



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

XXIX CICLO DEL DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE DELLA RIPRODUZIONE E DELLO SVILUPPO

MICROBIOTA E DIFETTO IMMUNE NELLA PATOGENESI DELLA MALATTIA DI CROHN: SVILUPPO DI MODELLI PER LO STUDIO DI POSSIBILI APPROCCI CORRETTIVI NON IMMUNO-SOPPRESSIVI

Settore scientifico-disciplinare: MED/38

Dottoranda:

Dott.ssa Claudia Loganes

Coordinatore:

Prof. Alessandro Ventura

Supervisore:

Dott. Alberto Tommasini

ANNO ACCADEMICO 2015/2016

RIASSUNTO

La malattia di Crohn (MC) è una malattia infiammatoria cronica dell'intestino che può colpire qualsiasi tratto del tubo digerente. Nonostante siano stati effettuati numerosi studi, la patogenesi della MC non è ancora chiara e non si dispone di trattamenti in grado di guarire stabilmente la malattia. Il sistema immunitario innato sembra giocare un ruolo fondamentale nella patogenesi: è stato osservato infatti un coinvolgimento di alcuni geni dell'immunità innata ed uno squilibrato rapporto tra sistema immune mucosale e microbiota intestinale. Dati clinici e genetici portano a pensare che alla base della patogenesi stiano un difettoso funzionamento dell'immunità innata mucosale e una risposta infiammatoria adattativa compensatoria. Lo sviluppo di modelli adeguati a studiare la complessità di questa malattia risulta difficile per la molteplicità di fattori coinvolti, genetici e ambientali.

L'obiettivo di questa tesi di dottorato è stato quello di sviluppare dei modelli che tenessero conto della complessità della patologia e che permettessero di evidenziare dei profili tipici di risposta a componenti batteriche.

Il primo approccio *ex vivo* sviluppato ha analizzato le diverse *pathway* di attivazione in monociti circolanti, per evidenziare l'eventuale presenza di un difetto di risposta dell'immunità innata. Da questo test è emerso che i pazienti affetti da MC non sembrano presentare un difetto di risposta, bensì un'iperattivazione delle *pathway* innate, testimoniata da un'aumentata produzione monocitaria di TNF α . Questo stato infiammatorio, riscontrabile sia in condizione basale sia in seguito a stimolazione di alcuni recettori innati, non è riconducibile né al genotipo di *NOD2* (analizzate le principali mutazioni associate a malattia) né all'attività di malattia dei pazienti presi in analisi, né ancora alla presenza in circolo di componenti batteriche (segno di traslocazione batterica intestinale).

Il secondo modello sviluppato ha analizzato direttamente la risposta immunologica mucosale nel tessuto intestinale, più pertinente alla patogenesi della malattia rispetto alle cellule presenti nel circolo periferico. Attraverso una cultura *ex vivo* di biopsie coliche in presenza o assenza di antibiotici, si è voluto valutare l'influenza del microbiota sulla

secrezione citochinica. Con un'analisi logistica multivariata, è stato possibile dimostrare l'esistenza di un profilo citochinico (G-CSF, TNF α , IL4 e IL17) in grado di discriminare la MC dalla rettocolite ulcerosa. E' stato quindi dimostrato che la MC e la rettocolite ulcerosa presentano differenti profili di risposta citochinica e che la flora batterica associata a mucosa è in grado di modulare la risposta mucosale.

Con il terzo approccio è stata valutata la risposta cellulare di una linea epiteliale intestinale a diversi composti di origine microbica, utilizzando un sistema automatizzato che fornisce in tempo reale informazioni sulla crescita, adesione, morfologia e vitalità cellulare. Da questa analisi è emerso che solo il composto purificato di derivazione micobatterica è in grado di indurre un'alterazione temporanea della cinetica cellulare; questa variazione non è dovuta alla morte cellulare, ma probabilmente ad una variazione della permeabilità del simil-epitelio ricreato *in vitro*. Ulteriori test sono necessari per far chiarezza sull'effetto dato da questo composto sulla mucosa intestinale, visto il ruolo controverso del *Mycobacterium Avium paratuberculosis* nella patogenesi della MC.

In conclusione, in questi tre anni di dottorato è stato possibile sviluppare diversi modelli per evidenziare specifici profili di risposta mucosale tipici della MC, su cui studiare l'effetto di nuove strategie terapeutiche correttive, basate sulla modulazione dell'interazione tra immunità mucosale e microbiota intestinale. I risultati ottenuti sono stati oggetto di due pubblicazioni sulla rivista internazionale "*World Journal of Gastroenterology*".

INDICE

INDICE

INTRODUZIONE.....	1
LA MALATTIA DI CROHN.....	2
Caratteristiche isto-patologiche e classificazione.....	3
Quadro clinico, diagnosi e terapia	5
Immunopatogenesi ed eziologia	10
Suscettibilità genetica.....	12
NOD2	16
Fattori ambientali	20
Le infezioni microbiche	21
IL MICROBIOTA INTESTINALE	24
Interazione microbiota-sistema immune mucosale.....	24
I recettori PRRs (TLRs e NLRs).....	26
Alterazione del microbiota nella MC.....	32
OBIETTIVI.....	35
MATERIALI E METODI.....	37
Obiettivo 1: analisi delle <i>pathway</i> immunitarie innate in monociti periferici.....	38
Reclutamento dei pazienti.....	38
Espressione intracellulare di TNF α	38
Analisi delle varianti di NOD2.....	40
Quantificazione di CD14 solubile (CD14s) e LPS Binding Protein (LBP).....	40
Analisi statistica	41
Obiettivo 2: coltura <i>ex vivo</i> di biopsie coliche e analisi citochinica.....	42
Reclutamento dei pazienti.....	42
Coltura <i>ex vivo</i> di biopsie coliche	42
Quantificazione citochinica.....	43
Analisi statistica	43
Obiettivo 3: analisi della risposta epiteliale a componenti batteriche purificate.....	45
Linea cellulare e reagenti.....	45
Analisi di impedenza con il sistema xCELLigence.....	45
Test di vitalità.....	46
Analisi statistica	47
RISULTATI.....	48
Studio 1: analisi delle <i>pathway</i> immunitarie innate in monociti periferici	49

Espressione del TNF α intracellulare.....	49
Analisi genotipica di <i>NOD2</i>	52
Dosaggio di LPS Binding Protein (LBP) e CD14 solubile	53
Attività di malattia nei pazienti con MICI	57
Studio 2: coltura <i>ex vivo</i> di biopsie coliche e analisi citochinica.....	58
Disegno sperimentale	58
Espressione citochinica basale	59
<i>Pattern</i> citochinico indotto dal MDP	62
Regressione logistica multivariata e analisi della curva ROC per identificare profili di citochine pro-infiammatorie associate a MICI	64
Studio 3: analisi della risposta epiteliale a componenti batteriche purificate.....	67
Analisi di impedenza elettrica e di vitalità cellulare	67
DISCUSSIONE.....	70
CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE.....	77
BIBLIOGRAFIA	79
APPENDICI.....	84

INTRODUZIONE

LA MALATTIA DI CROHN

La malattia di Crohn (MC) è una malattia infiammatoria cronica che può colpire qualsiasi tratto del tubo digerente; assieme alla Rettocolite Ulcerosa (RCU) e alla colite non classificata, appartiene alla famiglia delle cosiddette Malattie Infiammatorie Croniche dell'Intestino (MICI), gruppo di patologie multifattoriali a carattere infiammatorio che interessano il tratto gastro- intestinale.

La patologia prende il nome dal gastroenterologo americano Burrill Bernard Crohn che nel 1932, insieme a due colleghi, descrisse una serie di pazienti con infiammazione dell'ileo terminale [1].

La MC e la RCU presentano alcune caratteristiche comuni, come la natura infiammatoria delle lesioni, l'andamento clinico cronico-ricidivante e l'eziopatogenesi sconosciuta, ma allo stesso tempo si differenziano per la localizzazione e la tipologia della lesione, per l'aspetto clinico e patogenetico [2].

In particolare la MC può coinvolgere qualsiasi tratto dell'intero canale alimentare, dalla bocca all'ano, con una maggior prevalenza a livello dell'intestino tenue e crasso (localizzazione ileale o colica), con lesioni transmurali che interessano l'intera parete intestinale (tonaca mucosa, sottomucosa, muscolare e sierosa); le lesioni tipiche della RCU invece coinvolgono l'intestino crasso (colon e retto), con processi flogistici principalmente mucosali [3].

La MC è diffusa in tutto il mondo con una maggior prevalenza nelle nazioni occidentali; è una patologia che interessa sia maschi che femmine, ma colpisce principalmente i giovani adulti di sesso maschile di età compresa tra i 15 ed i 30 anni, anche se non sono rari esordi in età pediatrica o in età più avanzate. Infatti c'è stato negli ultimi anni un significativo, rapido e progressivo aumento dei casi pediatrici.

Le MICI in età pediatrica hanno destato negli ultimi anni sempre maggior attenzione e interesse: i pazienti con MICI ad insorgenza precoce presentano un esordio più insidioso accompagnato da una sintomatologia più severa e una non-risposta ai trattamenti farmacologici convenzionali.

Caratteristiche isto-patologiche e classificazione

La MC si manifesta come una reazione tipicamente granulomatosa recidivante (granuloma non caseoso).

L'infiammazione granulomatosa è una forma distinta di flogosi cronica caratterizzata da un ricco infiltrato di macrofagi attivati, linfociti, cellule epitelioidi e cellule giganti multinucleate. La formazione del granuloma deriva di solito dalla presenza di un patogeno che, essendo uno stimolo antigenico cronico e persistente, stimola le cellule del sistema immunitario a produrre citochine. Questo contesto citochinico porta al differenziamento dei macrofagi (cellule epitelioidi) e alla loro successiva fusione, con la formazione delle cellule giganti. Le cellule immunitarie attivate da una parte limitano e contengono l'agente estraneo, dall'altra rilasciano prodotti tossici derivati dal metabolismo cellulare che portano a danni tissutali.

Questa reazione granulomatosa si sviluppa in presenza di un relativo *deficit* dei meccanismi immunitari, non in grado di contrastare e debellare l'agente estraneo, o in presenza di un agente patogeno particolarmente resistente ai meccanismi di sorveglianza immunitari.

La mucosa intestinale di un paziente affetto da MC presenta lesioni ulcerose aftoidi, localizzate principalmente nelle placche di Peyer a livello dell'ileo e all'interno dei follicoli linfoidi del colon.

Le lesioni tipiche della MC, a differenza di quelle della RCU, possono estendersi a tutti gli strati della parete intestinale, con un'infiammazione transmurale a tutto spessore che può colpire la tonaca mucosa, sottomucosa, muscolare e quella sierosa [3]; inoltre presentano una distribuzione discontinua, caratterizzata da un susseguirsi di regioni infiammate intervallate ad aree di rigenerazione (lesioni a salto, "*skip lesions*"). La presenza di zone edematose rigonfie inframmezzate da solchi con ulcere a decorso irregolare conferisce alla mucosa un aspetto tipico descritto come ad "acciottolato romano". La flogosi intermittente è probabilmente una conseguenza di un difetto della barriera mucosale, epiteliale e/o immunologica, con conseguente disregolazione dei meccanismi dell'immunità sia innata che acquisita.

La flogosi trasmurale e la proliferazione cellulare nella sottomucosa (infiltrazione prevalentemente mononucleata) predispone a diverse complicanze, quali fistole tra le anse intestinali e stenosi del lume intestinale.

La classificazione di riferimento per le MICI pediatriche è quella di Parigi del 2009 [4], che ha perfezionato le precedenti di Montreal (2005) [5, 6] e Vienna (1998) [7] ponendo maggiore attenzione all'età della diagnosi, alla localizzazione e all'andamento della malattia.

In base all'età di esordio, la MC viene classificata:

- 0-10 anni (A1a);
- 10-17 anni (A1b);
- 17-40 anni (A2);
- > 40anni (A3).

Per quanto riguarda la localizzazione della malattia, l'interessamento ileale è quello preponderante, ma non esclusivo: sono stati descritti numerosi casi a localizzazione esclusivamente colica o ileo-colica, nonché casi con interessamento del cavo orale e anale.

In particolare, la MC colpisce i seguenti tratti intestinali:

- Ileo terminale (L1, 45% dei casi);
- colon (L2, 32% dei casi);
- ileo-colite (L3, 19% dei casi);
- tratto gastrointestinale superiore, gastroduodenale (L4a e L4b, 4% dei casi).

Inoltre la MC può venir distinta a seconda del diverso comportamento della patologia in fase di progressione:

- Infiammatorio (B1, 70%), con flogosi senza stenosi o fistole;
- Stenosante (B2, 17%), con restringimento del lume (occlusione intestinale);
- Penetrante (B3);
- Stenosante e penetrante (B2B3);
- Malattia perianale (P).

Quadro clinico, diagnosi e terapia

La MC è caratterizzata da un quadro clinico comprendente sia sintomi aspecifici e sistemici (febbre, perdita di peso, astenia, rallentamento/arresto della crescita) sia sintomi strettamente colitici, dovuti all'effetto della flogosi sulla mucosa intestinale, dai più lievi (diarrea muco-ematica persistente, malassorbimento, crampi addominali) a quelli più seri (ascessi, fistole, stenosi, occlusione e masse addominali) [8].

Lo stato cronico infiammatorio può portare a gravi complicanze gastroenterologiche, quali perforazioni intestinali e insorgenza di neoplasie, o complicanze sistemiche, come alterazioni metaboliche, oculari (uveite), dermiche (eritema nodoso, pioderma gangrenoso), articolari (artrite), vascolari e nutrizionali.

