27(4):660-9.
28. Beynon V, Cotofana S, Brand S, Lohse P, Mair A, Wagner S, et al. NOD2/CARD15 genotype influences MDP-induced cytokine release and basal IL-12p40 levels in primary isolated peripheral blood monocytes. *Inflamm Bowel Dis*. 2008;14(8):1033-40.
29. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science*. 2006;314(5804):1461-3.
30. Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, McKenzie B, et al. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest*. 2006;116(5):1310-6.
31. Sandborn WJ, Feagan BG, Fedorak RN, Scherl E, Fleisher MR, Katz S, et al. A randomized trial of Ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in

patients with moderate-to-severe Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2008;135(4):1130-41.

**32.** Reiko M. Onishi and Sarah L Gaffen Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology*, 2010;129, 311-321

**33** Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2003;52(1):65-70.

**34.** Seiderer J, Brand S. IL-22: a two-headed cytokine in IBD? *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15(3):473-4.

**35.** Murch SH, Lamkin VA, Savage MO, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Serum concentrations of tumour necrosis factor alpha in childhood chronic inflammatory bowel disease. *Gut*. 1991;32(8):913-7.

**36.** Braegger C, Nicholls S, Murch S, Stephens S, MacDonald T. Tumour necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation. *Lancet*. 1992;339(8785):89-91.

**37.** Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu S. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell*. 1988;53(1):45-53.

**38.** Pender S, Fell J, Chamow S, Ashkenazi A, MacDonald T. A p55 TNF receptor immunoadhesin prevents T cell-mediated intestinal injury by inhibiting matrix metalloproteinase production. *J Immunol*. 1998;160(8):4098-103.

**39.** Eckmann L, Jung HC, Schurer-Maly C, Panja A, Morzycka-Wroblewska E, Kagnoff MF. Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell lines: regulated expression of interleukin 8. *Gastroenterology*. 1993;105(6):1689-97.

40. Wedemeyer J, Lorentz A, Göke M, Meier P, Flemming P, Dahinden C, et al. Enhanced production of monocyte chemoattractant protein 3 in inflammatory bowel disease mucosa. *Gut*. 1999;44(5):629-35.
41. van Deventer SJ. Review article: targeting TNF alpha as a key cytokine in the inflammatory processes of Crohn's disease--the mechanisms of action of infliximab. *Aliment Pharmacol Ther*. 1999;13 Suppl 4:3-8; discussion 38.
42. Caprioli F, Sarra M, Caruso R, Stolfi C, Fina D, Sica G, et al. Autocrine regulation of IL-21 production in human T lymphocytes. *J Immunol*. 2008;180(3):1800-7.
43. Monteleone G, Caruso R, Fina D, Peluso I, Gioia V, Stolfi C, et al. Control of matrix metalloproteinase production in human intestinal fibroblasts by interleukin 21. *Gut*. 2006;55(12):1774-80.
44. Brand S, Beigel F, Olszak T, Zitzmann K, Eichhorst ST, Otte JM, et al. IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290(4):G827-38.
45. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med*. 2007;204(8):1849-61.
46. Pineton de Chambrun G, Peyrin-Biroulet L, Lemann M, Colombel JF. Clinical implications of mucosal healing for the management of IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010;7(1):15-29.

47. Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, Mayer L, Present DH, Braakman T, et al. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N Engl J Med.* 1997;337(15):1029-35.
48. Rutgeerts P, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF, et al. Comparison of scheduled and episodic treatment strategies of infliximab in Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2004;126(2):402-13.
49. Present DH, Rutgeerts P, Targan S, Hanauer SB, Mayer L, van Hogezaand RA, et al. Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *N Engl J Med.* 1999;340(18):1398-405.
50. Sands BE, Anderson FH, Bernstein CN, Chey WY, Feagan BG, Fedorak RN, et al. Infliximab maintenance therapy for fistulizing Crohn's disease. *N Engl J Med.* 2004;350(9):876-85.
51. Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, et al. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med.* 2005;353(23):2462-76.
52. Luger A, Schmidt M, Luger N, Pauels HG, Domschke W, Kucharzik T. Infliximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic active Crohn's disease by using a caspase-dependent pathway. *Gastroenterology.* 2001;121(5):1145-57.
53. ten Hove T, van Montfrans C, Peppelenbosch M, van Deventer S. Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes in Crohn's disease. *Gut.* 2002;50(2):206-11.

- 54.** Gao Q, Meijer MJ, Schluter UG, van Hogezaand RA, van der Zon JM, van den Berg M, et al. Infliximab treatment influences the serological expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and -9 in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13(6):693-702.
- 55.** Di Sabatino A, Pender S, Jackson C, Prothero J, Gordon J, Picariello L, et al. Functional modulation of Crohn's disease myofibroblasts by anti-tumor necrosis factor antibodies. *Gastroenterology.* 2007;133(1):137-49.
- 56.** Baert F, Moortgat L, Van Assche G, Caenepeel P, Vergauwe P, De Vos M, et al. Mucosal healing predicts sustained clinical remission in patients with early-stage Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2010;138(2):463-8; quiz e10-1.