Nella maggior parte dei casi la malattia esordisce con la classica triade di sintomi, dolore addominale, diarrea e perdita di peso, anche se i pazienti con insorgenza precoce presentano una sintomatologia atipica. Nelle MICI pediatriche infatti la classica triade si riscontra solo in una minoranza dei casi (25%), mentre è più diffuso riscontrare un arresto della crescita isolato, che si osserva nel 40% dei casi e rappresenta il segno più precoce della malattia.

Sia nelle MICI adulte che pediatriche, i pazienti alternano periodi di acutizzazione a periodi di remissione dei sintomi.

La frequente aspecificità del quadro clinico nella MC porta ad un grave ritardo diagnostico e terapeutico: essa può venir infatti confusa con altre condizioni infiammatorie, quali artrite reumatoide o febbre di origine indeterminata.

Un'infiammazione incontrollata in pazienti affetti da MC è spesso associata ad una prognosi sfavorevole. Per questo è necessario definire, prima possibile, un corretta diagnosi e un giusto approccio terapeutico.

Per diagnosticare la malattia non si dispone di un unico test di semplice esecuzione, ma viene utilizzata una combinazione di più procedure, quali analisi del sangue, analisi delle feci, valutazioni endoscopiche e studi di *imaging*.

Il sospetto di MICI deve essere preso in considerazione in tutti i pazienti con perdita di peso, sintomi gastroenterici (diarrea, dolore addominale) e positività agli indici di flogosi

(di regola sempre alterati nella MC e meno costantemente nella RCU), senza trascurare i sintomi atipici, quali anemie, artriti, ritardo di crescita e anoressia.

In presenza di questa sintomatologia, ulteriori accertamenti diagnostici come ecografia, colonscopia ed, eventualmente, esofago-gastro-duodenoscopia, vengono prescritti per confermare il sospetto clinico.

La colonscopia, pur essendo un'analisi invasiva, rimane uno dei metodi migliori per diagnosticare la MC, perché permette la visualizzazione diretta del colon e dell'ileo terminale, e il prelievo di biopsie endoscopiche, ovvero piccoli frammenti biotici per l'analisi istopatologica.

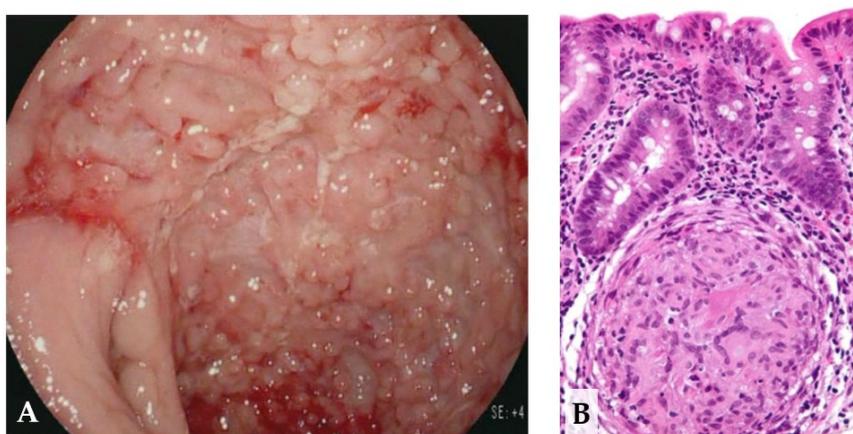


Figura 1. Tipica mucosa ad "acciottolato romano" caratteristica della MC (A).
Analisi istologica da biopsia endoscopica: infiammazione granulomatosa del colon (B).

Durante l'indagine endoscopica, possono venir individuate erosioni aftose, ulcere superficiali o profonde, intervallate da tratti di mucosa indenne (irregolarità della flogosi mucosale) (Fig. 1A), ma anche polipi e stenosi intestinale. Dato che la MC presenta una distribuzione segmentaria e discontinua, è necessaria una valutazione endoscopica più accurata di tutto l'intestino crasso e quello tenue, per verificare il contemporaneo interessamento di più segmenti intestinali e per formulare una chiara diagnosi [3]. A livello istologico, l'alterazione tipica, associata ad un'infiltrazione flogistica prevalentemente mononucleata, è rappresentata dal granuloma non caseoso, sempre documentabile in tutti i pazienti affetti da MC (Fig. 1B).

Per confermare la diagnosi, si associano all'endoscopia altri esami ematochimici, non specifici, ma che testimoniano comunque la presenza di uno stato infiammatorio

sistemico. Nella MC si osserva infatti una riduzione della sideremia e un aumento degli indici di flogosi [Proteina C Reattiva (PCR) e velocità di eritrosedimentazione (VES)] e dei globuli bianchi.

Il dosaggio della calprotectina e della lattoferrina nelle feci è invece un indice più specifico di infiammazione intestinale: esse sono infatti proteine termostabili rilasciate dai granulociti e dai globuli bianchi nel lume intestinale. Vengono quindi considerate come *biomarkers* non invasivi per rilevare la presenza di un'infiammazione a carico della mucosa intestinale. Il test della calprotectina non è indicato soltanto per diagnosticare la patologia, ma trova applicazione anche nel *follow up* e nel monitoraggio della terapia specifica dei pazienti.

L'attività di malattia viene anche monitorata valutando la permeabilità intestinale alle macromolecole, strettamente correlata alla funzione di barriera mucosale. Questo test, largamente utilizzato nella pratica gastroenterologica, permette di analizzare, in maniera non invasiva, la condizione di barriera intestinale, utilizzando sostanze incapaci, in condizioni di integrità, di superare l'epitelio intestinale. Queste sostanze atossiche, se assorbite, vengono completamente escrete per via renale e sono quindi facilmente dosabili nelle urine. Il test più utilizzato è il test di permeabilità a due zuccheri (monosaccaride/disaccaride): il monosaccaride di dimensioni minori (il mannitolo) attraversa la mucosa attraverso i pori degli enterociti, mentre il disaccaride (il lattulosio) di maggior grandezza, può superare la barriera intestinale attraverso le giunzioni intercellulari. Nella MC, caratterizzata da una compromissione mucosale, si osserva un aumento del rapporto monosaccaride/disaccaride, dovuto all'aumentata permeabilità ad entrambe le macromolecole.

Il fatto di non aver individuato ancora le cause eziopatogenetiche rende tuttora la MC una patologia di difficile trattamento clinico.

L'obiettivo della terapia è di ridurre l'infiammazione, ottenere una remissione a lungo termine ed evitare ricadute (molto frequenti nelle MICI), oltre che di garantire uno stile di vita il più normale possibile per il paziente. Questi obiettivi possono essere raggiunti con un intervento nutrizionale, una terapia medica e, talora, con un approccio chirurgico.

La terapia nutrizionale (*exclusive enteral nutrition*, EEN) consiste in una dieta elementare, semi-elementare o polimerica, somministrata di solito per sondino naso-gastrico. E' stato

dimostrato che questo tipo di intervento dietetico è in grado di indurre e mantenere la remissione in pazienti affetti da MC, permettendo, al contrario degli steroidi, una normale crescita e sviluppo puberale [9, 10]; inoltre porta alla normalizzazione della permeabilità intestinale con una conseguente guarigione mucosale (*mucosal healing*), segnale di una remissione a lungo termine. L'efficacia terapeutica è stata dimostrata principalmente per i pazienti affetti da MC, ma non per soggetti affetti da RCU. Non sono ancora noti i meccanismi d'azione: nonostante ci siano dati contrastanti, si ipotizza che gli effetti benefici siano riconducibili ad un ridotto carico di antigeni luminali, alla modificazione della flora batterica intestinale, ad un ridotto apporto di acidi grassi o ad un miglioramento dell'assorbimento dei nutrienti.

Per quanto concerne i trattamenti terapeutici, i farmaci maggiormente utilizzati nella MC sono farmaci anti-infiammatori (corticosteroidi), immuno-modulatori (azatioprina, metotressato) e farmaci biologici (Infliximab), tutti trattamenti che agiscono prevalentemente sui sintomi infiammatori e non sulle dirette cause della malattia.

I corticosteroidi (prednisone, metilprednisolone e budesonide), somministrati per via orale o endovenosa, vengono usati per combattere la malattia in fase acuta o, se dati a basse dosi e per un breve periodo, nella fase di mantenimento. L'approccio cortisonico si dimostra buono per abbassare la febbre, limitare la diarrea e il dolore addominale, ma se utilizzato a lungo termine, può portare a effetti collaterali seri (effetti neuropsichici, cardiovascolari ed osteomuscolari) ed ad un aggravamento della situazione. I corticosteroidi svolgono quindi una buona azione sui sintomi infiammatori, senza portare però alla guarigione completa della mucosa.

I farmaci immunomodulatori (azatioprina e il suo derivato, 6mercaptipurina, metotressato, ciclosporina) sono sostanzialmente ben tollerati e sono una terapia efficace a lungo termine per indurre una remissione duratura; possono essere usati per diminuire ad un dosaggio accettabile la terapia steroidea nei soggetti corticodipendenti e risultano efficaci nelle malattie resistenti ai corticosteroidi e nel trattamento di particolari complicanze come le fistole.

La remissione della mucosa può venir indotta seguendo una terapia biologica, che viene utilizzata nelle forme più severe di malattia. I farmaci biologici (Infliximab e Adalimumab), somministrati per via endovenosa o sottocutanea, sono anticorpi

monoclonali che legano e sequestrano in modo selettivo una citochina coinvolta nel processo flogistico, il fattore di necrosi tumorale (TNF α , *tumor necrosis factor α*). Una volta raggiunta la remissione, viene indicato un altro trattamento di fondo per il mantenimento della fase remissione.

Altri farmaci come la Talidomide sono stati recentemente proposti per la terapia di mantenimento con ottimi risultati. La talidomide è una piccola molecola in grado di modulare l'ubiquitinazione di proteine segnale, con diversi effetti che includono l'inibizione del TNF α e dell'angiogenesi. Non è tuttavia chiaro se questi siano i meccanismi sfruttati per la cura della MC. Questo farmaco risulta essere efficace nel trattamento, non solo dei bambini con MC, ma anche da quelli affetti da RCU refrattari ad altre terapie, e può indurre remissione nel lungo termine: studi osservazionali hanno dimostrato infatti la sua efficacia nell'indurre la remissione clinica ed endoscopica dal 40% al 70% dei casi [11]. Il trattamento però resta cronico e il rischio di ricaduta alla sospensione rimane elevato.

Nonostante siano numerosi i farmaci usati per la MC, non è stato ancora trovato un approccio farmacologico risolutivo che porti a guarigione; in alcuni casi, con localizzazione esclusivamente al colon, l'asportazione di questo segmento di intestino può condurre ad una guarigione stabile, seppure al prezzo di possibili effetti collaterali e complicanze.

In conclusione, le uniche terapie in commercio sono tutte sintomatiche che si limitano a combattere l'infiammazione e ad ottenere la remissione della fase acuta, prevenendo possibili ricadute.

Le recidive purtroppo sono molto comuni in queste patologie: superano il 50% dei casi nel primo anno dopo la prima remissione.

Nel caso di complicanze, come ostruzione intestinale, formazione di fistole e ascessi intrattabili, è necessario ricorrere all'intervento chirurgico.

Immunopatogenesi ed eziologia

Nonostante siano stati condotti diversi studi immunopatogenetici, l'eziologia e le cause di questa patologia cronica multifattoriale rimangono sconosciute.

L'ipotesi patogenetica più accreditata racchiude diversi fattori concatenati, come un'alterata composizione della flora batterica commensale intestinale (disbiosi), un'alterazione della mucosa intestinale e un *deficit* di risposta alla microflora autoctona.

Sewell et al. hanno proposto un modello patogenetico a 3 stadi (Fig. 2), sviluppato integrando i risultati ottenuti dalle analisi genetiche e dai modelli animali [12]: questo modello prevede la penetrazione del contenuto intestinale attraverso la barriera mucosale, per un aumento della permeabilità intestinale (stadio 1), seguita da una debole risposta infiammatoria acuta dovuta ad un difetto di secrezione di citochine pro-infiammatorie da parte delle cellule immunitarie innate. Il minor reclutamento dei neutrofili, conseguenza di questo difetto primario di risposta, porta al mancato *clearance* del materiale antigenico (stadio 2). A questo punto, i macrofagi fagocitano il materiale estraneo e si attivano, secernendo una seconda ondata di citochine che porta al reclutamento di cellule T, le quali si differenziano in cellule con fenotipo Th1 (stadio 3). In questo stadio, anche se la singola produzione citochinica di ogni cellula risulta difettosa, visto il gran numero di cellule reclutate, si raggiunge un alto livello di citochine pro-infiammatorie che portano ad un danno tessutale e alla perpetuazione dell'infiammazione.

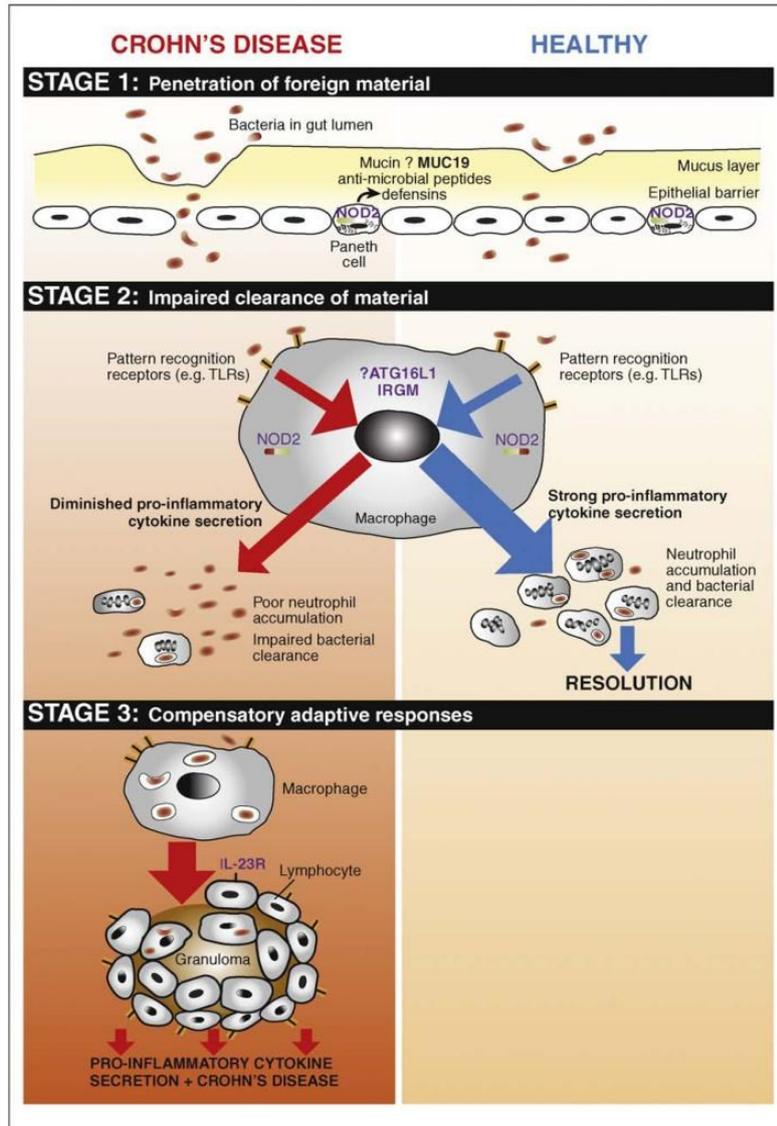


Figura 2. I tre stadi dell'immunopatogenesi della MC, secondo Sewell [12].

Secondo questo modello, la formazione del granuloma, l'infiltrazione linfocitaria e l'infiammazione cronica, dovute tutte all'azione dell'immunità adattativa, rappresentano quindi un meccanismo compensatorio, che fa fronte all'iniziale fallimento e alla ridotta funzionalità del sistema immunitario innato [12]. Valutazioni immunitarie effettuate da Marks e collaboratori confermano la presenza di queste disfunzioni innate nei pazienti con MC [13].

L'eziologia delle malattie infiammatorie intestinali, essendo patologie a carattere multifattoriale, non è ancora di chiara interpretazione: la causa più probabile dell'insorgenza delle MICI sembra essere una combinazione e un'interazione tra fattori

genetici (che predispongono allo sviluppo della malattia) e fattori ambientali (che determinano lo sviluppo della malattia), tutti elementi che portano ad una risposta mucosale aberrante a discapito dell'equilibrio tra microbiota intestinale e sistema immune mucosale [8].

Suscettibilità genetica

Il ruolo del patrimonio genetico nella patogenesi della MC è stato confermato da numerose osservazioni epidemiologiche: uno studio ha dimostrato che i gemelli omozigoti, cioè geneticamente identici, mostrano un tasso di concordanza elevato (che va dal 38% al 64%), mentre nei gemelli eterozigoti questa percentuale si abbassa drasticamente (0-7%) [14]. Inoltre se si osserva la storia familiare di un paziente affetto, è emerso che nei pazienti di primo grado, il rischio di sviluppare la patologia è aumentato di 4-20 volte rispetto ai controlli; il rischio diventa ancora più alto per i familiari e i fratelli del soggetto affetto.

Si può parlare quindi di una sorta di "familiarità", anche se non è stato trovato un uniforme meccanismo di ereditarietà. Gli studi familiari dimostrano che il modello di trasmissione è quello delle malattie geneticamente complesse [14]. Queste malattie sono infatti poligeniche e multifattoriali, in cui il fenotipo clinico deriva da un'interazione tra determinanti genetici e fattori di rischio ambientali.

Di fondamentale importanza per chiarire e identificare i fattori genetici implicati nella patogenesi della MC, sono stati inizialmente gli studi genetici condotti mediante l'analisi di *linkage*, seguiti dai numerosi studi di associazione "Genome Wide Association Studies" (GWAS) iniziati nel 2006 e dalle più recenti meta-analisi.

I primi studi di associazione negli anni '80 condotti mediante approccio del gene candidato e focalizzati principalmente sui geni della famiglia HLA, hanno portato a risultati contrastanti e insoddisfacenti [15]; successivamente analisi di *linkage* hanno permesso di identificare delle regioni cromosomiche condivise da parenti affetti. La prima regione trovata tramite questa strategia è localizzata sul cromosoma 16 e denominata IBD1, seguita da altri diversi loci di associazione trovati su altre zone cromosomiche designate come IBD 1-9 [16, 17]. Alcuni di questi loci identificati risultano essere malattia-specifici: il locus IBD1 mostra un significativo grado di *linkage* solo nei

pazienti affetti da MC, mentre altri mostrano un'associazione comune con entrambe le patologie intestinali (MC e RCU).

Da queste prime analisi genetiche è emerso che nella MC non è coinvolto solo un singolo gene (nemmeno pochi geni), ma piuttosto un gran numero di varianti geniche. Gli studi di *linkage* risultavano a questo punto poco utili per l'identificazione di questa serie complessa di geni. Sono stati sviluppati a questo proposito studi di associazione *genome-wide* (GWAS) combinati con una serie di meta-analisi, che hanno permesso di trovare ulteriori loci e alleli di rischio con minore effetto, confermando così il crescente sospetto che nella MC sia coinvolto un numero elevato di geni, che presi singolarmente inducono generalmente effetti molto deboli sul rischio di malattia.

Nel corso degli anni, attraverso questi studi GWAS-meta-analisi sono stati così identificati 163 diversi loci di associazione per le MICI: 110 comuni ad entrambe le patologie, 23 specifici per la RCU e 30 per la MC [18]. La figura 3 riassume tutti i loci comuni e malattia-specifici che sono stati confermati essere associati alle MICI.

Sono stati trovate varianti di rischio associate alla MC, sia ad esordio precoce che tardivo, in diversi geni implicati:

- nella risposta immunitaria innata (*NOD2*);
- nell'autofagia (*ATG16L*);
- nella *pathway* dell'interleuchina 23 (*IL23R*, *JAK2*, *STAT3* e *IL12B*), citochina coinvolta nel mantenimento delle cellule Th17, coordinatrici della difesa contro specifici patogeni e mediatrici dell'infiammazione [19];
- nel *signalling* del TNF (*TNFRSF9* e *TNFRSF11*): questi geni codificano per proteine che svolgono vari effetti immunitari, tra cui l'attivazione della cascata infiammatoria e l'attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B.

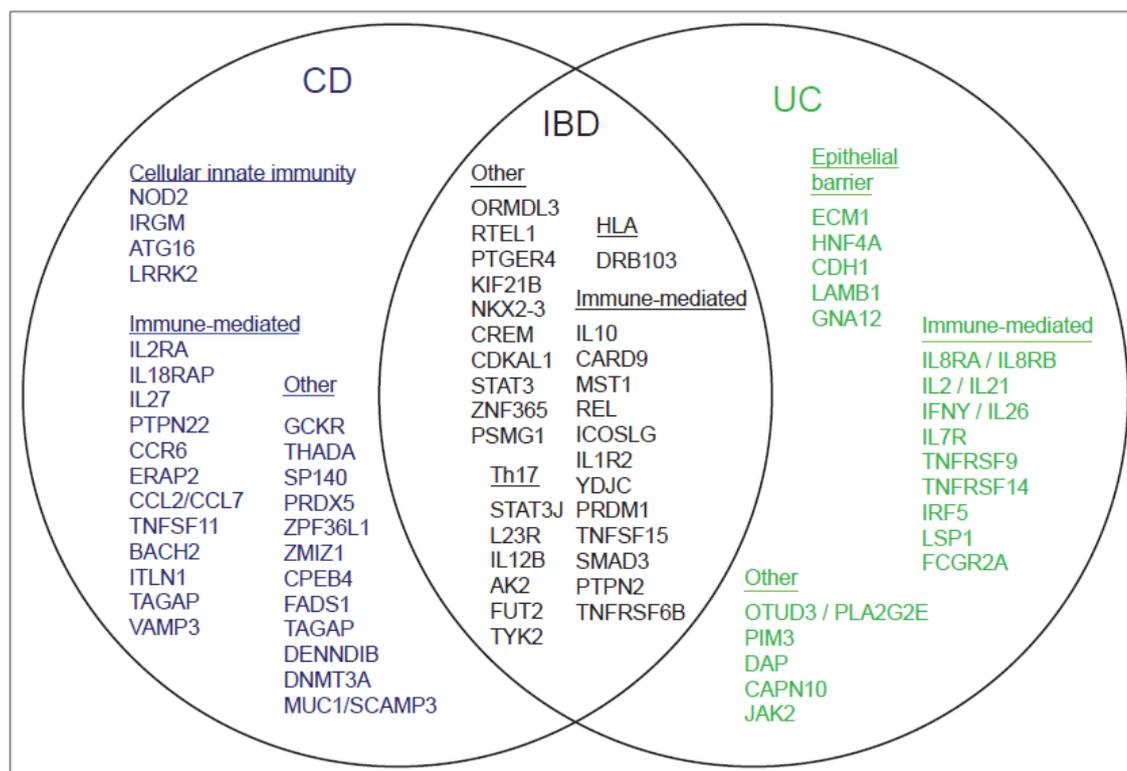


Figura 3. Loci associati alle MICI. I geni comuni ad entrambe le patologie sono rappresentati in nero, quelli associati solo alla MC in blu e quelli associati alla RCU in verde [14].

Un gene che sembra essere fortemente correlato alla MC è il gene *Autophagy-related 16-like 1* (ATG16L), coinvolto nei processi autofagici.

L'autofagia è un processo catabolico di rimozione selettiva di componenti citoplasmatici; questo materiale viene sequestrato all'interno di una vescicola a doppia membrana, chiamata autofagosoma, che si fonderà con il lisosoma; a questo punto gli enzimi litici potranno degradare e riciclare il contenuto citoplasmatico. Questo processo viene attivato per fornire energia alla cellula, per rinnovare i componenti intracellulari e per eliminare proteine e organelli danneggiati. Inoltre questo processo gioca un ruolo importante nella risposta cellulare a stress o insulti patogeni. Tramite questo meccanismo infatti la cellula infettata da virus o batteri è in grado di degradare gli agenti patogeni intracellulari.

La proteina ATG16L, espressa nelle cellule epiteliali intestinali, nei linfociti e nei macrofagi, fa parte del complesso ATG5-ATG12 ed è la responsabile della formazione e attivazione dell'autofagosoma [20]. Tramite un'analisi *genome wide*, che ha studiato 19779 polimorfismi di singoli nucleotidi non sinonimi in 735 pazienti affetti da MC e 368 controlli, è stato identificato il polimorfismo Thr300Ala (T300A) che rappresenta un

importante fattore di rischio per l'insorgenza della MC [21]. E' stato ipotizzato che questa variante possa alterare il meccanismo autofagico e in particolare la risposta antibatterica, portando ad un fenotipo *loss of function* della proteina coinvolta. Grazie ad uno studio condotto da Kuballa e colleghi è stato possibile evidenziare che le cellule epiteliali con la variante T300A perdono la capacità di catturare e legare il patogeno intracellulare (*Salmonella typhimurium*) all'interno dell'autofagosoma [22]. Questo polimorfismo influenza anche la funzionalità delle cellule di Paneth, cellule intestinali specializzate localizzate nelle cripte di Lieberkühn, fondamentali nel tenere sotto controllo la flora batterica intestinale. I pazienti portatori di questa variante in omozigosi presentavano un difetto strutturale di queste cellule, comprendente di una diminuzione del numero di granuli e un difetto lisosomiale [23].

Queste varianti trovate nella cascata autofagica possono quindi portare a delle alterazioni nella composizione della microflora intestinale e ad una minor difesa nel tratto gastroenterico, tutti cambiamenti che recano danno tessutali e infiammazione, segni presenti e centrali nella MC.

Mutazioni in altri geni coinvolti nell'immunità innata sembrano avere una correlazione con patologie infiammatorie intestinali: in particolare, polimorfismi in NLRP3 e NLRP6 sono altamente correlati ad una maggior suscettibilità a sviluppare la MC [24]. NLRP6 è altamente espresso nelle cellule epiteliali intestinali, nelle cellule della lamina propria e nei miofibroblasti intestinali e gioca un ruolo fondamentale nel regolare la composizione del microbiota intestinale [25]. Anche il recettore NLRC4 svolge un ruolo importante a livello della mucosa intestinale, dove è in grado di distinguere batteri commensali da quelli patogenetici [26].

NOD2

Il gene *NOD2/CARD15* (*Nucleotide oligomerization domain 2/caspase-activation recruitment domain containing protein 15*) è il primo gene di suscettibilità per la MC, identificato nel 2001 e localizzato nel cromosoma 16 all'interno del locus IBD1 [17, 27]. Ad ora è considerato il più importante gene coinvolto nella suscettibilità alla MC.

Questa proteina appartiene alla famiglia dei recettori dell'immunità innata NLRs (*NOD Like Receptors*) e svolge le seguenti funzioni:

- riconoscimento di componenti batteriche;
- difesa da patogeni (PAMPs, *Pathogen Associated Molecular Patterns*) o da segnali di pericoli extracellulare (DAMPs, *Danger Associated Molecular Patterns*);
- modulazione della risposta infiammatoria, tramite attivazione del fattore di trascrizione *Nuclear factor-κB* (NF-κB);
- controllo della maturazione dei fagociti;
- partecipazione all'attivazione della cascata delle caspasi nell'apoptosi [28].

La struttura proteica di NOD2 comprende tre domini diversi (Fig. 4):

- 2 domini CARD (*Caspase-activating and recruitment domain*) al N-terminale: responsabile del reclutamento e del legame di proteine con domini simili;
- 1 dominio NBD (*Nucleotide binding domain*) centrale: responsabile dell'oligomerizzazione delle proteine contenenti i domini CARD e del legame dei nucleotidi, innescando l'attivazione di NF-κB;
- 1 dominio LRR (*Leucine Rich Repeats*) al C-terminale: responsabile del riconoscimento dei PAMPs.

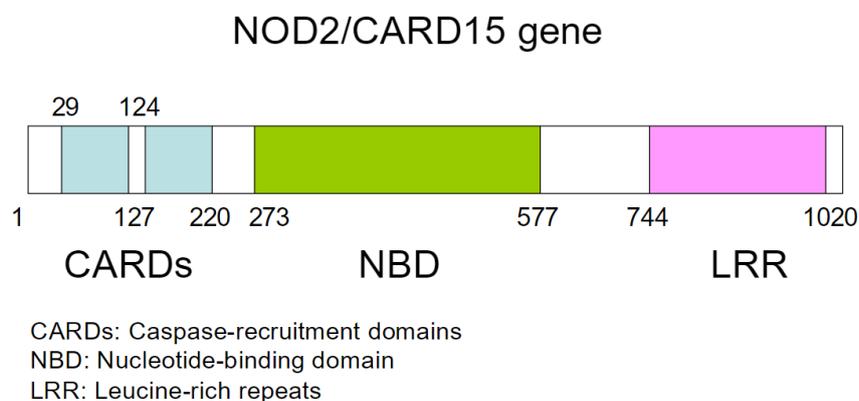


Figura 4. Struttura proteica di NOD2.

NOD2 codifica per una proteina espressa costitutivamente a livello della linea monocitica, macrofagica e dendritica mentre la sua espressione viene indotta in presenza di uno stimolo pro-infiammatorio o componenti batteriche anche nelle cellule epiteliali intestinali e nelle cellule di Paneth dell'ileo terminale [28]. La proteina funge da sensore intracellulare nella risposta immunitaria innata contro batteri gram-negativi e gram-positivi, legando la componente presente sulla loro parete cellulare, il muramil dipeptide (MDP). Nonostante la presenza di peptidoglicani, non tutte le specie batteriche sono in grado di indurre una risposta *NOD2*-dipendente: questo indica una specificità di *NOD2* solo verso alcuni stimoli batterici [29].

Il MDP, entrato all'interno della cellula mediante un meccanismo sconosciuto, lega e attiva *NOD2*. L'interazione con il ligando determina un cambiamento conformazionale di *NOD2* che permette l'associazione con RICK/RIP2 e, mediante una serie di reazioni, l'attivazione di NF- κ B che, tramite la secrezione di chemochine e citochine, attiva la risposta immunitaria. Inoltre *NOD2* è in grado di stimolare la secrezione di peptidi antimicrobici come le α -defensine [28].

La funzione della proteina *NOD2* nell'intestino è quella di ostacolare e prevenire l'invasione del tessuto intestinale da parte di batteri presenti nel lume. La famiglia dei NLRs costituisce quindi un importante sistema di riconoscimento microbico che va ad interagire con un altro *network* di recettori dell'immunità innata. È stato infatti dimostrato che *NOD2* è in grado di modulare positivamente o negativamente la cascata di segnalazione dei *Toll Like Receptors* (TLRs). Nello specifico, l'attivazione di *NOD2* porta alla down-regolazione del *signalling* del TLR2, riducendo l'attivazione del NF- κ B da parte del TLR2 e la secrezione dell'interleuchina IL12. Viceversa, la cascata del segnale mediata dal TLR4 viene stimolata dalla proteina *NOD2* che è in grado di aumentare l'espressione di una proteina chiave della cascata di trasduzione del segnale del TLR4, la proteina MyD88 [30].

Sono state evidenziate più di trenta mutazioni a carico di tutto il gene *NOD2*. Di queste varianti, tre sono state confermate essere associate indipendentemente ad una maggior suscettibilità alla MC:

- R702W (c.2104C>T) rs2066844
- G908R (c.2722G>C) rs2066845
- L1007Pfs (c.3016_3017insC) rs2066847

Tutte e tre le mutazioni sono localizzate a livello del C-terminale, all'interno o adiacente al dominio LRR. Le prime due varianti sono mutazioni *missense* che portano ad una variazione amminoacidica che produce un'alterazione della conformazione proteica; la terza è una mutazione *frameshift* che determina la generazione di proteina tronca (mancante di 33 amminoacidi) non funzionante (iporesponsività ai composti batterici) [29]. Queste 3 varianti si riscontrano in eterozigosi nel 10-30% dei pazienti affetti da MC ed in omozigosi nel 3-15% [31].

La presenza di una sola copia di alleli di rischio conferisce un rischio di sviluppare la patologia aumentato di 2-4 volte; in particolare la mutazione L1007Pf mostra la più forte associazione con la MC conferendo un rischio relativo totale di insorgenza della malattia aumentato di 6-7 volte rispetto alla popolazione generale. Un ulteriore incremento (fino a 20-40 volte) si riscontra nei pazienti omozigoti o negli eterozigoti composti.

La prevalenza di questi tre polimorfismi varia in tutto il mondo, sia nei pazienti sani sia negli individui affetti da MC: la più alta prevalenza è stata individuata in Europa e in America, arrivando fino al 40% di pazienti portatori di almeno un polimorfismo. Il più basso tasso di mutazione invece è stato riscontrato nell'Europa del Nord (Scandinavia e Scozia), mentre queste mutazioni sembrano essere assenti nei paesi asiatici (Giappone, Korea, Cina).

Da diversi studi è emerso che queste tre varianti causano un'alterazione della funzionalità della proteina, ovvero un'alterazione nella capacità del sistema immunitario intestinale di reagire in modo appropriato alla presenza dei batteri che colonizzano l'intestino (Fig. 5).

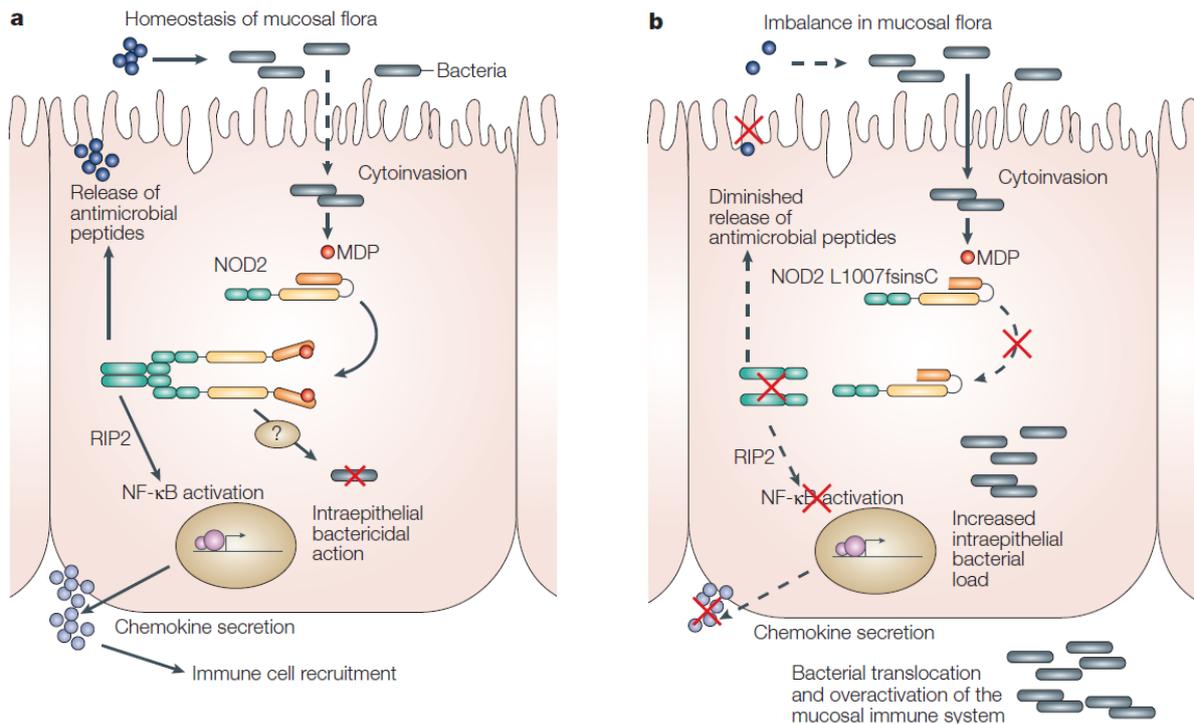


Figura 5. Ruolo di NOD2 nella barriera epiteliale dell'intestino, in condizioni fisiologiche (a) o patologiche (b) [32].

Mediante esperimenti di trasfezioni transienti di *NOD2* mutato è stato infatti dimostrato che queste tre varianti inibiscono il corretto riconoscimento e legame del MDP e quindi l'attivazione di NF-κB, suggerendo un fenotipo di *loss of function* che sembra agire in maniera recessiva [33]. L'attività antimicrobica della proteina viene ripristinata (con una conseguente minor presenza e crescita di batteri invasivi), una volta trasfettato *NOD2 wild type* nelle cellule dell'epitelio intestinale [34].

Modelli murini *knock out* del gene *NOD2* hanno confermato la presenza di un difetto dell'immunità innata a livello dell'epitelio intestinale: sono stati riscontrati, infatti, maggiori infezioni orali dovute ad esempio a *L. monocytogenes* e una contemporanea diminuzione dell'espressione di alcuni peptidi antimicrobici secreti dalle cellule di Paneth, come le defensine. Anche in vivo, nei pazienti affetti da MC si nota una diminuzione dell'espressione delle α-defensine HD5 e HD6 nel piccolo intestino, in concordanza con gli effetti riscontrati nei modelli *knock out* sopra descritti.

Contrariamente a quello che ci si poteva attendere, mutazioni a carico del gene *NOD2* non sono responsabili dell'aumentata attivazione di NF-κB, ma al contrario è stato

dimostrato che, in particolari modelli cellulari, lo stimolo di NOD2 mutato conduce ad una diminuita attivazione della cascata infiammatoria rispetto alla proteina *wild type*.

E' dunque difficile comprendere come le mutazioni di questo gene possano conferire suscettibilità per MC, una patologia in cui l'attivazione del NF-kB e la conseguente espressione di TNF α sono state ripetutamente dimostrate.

Una potenziale spiegazione dell'associazione delle mutazioni di NOD2 con la patologia è che queste varianti possano provocare un difetto nel controllo dei batteri intestinali; ciò comporterebbe un'attivazione secondaria compensatoria del sistema immune acquisito con abnorme attivazione di una risposta mediata da cellule T, infiammazione tissutale (attivazione NF-kB mediante un meccanismo NOD2-indipendente) e produzione eccessiva di citochine, tutti segni distintivi della MC.

Nonostante siano state trovate queste varianti (L1007Pfs, R702W, G908R), il 60-70% dei soggetti malati non presenta *NOD2* mutato [28], ad indicare che il ruolo svolto dalla genetica è complesso e che i geni coinvolti sono probabilmente molteplici.

Sono stati infatti mappati altri loci, a livello del cromosoma 12 (IBD2), 6 (IBD3) e 14 (IBD4), che potrebbero essere coinvolti nello sviluppo della malattia [35].

Fattori ambientali

Il notevole incremento dell'incidenza delle MICI negli ultimi decenni non è attribuibile solamente alla predisposizione genetica. L'ipotesi più accreditata è che i fattori ambientali giochino un ruolo importante nello sviluppo di queste patologie in soggetti geneticamente predisposti [36]. In particolare pare siano stati rilevanti le migliori condizioni socio-economiche e alimentari dovute all'occidentalizzazione crescente dello stile di vita e il miglioramento delle condizioni igieniche, con una conseguente minor esposizione a patogeni enterici (ipotesi igienica) [37].

Differenti fattori ambientali sembrano modulare l'insorgenza e il decorso clinico della MC e/o della RCU, tra cui la dieta (ricca in zuccheri, grassi e proteine e povera in frutta e verdura), fattori psicosomatici (stress), uno stile di vita sedentario [38-40], l'assunzione di farmaci (antibiotici, contraccettivi orali e farmaci anti-infiammatori), alcuni agenti infettivi e la flora batterica intestinale.

Il fumo è in assoluto la condizione ambientale più influente, ma con effetti opposti sulle due patologie infiammatorie: rappresenta uno dei più importanti fattori di rischio, soprattutto nel sesso femminile, per la MC mentre è dimostrato essere un elemento protettivo per lo sviluppo della RCU [41, 42]. L'azione della nicotina potrebbe essere quella di aggravare difetti dell'immunità innata presenti nella malattia. Il fumo è stato dimostrato essere un fattore determinante un maggior rischio di recidive, associato ad un decorso clinico più grave [41]. Altro fondamentale fattore ambientale che influisce sull'insorgenza ed il decorso delle MICI è la dieta. Una correlazione positiva è stata osservata tra l'incidenza della malattia e un alto consumo di proteine animali (carne), grassi totali, acidi grassi omega-6 e zuccheri raffinati [43]; mentre un alto introito di frutta e vegetali sembrerebbe ridurre il rischio di sviluppo della MC [44].

Le infezioni microbiche

Numerose evidenze sperimentali, dal punto di vista epidemiologico e clinico-patologico, hanno suggerito anche il contributo di agenti infettivi nell'eziologia della MC.

L'ipotesi infettiva è sostenuta dalla presenza di batteri nelle lesioni intestinali e nel materiale fecale di pazienti affetti e dall'efficacia (in alcuni casi) nell'utilizzo di antibiotici per il trattamento della malattia.

Queste evidenze, sostenute dall'esistenza di alcuni polimorfismi associati a malattia presenti in geni che codificano per alcuni recettori dell'immunità innata (responsabili del riconoscimento di batteri patogeni) e per proteine autofagiche (responsabili dell'eliminazione di batteri patogeni), supportano l'ipotesi del coinvolgimento di alcuni agenti infettivi nello sviluppo della MC.

Tanti tentativi sono stati fatti per isolare un microrganismo che potesse rappresentare il fattore scatenante della MC, ma, ad ora, nessun patogeno è stato identificato in modo convincente.

Diverse similarità cliniche e istopatologiche tra la MC e la malattia di Johne (MJ), un enterite granulomatosa cronica che colpisce bovini e altri ruminanti, causata dal *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP), suggeriscono un ruolo potenziale di questo patogeno nella complessa eziologia della MC.

Il MAP è in grado di invadere i macrofagi nel tessuto linfoide e aumentare di numero all'interno dei fagosomi, inibendo la loro maturazione e promuovendo il reclutamento delle cellule infiammatorie. Questo processo, associato all'attivazione delle cellule T e alla produzione di IFN γ , porta alla formazione di lesioni granulomatose che caratterizzano la MJ [45]. Questo agente patogeno può sopravvivere per un lungo periodo in diversi ecosistemi, grazie alla sua alta resistenza ambientale, e infettare animali e umani. Le principali fonti di esposizione umana includono forniture d'acqua, prodotti lattiero-caseari e carne di animali infetti [46, 47].

La diffusione ambientale del MAP può rappresentare una condizione favorevole per l'insorgenza di MICI, quando associata ad una condizione di immunodeficienza intestinale in soggetti geneticamente suscettibili.

L'ipotesi micobatterica ha suscitato un grande interesse scientifico negli anni '80, quando Chiodini e colleghi isolarono l'agente patogeno e il suo DNA da campioni biologici di pazienti affetti da MC [48]. Un altro recente studio condotto da Xia e collaboratori, ha evidenziato che i soggetti con MC, ma non quelli con la RCU, presentano aumentati livelli di anticorpi contro una specifica proteina micobatterica, la tirosina fosfatasi, secreta dal MAP durante l'infezione [49]. Questi risultati sono sostenuti da alcuni studi clinici, secondo i quali il 70% dei pazienti hanno raggiunto una remissione clinica in seguito a somministrazione di antibiotici con una forte attività micobattericida [50].

Nonostante questi dati a sostegno dell'ipotesi micobatterica, il coinvolgimento del MAP nella MC è ancora controverso: diversi autori sostengono l'esistenza di una stretta relazione tra MAP e MC, ma un chiaro legame eziologico non è stato ancora dimostrato. Un altro batterio, il cui ruolo nella eziopatologia della MC è stato discusso da tempo, è l'*Escherichia Coli* (E.Coli), in particolare il ceppo aderente-invasivo (AIEC).

Questo microrganismo è stato più volte isolato dalle mucose infiammate di pazienti con MC, grazie alla sua capacità di aderire alle cellule epiteliali gastro-intestinali e demolire la barriera intestinale tramite la produzione di alfa-emolisina [51]. Ulteriori studi hanno rivelato che AIEC stimola il rilascio della citochina pro-infiammatoria IL8 che induce a sua volta l'espressione del TNF α nei macrofagi, portando alla formazione del granuloma. Osservazioni immunoistochimiche hanno infatti dimostrato la presenza di antigeni

E.Coli-specifici in biopsie di pazienti affetti provenienti da aree particolarmente ulcerose all'interno dei granulomi e della lamina propria [52].

Sfortunatamente le molte ricerche sull'ipotesi infettiva sono arrivate spesso a conclusioni contraddittorie e, allo stato attuale, non è ancora stato scoperto se esiste un vero ruolo attivo di questi batteri nelle fasi scatenanti della malattia. Per considerare un agente infettivo come causa della patologia, è necessario dimostrare che l'infezione preceda l'insorgenza della malattia, ma i diversi studi condotti non hanno fornito delle forti evidenze a riguardo.

La mancata identificazione di singoli germi associati alla malattia potrebbe indicare che più importante della patogenicità del ceppo in causa è la possibilità che alcuni germi, in seguito a vari fattori favorenti (aumentata permeabilità, difetto immunitario), possano attraversare la barriera epiteliale e traslocare all'interno della mucosa.

IL MICROBIOTA INTESTINALE

La comunità di microrganismi (batteri, virus e funghi) che colonizza il tratto gastro-intestinale di un individuo viene denominata microbiota. E' un ecosistema complesso e dinamico, costituito da circa 10^{10-12} batteri di 500-1000 specie diverse.

La colonizzazione intestinale di batteri commensali inizia al momento del parto e viene modulata, dall'infanzia fino all'età adulta, dall'alimentazione, dall'uso di farmaci (antibiotici), dallo stile di vita e dall'esposizione ad antigeni ambientali.

La composizione del microbiota intestinale presenta una variabilità interindividuale che sembra essere determinata in parte da fattori genetici, igienici, geografici e nutritivi.

La microflora intestinale racchiude sia specie autoctone, acquisite durante la nascita, sia microrganismi transitori di origine ambientale.

Interazione microbiota-sistema immune mucosale

La relazione tra il microbiota e l'ospite è un rapporto di benefico mutualismo: la microflora intestinale contribuisce in diversi processi fisiologici dell'ospite, mentre l'ospite fornisce il necessario nutrimento per la sopravvivenza dei microrganismi commensali [53].

Il microbiota svolge numerosi funzioni fisiologiche per l'organismo ospite, quali:

1) Funzione protettiva contro gli agenti patogeni:

I microrganismi commensali stimolano la risposta immunitaria contro i patogeni opportunisti e competono con essi, per i siti recettoriali e per i nutrienti.

2) Funzioni nutritive e metaboliche:

I batteri intervengono nell'elaborare proteine, carboidrati e grassi provenienti dalla dieta, degradano i polisaccaridi in acidi grassi a catena corta; regolano la produzione di vitamine (B e K) e stimolano l'assorbimento di sostanze nutritive attraverso la mucosa intestinale e quindi la loro assimilazione.

3) Funzioni immunitarie:

Partecipano allo sviluppo del sistema immunitario associato a mucosa e al mantenimento della tolleranza immunitaria, necessaria per la prevenzione di patologie immuno-mediate. Il microbiota influenza inoltre la risposta immunitaria dell'ospite: alcune componenti della flora batterica infatti inducono una risposta mediata dalle immunoglobuline di tipo A o portano allo sviluppo delle cellule effettrici Th1/Th17 e delle cellule T regolatorie [54].

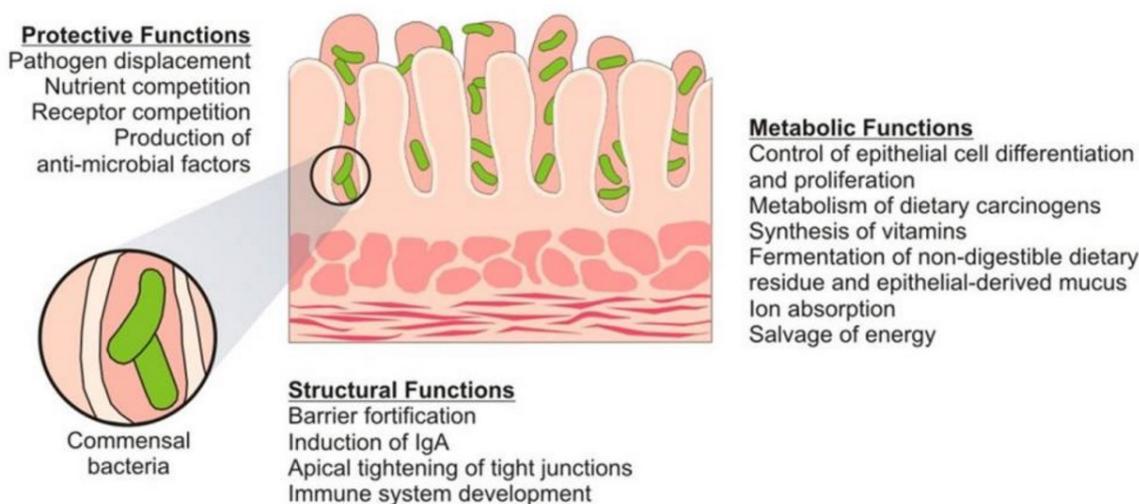


Figura 6. Funzioni del microbiota intestinale [55].

L'omeostasi tra microflora-ospite viene mantenuta da tre diverse barriere immunologiche che assicurano che i batteri residenti non invadano la barriera intestinale o una volta penetrati vengano uccisi prima di raggiungere il circolo sistemico: nella prima linea di difesa troviamo i mediatori immunologici (muco, IgA secretorie e proteine anti-microbiche) che limitano il contatto diretto tra microrganismi e mucosa, minimizzando la probabilità di invasione. La seconda linea di protezione è rappresentata dal rapido riconoscimento e dall'uccisione degli agenti che cercano di invadere la barriera intestinale; il terzo meccanismo di difesa va a limitare l'esposizione dei batteri al circolo sistemico.

Una colonizzazione non corretta o un'alterazione dei meccanismi di difesa sono associate al rischio di sviluppare patologie [53].

I batteri commensali non sono quindi ospiti passivi del tratto gastro-enterico, ma dei partecipanti attivi nell'importante *crosstalk* tra microflora-mucosa intestinale.

Il microbiota e la mucosa intestinale formano la cosiddetta barriera mucosale, importante sistema di difesa nei confronti dei patogeni presenti nel tratto gastroenterico.

La barriera fisica è costituita dai batteri residenti, dalle cellule epiteliali saldamente legate attraverso giunzioni strette e da uno strato di muco; la barriera chimica invece comprende peptidi anti-microbici e le immunoglobuline IgA, secrete dalle cellule immunitarie [54].

Non tutte le specie batteriche sono in grado di indurre una risposta anti-batterica. Questo meccanismo di non responsività è alla base della tolleranza immunitaria: lo stabilirsi infatti di una microflora residente a livello gastro-intestinale contribuisce in modo significativo a tale processo, in modo da creare un equilibrio tra la capacità del nostro sistema immunitario di riconoscere i patogeni ed, allo stesso tempo, di tollerare la presenza e l'attività di batteri endogeni benefici.

I batteri intestinali interagiscono quindi costantemente e fisiologicamente con il sistema immunitario. Questo *crosstalk* è mediato dalla presenza di particolari recettori espressi sulle cellule immunitarie ed epiteliali, i *Pattern Recognition Receptors* (PRRs), che riconoscono un ampio spettro di profili molecolari associati ai patogeni (PAMPs), molto conservati nel corso dell'evoluzione, che attivano una trasduzione del segnale intracellulare che scatena una risposta effettrice.

I recettori PRRs (TLRs e NLRs)

La famiglia dei PRRs comprende recettori trans-membrana, come i *Toll Like Receptors* (TLRs), e alcuni recettori citoplasmatici, come ad esempio i *Nucleotide-Binding Oligomerization Domain* (NOD)-like Receptors (NLRs). Altri recettori si possono trovare sulle membrane degli endosomi, in circolo (nel sangue periferico) oppure in liquidi extracellulari.

La cascata di segnalazione dei PRRs culmina da un lato con l'attivazione di NF- κ B e con la conseguente trascrizione di geni target e la produzione di mediatori pro-infiammatori, dall'altro con lo stimolo diretto al rilascio di citochine infiammatorie in seguito ad attivazione di piattaforme macromolecolari denominate inflammasomi. Questa cascata

di segnalazione promuove, inoltre, la maturazione delle cellule presentanti l'antigene, up-regolando le loro molecole co-stimolatorie [56].

I principali recettori dell'immunità innata, appartenenti alla famiglia dei PRRs, sono i TLRs, che devono il loro nome al recettore *Toll* scoperto per la prima volta nella *Drosophila Melanogaster*. Sono stati identificati 10 diversi tipi nell'uomo, numerati da TLR1 a TLR10, che dimostrando una specificità generica per ampie categorie di patogeni, che si differenziano per relativamente piccole caratteristiche molecolari. Molti dei ligandi sono stati identificati ma altri risultano ancora sconosciuti.

I TLRs sono proteine trans-membrana costituite da una porzione extracellulare con sequenze ripetute ricche di Leucine (LRR-*Leucine Rich Repeat*) e da una intracellulare con un dominio funzionale conservato (TIR-*Toll/Interleukin 1 Receptor*), che svolge il primo passo nella trasduzione del segnale. I TLRs sono ampiamente distribuiti nelle cellule del sistema immunitario (cellule dendritiche, macrofagi, linfociti, granulociti e cellule *natural killer*) ma anche in altri tipi cellulari, quali cellule epiteliali, fibroblasti e cellule endoteliali. Alcuni recettori (TLR1, 2, 4, 5, 6) si trovano sulla membrana plasmatica della cellula e riconoscono quindi profili microbici presenti nell'ambiente esterno; altri (TLR3, 7, 8, 9, 10) si trovano sulle membrane interne della cellula, come le membrane degli endosomi, del reticolo endoplasmatico o altri organelli intracellulari, e riconoscono gli acidi nucleici virali o microbici [57, 58].

Diversi sono i profili molecolari associati ai patogeni riconosciuti da questi recettori:

- i lipopeptidi e altre componenti dei batteri Gram positivi (acido lipoteicoico) vengono riconosciuti dal TLR2 in associazione al TLR1 o TLR6;
- il lipopolisaccaride (LPS) e le *Heat Shock Protein* dal TLR4;
- la flagellina dal TLR5;
- l'RNA a doppia elica (o analoghi sintetici, come il Poly I:C) dal TLR3;
- l'RNA a singolo filamento dal TLR7;
- il DNA e CpG non metilate dal TLR9;

I ligandi dei TLR8 e TLR10 rimangono invece ancora sconosciuti [58, 59].

Il TLR4 è stato il primo recettore ad essere clonato e caratterizzato nei mammiferi. Esso è in grado di legare con grande avidità il lipopolisaccaride (LPS), componente della parete

cellulare dei batteri Gram negativi. Per legarsi al suo specifico recettore, LPS interagisce inizialmente con la proteina sierica *LPS Binding Protein* (LBP), prodotta dal fegato ed in grado di legare il lipide A del LPS, anche quando presente in piccole concentrazioni. Il ruolo dell'LBP è quello di favorire il legame del LPS al complesso recettoriale: il nuovo complesso LPS-LBP ad alta affinità si lega infatti alla proteina CD14 che trasferisce LPS al TLR4 e alla sua proteina associata MD2, essenziale sia per il riconoscimento del ligando sia per la trasduzione del segnale (Fig. 7).

Il CD14 è presente in due forme:

- CD14 di membrana (mCD14), ancorato sulla superficie di cellule mononucleari attraverso una coda di glicosilfosfatidilinositolo;
- CD14 solubile (sCD14), che contribuisce alla trasmissione del segnale favorito da LPS in cellule prive del CD14 di membrana.

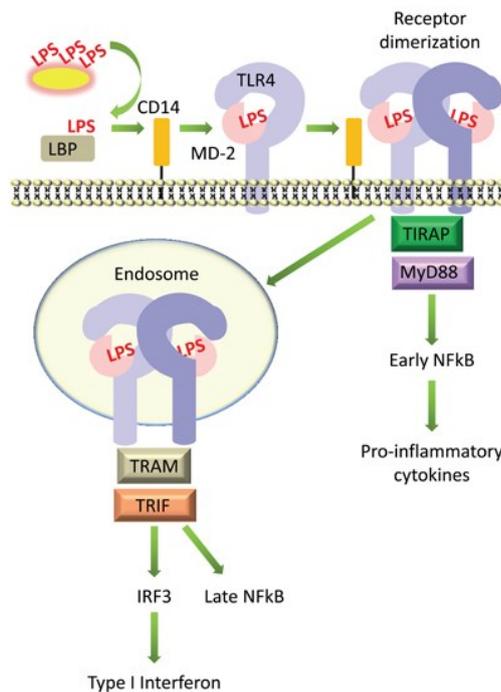


Figura 7. Cascata di segnalazione mediata dal LPS [60].

Il TLR2 è implicato nel riconoscimento di numerosi prodotti microbici derivanti da batteri Gram positivi, come il peptidoglicano, l'acido lipoteico o diverse lipoproteine. Questo recettore sembra implicato anche nel legame di componenti della parete di micobatteri, di lieviti e del LPS atipico prodotto da *Leptospira interrogans* e *Porphyromonas gingivitis*.

Questo vasto spettro di ligandi riconosciuti dal TLR2 è dovuto alla sua associazione (formazione di dimeri) con altri membri della famiglia dei TLRs, come il TLR1 o il TLR6. Non è stata ancora documentata l'azione del TLR2 sotto forma di monomero [59].

Il TLR3 riconosce come ligando l'RNA a doppia elica: per questo motivo questo recettore è in grado di individuare la maggior parte dei virus penetrati all'interno della cellula e innescare l'attivazione di una risposta anti-virale, tramite produzione di interferoni di tipo beta (IFN β).

Il legame ligando-recettore porta alla dimerizzazione (omodimerizzazione o eterodimerizzazione) dei recettori e all'avvio della cascata di trasduzione del segnale che, mediante diverse proteine adattatrici che interagiscono con il dominio TIR, porta all'attivazione di fattori trascrizionali come NF- κ B o IRF (*Interferon regulatory transcription factor*).

Esistono due principali vie di segnalazione, una MyD88 (*Myeloid Differentiation primary response gene 88*) -dipendente e l'altra MyD88-indipendente, che determinano la produzione di sostanze battericide, citochine pro-infiammatorie e di interferoni di tipo I, in grado di coordinare la risposta delle cellule immunitarie (Fig. 8).

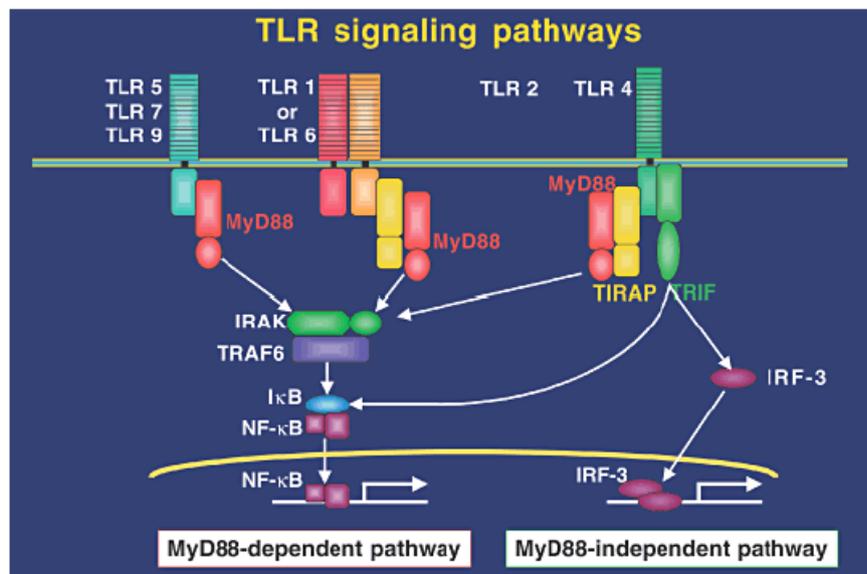


Figura 8. Cascate di segnalazione mediate dai TLRs [61].

La via dipendente da MyD88 (innescata dalla maggior parte dei TLRs) prevede il reclutamento delle proteine adattatrici, TIRAP (*TIR domain containing adapter protein*) e MyD88, che culmina poi, attraverso la cascata delle MAP chinasi, con l'attivazione di NF- κ B e AP-1 (*Activating Protein 1*). Questi fattori inducono la trascrizione di geni codificanti interleuchine (IL1, IL6, IL8, IL12), fattori di necrosi tumorale (TNF α), molecole co-stimolatorie dei linfociti T (CD80 e CD86), molecole di adesione (E-selectina) e altri fattori modulatori dell'infiammazione.

Nella cascata di segnalazione innescata dal TLR3, vengono reclutate altre proteine, TRIF (*TIR domain containing adapter inducing interferon β*) e TRAM (*TRIF-related adapter molecule*), che attivano IRF-3 (*Interferon Regulatory Factor 3*), un fattore di trascrizione che fa aumentare l'espressione degli interferoni di tipo I (IFN α e IFN β): pertanto l'attivazione di questa cascata porta ad un aumento dell'espressione di proteine anti-virali e infiammatorie.

Il TLR4 è l'unico recettore in grado di attivare, a seconda del diverso stimolo, entrambe le cascate di trasduzione: può indurre quindi in base alle diverse necessità, sia una modulazione delle cellule immunitarie e immunocompetenti, sia un blocco della replicazione virale nelle cellule infettate.

Un altro gruppo di recettori appartenenti alla famiglia dei PRRs, sono i NLRs, recettori citosolici, altamente conservati, coinvolti nel riconoscimento dei PAMPs e dei DAMPs. La struttura dei NLRs è costituita da un dominio NBD centrale e da un dominio LRR al carbossi-terminale. In base al diverso dominio presente all'ammino-terminale, si possono distinguere due sottofamiglie: la sottofamiglia NLRC (che comprende NOD1, NOD2, NLRC3 e NLRC4) presenta uno o più domini CARD, mentre la sottofamiglia NLRP (che comprende 14 diverse varianti) presenta un dominio pirinico [62] (Fig. 9).

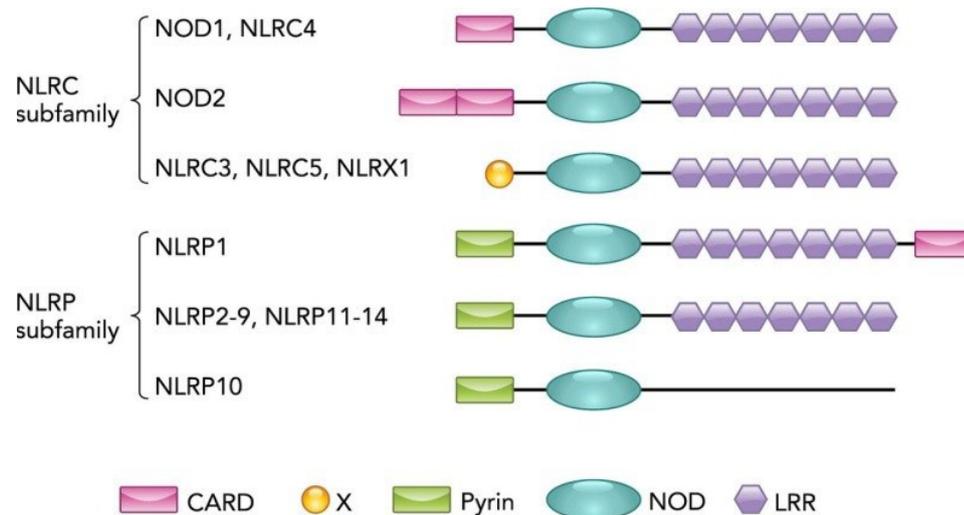


Figura 9. Struttura dei NOD-like receptors (NLRs).

Il riconoscimento di antigeni microbici da parte di questi recettori intracellulari porta all'attivazione di NF- κ B, analogamente a quanto accade nelle *pathways* dei TLRs, e alla cascata di segnalazione delle MAP-chinasi, con la formazione di inflammasomi [62, 63]. Gli inflammasomi sono complessi proteici multi-molecolari che si assemblano nel citoplasma in seguito ad attivazione del sistema immunitario. È noto che molti NLRs sono coinvolti nella fase iniziale del processo di formazione dell'inflammasoma, che si conclude con la produzione e la secrezione di citochine pro-infiammatorie, come IL1 β e IL18.

La proteina NOD2, come tutti gli altri NLRs, è un recettore intracellulare in grado di riconoscere componenti batteriche (il MDP) e segnali di pericolo extracellulari, di regolare la risposta infiammatoria e controllare la maturazione dei fagociti [64].

Recenti scoperte nell'immunologia mucosale hanno definito critico il ruolo dei recettori TLRs e NLRs nel tratto gastrointestinale. Grazie a queste molecole, si instaura un corretto equilibrio tra ospite e microbiota, utile a mantenere l'omeostasi intestinale. Uno squilibrio di questo ecosistema (a discapito della microflora o della mucosa ospite) può portare a condizioni patologiche (Fig. 10).

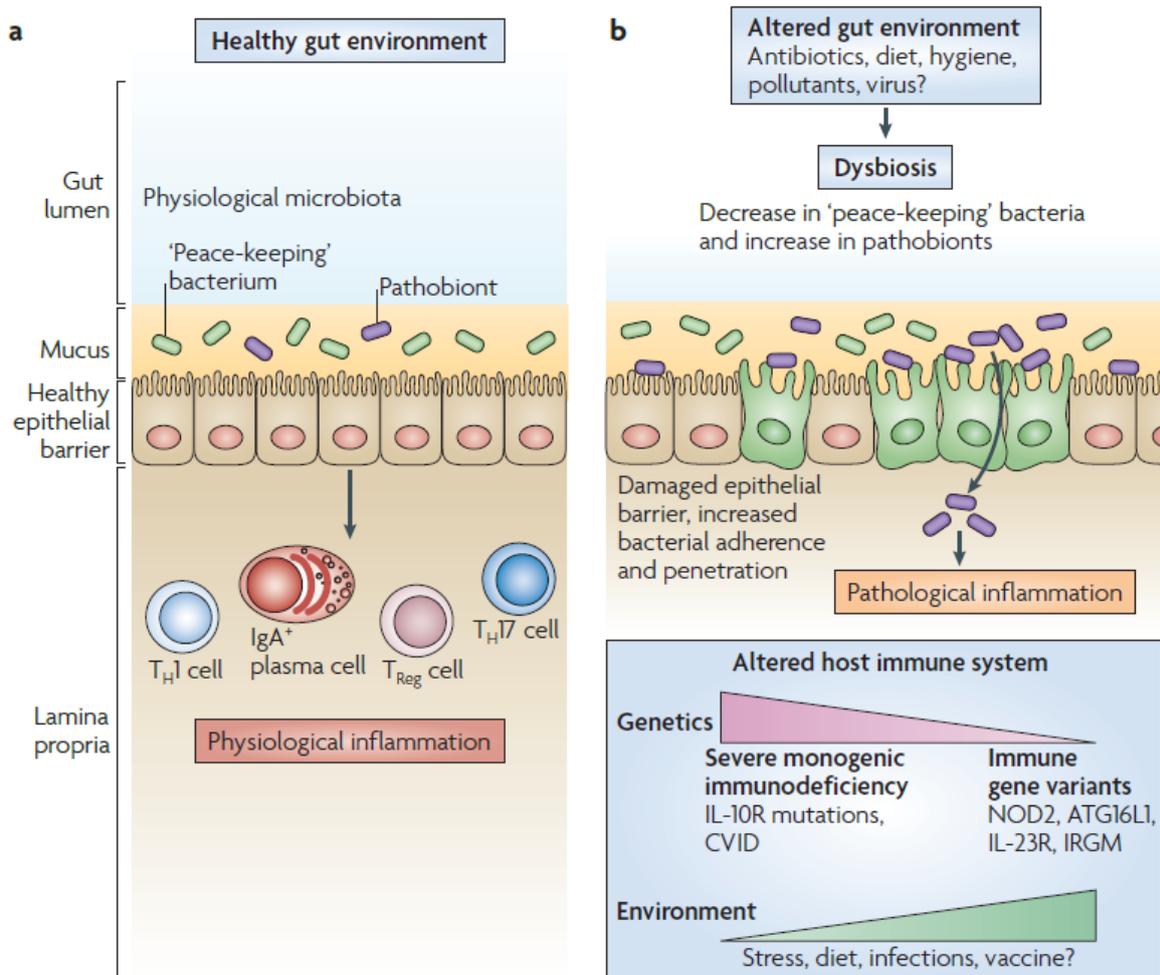


Figura 10. Il sistema immunitario mucosale in condizioni fisiologiche (a) e patologiche (b) [65].

Alterazione del microbiota nella MC

Il microbiota intestinale è un ecosistema complesso caratterizzato da una dinamica e reciproca interazione con l'ospite. La composizione del microbiota e l'equilibrio microbiota-mucosa intestinale sono di fondamentale importanza per il mantenimento dell'omeostasi e per la condizione di salute. Uno sbilanciamento di questo ecosistema (o a discapito della microflora o a discapito della mucosa ospite) può portare infatti a condizioni patologiche, come allo sviluppo della MC.

Nella MC, il microbiota può subire diverse alterazioni di tipo qualitativo e quantitativo, che possono rendere l'organismo più vulnerabile a batteri opportunisti; infatti, quando il normale equilibrio della microflora batterica intestinale (eubiosi) subisce un'alterazione (disbiosi), l'intestino riduce la sua funzione di protezione, con una conseguente maggiore facilità all'insorgenza di malattie e disturbi di varia natura.

Diversi sono i fattori che possono influenzare la composizione e la distribuzione dell'ecosistema intestinale, come il cambiamento della dieta o altri fattori ambientali, la comparsa di malattie, eventuali trattamenti antibiotici e modificazioni del sistema immunitario mucosale [66].

In condizioni di disbiosi, c'è uno spostamento innaturale nella composizione della flora batterica che determina sia una riduzione del numero di simbionti e commensali sia un aumento del numero di patogeni. Ciò può determinare l'induzione di uno stato infiammatorio in individui geneticamente predisposti [67].

E' stato osservato infatti che nel tratto gastrointestinale dei pazienti affetti da MC c'è uno squilibrio nella flora autoctona con un'alterazione della composizione quantitativa (circa dieci volte inferiore rispetto ai controlli) e/o qualitativa (diversità nelle specie batteriche) del microbiota [54]. Inoltre i pazienti con MC sono caratterizzati da una diminuita biodiversità e una riduzione dei *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, i due maggiori Phyla presenti nell'intestino umano sano [68], dei microrganismi potenzialmente protettivi e di normali batteri anaerobici come i *Eubacterium* e i *Lactobacillus* [69].

Variazioni nella composizione microbica portano inoltre a cambiamenti nei metaboliti, come il butirrato, generato a livello intestinale dall'attività batterica. Il butirrato, oltre ad essere la risorsa fondamentale energetica per le cellule epiteliali, può inibire anche la cascata di trasduzione del segnale delle citochine pro-infiammatorie [70].

Vista la complessità del microbiota umano sono state sviluppate diverse tecniche per poterlo caratterizzare come ad esempio il sequenziamento della subunità 16S dell'RNA ribosomiale (rRNA, conservato tra i batteri di uno stesso gruppo filogenetico) e l'approccio meta-genomico, che si basa sul sequenziamento dell'intero genoma batterico. Il sequenziamento delle regioni dell'rRNA 16S ha dimostrato che il profilo genetico della flora batterica associata a malattia è diverso rispetto a quello che si osserva nei soggetti sani [64]. Una diversità è stata riscontrata anche nella composizione microbica fecale, che rispecchia la presenza o l'assenza di infiammazione nei tratti enterici [67].

E' stato osservato che i pazienti con MICI, nonostante abbiamo una minor biodiversità, presentano un aumentato numero di batteri associati alla barriera epiteliale, suggerendo il fallimento del meccanismo di difesa che normalmente limita il contatto diretto tra microflora e l'epitelio [71].

Un'alterazione della microflora è stata riscontrata anche nei topi *NOD2 knockout*, che presentano un'aumentata carica batterica a livello dell'ileo terminale ed una diminuita abilità a prevenire la colonizzazione intestinale di batteri opportunisti [64]. Questo potrebbe essere dovuto ad una disregolazione nella produzione di peptidi antimicrobici, come la α -defensina da parte delle cellule di Paneth, portando ad un maggior probabilità di invasione batterica attraverso la mucosa e ad una risposta infiammatoria. Anche se i livelli di questo peptide a livello dell'ileo di pazienti affetti di MC con mutazioni in *NOD2* non sembrano significativamente diminuiti, un difetto di *killing* batterico è stato osservato nelle cripte intestinali [28]. Il bilanciamento tra flora batterica commensale e il sistema immune viene alterato in caso di mutazione del gene *NOD2*. Tutti gli studi riportati mostrano quindi un ruolo critico della *pathway* di questa proteina nella regolazione dell'omeostasi tra flora batterica e immunità innata.

OBIETTIVI

OBIETTIVI

Nonostante siano stati effettuati numerosi studi, la patogenesi della MC non è ancora chiara e non si dispone di trattamenti in grado di guarire stabilmente la malattia.

Risultati genetici e laboratoristici, sostenuti da dati clinici, portano a pensare che alla base della patogenesi della MC sia presente un *deficit* dell'immunità innata mucosale, che viene successivamente compensato da un'importante risposta infiammatoria adattativa che alimenta in un circolo vizioso lo stato infiammatorio.

Lo sviluppo di modelli adeguati a studiare la complessità di questa malattia risulta difficile per la molteplicità di fattori coinvolti, genetici e ambientali.

Partendo da questi presupposti, l'obiettivo generale di questa tesi di dottorato è stato quello di sviluppare dei modelli che tenessero conto di questa complessità di interazioni, valutando la risposta immunitaria *ex vivo* nel sangue o nell'intestino in presenza del microbiota associato alla malattia.

In particolare, abbiamo voluto mettere a punto dei modelli *ex vivo* ed *in vitro* utili ad evidenziare dei profili di risposta a componenti batteriche, che potessero essere caratteristici della MC.

Nello specifico, abbiamo voluto:

- analizzare l'eventuale presenza a livello periferico nei pazienti affetti da MC di difetti di risposta a componenti batteriche purificate, valutando la funzionalità delle *pathway* immunitarie in cellule mononucleate, attivate in seguito alla stimolazione dei recettori dell'immunità innata;
- sviluppare un modello *ex vivo* che prevede lo studio di biopsie intestinali derivate da pazienti affetti da MC, da RCU e da controlli, dove è possibile studiare contemporaneamente l'influenza data dal *background* genetico e dalla microflora intestinale;
- studiare la risposta epiteliale, mettendo a punto un modello *in vitro* di epitelio intestinale umano su cui testare componenti batteriche purificate.

MATERIALI E METODI

MATERIALI E METODI

Obiettivo 1: analisi delle *pathway* immunitarie innate in monociti periferici

Reclutamento dei pazienti

Sono stati arruolati 69 soggetti dall'Unità di Gastroenterologia e di Nutrizione Clinica e 50 donatori sani (CTRL, controllo negativo) dal Servizio Immunotrasfusionale dell'Istituto materno infantile IRCCS Burlo Garofolo di Trieste. I pazienti con MICI (38 pazienti con MC e 31 con RCU) sono stati classificati secondo l'attività di malattia, seguendo gli *score* clinici pediatrici (indici PCDAI e PUCAI) che si basano su una valutazione clinica generale del paziente.

Da ciascun soggetto, in seguito all'espressione del consenso informato, è stato ottenuto un campione di sangue eparinizzato da cui separare il plasma e i monociti per l'analisi dell'espressione del TNF α intracellulare e un campione di sangue anti-coagulato con EDTA per l'estrazione del DNA.

Espressione intracellulare di TNF α

Questo protocollo citofluorimetrico ci permette di quantificare l'espressione di TNF α in monociti stimolati con molecole sintetiche microbiche, per investigare la funzionalità e l'integrità delle diverse vie di segnalazione dell'immunità innata. Questa procedura è stata adattata da un protocollo clinico già in uso per lo *screening* di alcune immunodeficienze primitive [72].

Brevemente, le cellule mononucleate periferiche (PBMCs) sono state isolate da sangue intero eparinizzato, mediante centrifugazione su soluzione polimerica di Ficoll (Lympholite, Cederlane, Burlington, NC, USA) alla velocità di 500xg per 30 minuti a temperatura ambiente (RT).

2×10^5 PBMCs sono stati risospesi in 200 μ L di terreno di coltura (RPMI, EuroClone, Milano, Italy) supplementato con il 10% di siero umano di gruppo AB (Sigma-Aldrich, Milano, Italy), 2mM di L-glutamina (EuroClone), 100 U/mL di penicillina (EuroClone) e 0,1 mg/mL di streptomina (EuroClone). Le cellule sono state stimulate con i diversi

ligandi dei TLRs e di NOD2: 100 ng/ml di Lipopolisaccaride (LPS; ligando del TLR4, Sigma Aldrich, Germany), 10 µg/ml di Polinosinic-polycytidylic acid sodium salt (PolyI:C; ligando del TLR3, Sigma Aldrich), 500 ng/ml di Muramil DiPeptide (MDP-L18; ligando di NOD2, InvivoGen, San Diego, CA, USA) o 500 ng/ml di Pam₃CSK₄ (ligando di TLR2/1, InvivoGen) per un periodo iniziale di 30 minuti in incubatore a 37 °C. Successivamente, sono stati aggiunti 10 µg/mL di Brefeldina A (BFA, Sigma Aldrich) per inibire la secrezione citochinica e per permettere di rilevare il TNFα all'interno della cellula.

Le cellule sono state mantenute per ulteriori 3 ore e mezza in incubatore, per un totale di 4 ore di trattamento con gli stimoli. La BFA, senza l'aggiunta di altri stimoli, è stata aggiunta nel tubo "Non Stimolato", come condizione basale. Dopo l'incubazione di 4 ore, per la marcatura superficiale è stato aggiunto l'anticorpo anti-*human* CD14, coniugato con la fluorescina isotiocianato (FITC) (eBiosciences, San Diego, CA, USA) per marcare i monociti. Si procede poi con la fissazione e permeabilizzazione delle cellule utilizzando, rispettivamente, il FACS Lysing Solution (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) e il FACS Permeabilizing Solution 2 (BD Biosciences). Le cellule, dopo essere state lavate (Soluzione di lavaggio: PBS + 1% BSA + 0,1% NaN₃) sono state incubate con il secondo anticorpo per la colorazione intracellulare, anti-*human* TNFα, coniugato con la Ficoeritrina (PE) (BD Biosciences). La marcatura con un anticorpo isotipo di controllo è stata utilizzata per misurare il sottofondo di fluorescenza dovuto al legame aspecifico degli anticorpi all'interno della cellula (PE IgG Isotype control, BD Biosciences). Infine, dopo un ulteriore lavaggio, le cellule sono state fissate (Soluzione di fissazione: PBS + 1% paraformaldeide) per procedere con la lettura citofluorimetrica.

I campioni sono state acquisiti con il citometro CyAn ADP (Beckman Coulter, Fort Collins, CO, USA) e i dati sono stati analizzati usando il software FlowJo v 7.6 (TreeStar, Ashland, OR, USA). I grafici riportano la percentuale di monociti (cellule CD14+) esprimenti il TNFα.

Analisi delle varianti di NOD2

I pazienti con CD sono stati analizzati usando il *targeted gene sequencing* per identificare le tre principali varianti di *NOD2* associate con la MC: c.2104C>T;p.R702W (rs2066844), c.2722G>C;p.G908R (rs2066845) and c.3016_3017insC; p.L1007Pfs*2 (rs2066847).

I campioni di DNA sono stati raccolti da 36 pazienti con MC: il DNA genomico è stato estratto da sangue anticoagulato (EDTA) usando il kit EZ1 DNA Blood Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA), seguendo le istruzioni fornite dal produttore.

Per analizzare le tre varianti del gene *NOD2* (NM_022162), è stata eseguita un'amplificazione tramite PCR utilizzando la KAPA 2G Fast Hot Start Readymix (RESNOVA, Roma, Italia). I prodotti purificati di PCR sono stati direttamente sequenziati con il sequenziatore ABI PRISM 3130XL automated DNA Sequencer (Applied Biosystems, USA). Le sequenze ottenute sono state analizzate con il software Codon Code Aligner v 6.0.2.

I primer, disegnati usando Primer Blast e specifici per ogni variante di *NOD2*, sono riportati di seguito:

R702W_For 5'-CTTCAACCTTCTGCAGGGC-3'

R702W_Rev 5'-GGTGGCAGAGGCGAAGCT-3'

R702W_sequencing_For 5'-TGCTGATGTGCCACCAG-3'

G908R_For 5'-CTGCCCCTCTGGCTGGGACT-3'

G908R_Rev 5'-CCCAGCTCCTCCCTCTTC-3'

L1007Pfs*2_For 5'-GTAGACTGGCTAACTCCTGC-3'

L1007Pfs*2_Rev 5'-AGGAGGGCGGGAGCTGACTT-3'

Quantificazione di CD14 solubile (CD14s) e LPS Binding Protein (LBP)

I campioni di plasma sono stati ottenuti da pazienti con MC (n=27), RCU (n=22) e da individui sani (n=36). Il plasma è stato ottenuto mediante centrifugazione del sangue eparinato a 1300xg per 10 minuti e conservato a -80°C per la quantificazione del CD14 solubile e del LPS Binding Protein (LBP).

I dosaggi sono stati effettuati usando LPS-binding Protein (Human) ELISA kit (Abnova, Taipei City, Taiwan) e human CD14 ELISA kit (RayBio, Norcross GA, USA), seguendo le istruzioni fornite dai produttori.

L'assorbanza è stata misurata a 450nm, utilizzando il lettore piastre GloMax®-Multi+ Microplate Multimode Reader (Promega Corporation, Madison, USA).

La concentrazione di ogni campione è stata estrapolata dalla curva standard, ottenuta inserendo i valori dell'assorbanza con le concentrazioni note degli standard.

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata con il software GraphPad Prism versione 5 (GraphPad, SanDiego, CA). I dati dell'espressione intracellulare del TNF α monocitario sono stati riportati come media \pm errore standard della media (SEM), mentre le concentrazioni plasmatiche del CD14 solubile e del LBP sono state rappresentate come mediana e intervallo interquartile (Tukey's box plot). La significatività statistica è stata calcolata utilizzando l'analisi della varianza (One-way ANOVA) e il test non parametrico Kruskal-Wallis, ed è stata indicata con $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***)

Obiettivo 2: coltura *ex vivo* di biopsie coliche e analisi citochinica

Reclutamento dei pazienti

Per questo studio 48 pazienti con MICI e 8 controlli pediatrici sono stati arruolati dall'Unità di Gastroenterologia e di Nutrizione Clinica dell'Istituto materno infantile IRCCS Burlo Garofolo di Trieste. Per tutti i pazienti è stato ottenuto un consenso informato, secondo il protocollo approvato dal Comitato Etico dell'Istituto (n.185/08, 19/08/2008).

Tutti i soggetti sono stati sottoposti a colonscopia per motivi clinici, sia per definire la diagnosi sia per determinare il *follow-up*.

I pazienti con MICI sono stati divisi in 4 gruppi, a seconda del tipo di patologia e dell'attività di malattia: malattia di Crohn in attività (MC, n=23), malattia di Crohn in remissione (MCr, n=3), colite ulcerativa in attività (RCU, n=15) e colite ulcerativa in remissione (RCUr, n=7).

Per ogni paziente sono stati calcolati gli *score* di attività di malattia: PCDAI (*Pediatric Crohn's Disease Activity Index*) per i pazienti affetti da MC e PUCAI (*Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index*) per quelli affetti da RCU.

Nessun'altra condizione patologica o infiammatoria è stata riscontrata in questi pazienti. Il gruppo dei controlli (CTRL) è stato selezionato tra i soggetti che si sono sottoposti a indagine endoscopica per motivi clinici non correlati con enteropatie infiammatorie, come poliposi giovanile, gastriti autoimmuni, perdita di peso e sintomi addominali idiopatici. Dalla valutazione coloscopica, non è emerso nella mucosa intestinale di questi pazienti alcun processo infiammatorio.

Coltura *ex vivo* di biopsie coliche

Da ogni soggetto durante la colonscopia sono state prelevate due biopsie coliche dalla stessa regione intestinale.

Nei pazienti in fase attiva le biopsie sono state recuperate da aree infiammate, mentre nei pazienti in fase di remissione o nei controlli da regioni di mucosa indenne.

Immediatamente dopo il prelievo, le biopsie vengono tagliate a metà, perpendicolarmente all'orientamento degli strati intestinali; i quattro frammenti risultanti vengono inseriti in un tubo sterile contenente soluzione fisiologica.

In laboratorio, i frammenti bioptici vengono trasferiti in un contenitore con terreno di crescita (X-VIVO, Lonza, Verviers, Belgium), supplementato con 10% di siero umano di gruppo AB (Sigma-Aldrich, Milano, Italy) e 2mM di L-glutamina (EuroClone, Milano, Italy).

I frammenti intestinali sono stati esposti a 250ng/ml di Muramil DiPeptide (MDP, N-Acetylmuramil-L-alanil-D-isoglutamina, Sigma-Aldrich) o solo terreno, in presenza o assenza di una miscela di antibiotici [(100 U/mL di penicillina (EuroClone) e 0,1 mg/mL di streptomina (EuroClone)].

Dopo 24h di coltura a 37°C in incubatore (95% O₂ e 5% CO₂), sono stati raccolti i surnatanti e congelati a -20°C per l'analisi citochinica.

Quantificazione citochinica

Le citochine e le chemochine rilasciate nel terreno di coltura sono state quantificate usando il kit Bio-Plex Pro® Human Cytokine 17-plex Assay (BioRad, Hemel Hempstead, UK), seguendo le istruzioni del produttore.

Gli analiti studiati da questo pannello sono: IL1 β , IL2, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL10, IL12(p70), IL13, IL17, G-CSF, GM-CSF, IFN γ , MCP1 (MCAF), MIP1 β , e TNF α .

I campioni sono stati analizzati con il lettore Bio-Plex® 200, usando il software Bio-Plex Manager®: i risultati vengono espressi come intensità media di fluorescenza o concentrazione (pg/ml).

Analisi statistica

Tutte le analisi sono state condotte con i software Stata/IC 14.1 (StataCorp LP, College Station, USA) e GraphPad Prism versione 5 (GraphPad, San Diego, USA). I valori assunti dalle citochine sono stati presentati come mediane ed intervalli interquartili, e rappresentati con *box plot* usando i baffi secondo Tukey. La significatività statistica è stata posta a $p < 0.05$, ed indicata con $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (**).

Le associazioni tra valori espressi dalle citochine e condizioni specifiche (controlli sani vs. MICI, e MC vs. RCU) sono state analizzate in primo luogo utilizzando una regressione

logistica univariata e successivamente con una regressione logistica multivariata. Per quanto riguarda i confronti multipli condotti con le regressioni logistiche univariate, considerata la dimensione relativamente piccola del campione, che ha portato a valori di p relativamente grandi, abbiamo deciso di non applicare alcuna correzione al valore di p considerato per la significatività statistica: siamo consci del fatto di aver condotto regressioni logistiche univariate indipendenti su diversi *outcome* e per 17 diverse citochine, chemochine e fattori di crescita. Tuttavia, questo passaggio è stato considerato solo come una fase preliminare dell'analisi finalizzata alla selezione delle citochine da includere nell'analisi multivariata: le variabili significativamente associate ($p < 0.05$ nell'analisi univariata) sono infatti state incluse nell'analisi multivariata. L'analisi di regressione logistica multivariata è stata utilizzata per determinare i profili citochinici associati a diverse forme di MICI. Curve ROC (*Receiver operating characteristic*) sono state costruite per valutare la performance dei modelli multivariati. Sono quindi state calcolate l'area sotto la curva ROC, la sensibilità e la specificità. Per ciascun modello, abbiamo identificato i *cut-off* ottimali per l'ottimizzazione congiunta di sensibilità e specificità.

Obiettivo 3: analisi della risposta epiteliale a componenti batteriche purificate

Linea cellulare e reagenti

E' stata utilizzata una linea cellulare epiteliale umana di origine intestinale, Caco2, derivate dall' intestino crasso (colon-retto adenocarcinoma).

Le Caco2, acquistate da ATCC, sono state coltivate in terreno di coltura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM High Glucose, EuroClone) supplementato con il 10% di siero fetale bovino (FBS, EuroClone), 1% di amminoacidi non essenziali (MEM Non-essential amino acid Solution, Sigma), 2mM di L-glutamina (EuroClone) e antibiotici [(100 U/mL di penicillina (EuroClone) e 0,1 mg/mL di streptomina (EuroClone)].

Le Caco2, differenziandosi in coltura in enterociti, formano dei monolayer compatti e vengono utilizzate per ricreare *in vitro* l'epitelio intestinale umano [1,2].

Una volta raggiunta la confluenza, queste cellule vengono staccate con trattamento enzimatico [Trypsina 0.25% + EDTA 0.5mM (EuroClone)] e riseminate nel terreno di coltura o utilizzate per gli esperimenti.

Per la stimolazione delle linee cellulari, sono stati utilizzati i seguenti composti:

10 µg/ml di Lipopolisaccaride (LPS; ligando del TLR4, Sigma Aldrich);

50 µg/ml di Polinosinic-polycytidylic acid sodium salt (PolyI:C; ligando del TLR3, Sigma Aldrich);

10 µg/ml di Muramil DiPeptide (MDP; ligando di NOD2, Sigma);

2, 10 o 50 µg/ml di Pam₃Cys.

Analisi di impedenza con il sistema xCELLigence

La cinetica di crescita e la vitalità cellulare sono state studiate con lo strumento xCELLigence RTCA DP (Roche, Penzberg, Germania). Il sistema xCELLigence analizza l'impedenza elettrica data dalle cellule in adesione sul fondo del pozzetto, ricoperto da microelettrodi d'oro.

Questo strumento automatizzato registra in *real time* la crescita, la morfologia e la vitalità delle cellule adese; tutti questi fenomeni biologici vengono rappresentati come

alterazione dell'impedenza, che viene registrata come parametro adimensionale, chiamato "Cell Index" (CI).

Una diminuzione del CI, in seguito all'aggiunta di un composto, potrebbe essere dovuta ad un distacco cellulare, ad una contrazione cellulare o ad un'aumentata permeabilità inter-cellulare.

Dopo un test preliminare per la scelta della densità ottimale di semina, 15×10^3 Caco2 sono state seminate in una piastra E-Plate da 16 pozzetti in 200 μ l di terreno completo e coltivate in incubatore a 37°C con 5% di CO₂. L'impedenza elettrica è stata analizzata, impostando 800 letture a distanza di 15 minuti l'una dall'altra.

Le cellule sono state fatte crescere fino al raggiungimento della confluenza (fase di *plateau*) e successivamente stimolate con i diversi composti microbici purificati.

Per tutti gli esperimenti, vengono utilizzati come controllo alcuni pozzetti in cui non è stato inserito alcun stimolo, ma in cui sono presenti le sole cellule in terreno di coltura completo (*Untreated*). Sono stati effettuati 3 esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato.

Test di vitalità

Per analizzare la vitalità delle cellule stimolate, è stato eseguito un saggio colorimetrico, utilizzando il reagente MTT (Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide). Questo composto di colorazione giallastra viene convertito dall'enzima mitocondriale (succinato deidrogenasi) in cellule metabolicamente attive ad una sostanza di colore blu/violaceo, il formazano.

Nello specifico, 15×10^3 Caco2 sono state seminate in una piastra da 96 pozzetti, in presenza di terreno completo. Una volta raggiunta la confluenza, le cellule sono state stimolate con i diversi composti purificati e contemporaneamente è stato aggiunto l'MTT alla concentrazione di 5 mg/ml. La piastra è stata posta in incubatore a 37°C per 4 ore per permettere lo sviluppo della colorazione, dovuta alla riduzione del composto MTT. Scaduta l'incubazione, il terreno di coltura è stato rimosso cautamente e i cristalli violacei sono stati risospesi e solubilizzati in 100 μ l di dimetilsolfossido (DMSO).

La reazione colorimetrica viene misurata tramite spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 570nm e l'assorbanza risultante è direttamente proporzionale al numero di cellule vive.

Nei grafici, l'assorbanza è stata normalizzata rispetto ai valori del controllo ed espressa in percentuale.

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata con il software GraphPad Prism versione 5 (GraphPad, SanDiego, CA). Gli istogrammi riportano i valori delle medie \pm deviazione standard. La significatività statistica è stata calcolata utilizzando l'analisi della varianza (One-way ANOVA) e il test non parametrico Kruskal-Wallis, ed è stata indicata con $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***)).

RISULTATI

RISULTATI

Studio 1: analisi delle *pathway* immunitarie innate in monociti periferici

Le caratteristiche cliniche di tutti i pazienti inclusi nello studio sono schematizzate nella Tabella 1 e rappresentate dettagliatamente nell' Appendice 1.

Tabella 1: Pazienti MICI inclusi nello studio

Pazienti (n = 69)	Età (anni) (media±DS)	Maschi/Femmine	Attivi/Remissivi
MC (n = 38)	13±4,47	25/13	18/20
RCU (n = 31)	13±5,13	15/16	19/12

MC: Malattia di Crohn's; RCU: Rettocolite ulcerosa

Espressione del TNF α intracellulare

Per studiare la funzionalità e l'integrità delle *pathway* dell'immunità innata, è stata quantificata l'espressione intracellulare di TNF α in monociti periferici. Secondo questo test, i linfo-monociti, isolati dal sangue periferico eparinato, sono stati stimolati con diversi componenti microbiche purificate, in grado di innescare le cascate di segnalazione dei TLRs e di NOD2: LPS (ligando del TLR4), Pam₃CSK₄ (ligando del TLR2/1), Poly I: C (ligando del TLR3) e MDP-L18 (ligando di NOD2). L'espressione del TNF α è stata analizzata tramite citofluorimetro, sulla popolazione monocitaria, positiva al *marker* specifico, CD14 (Fig. 11).

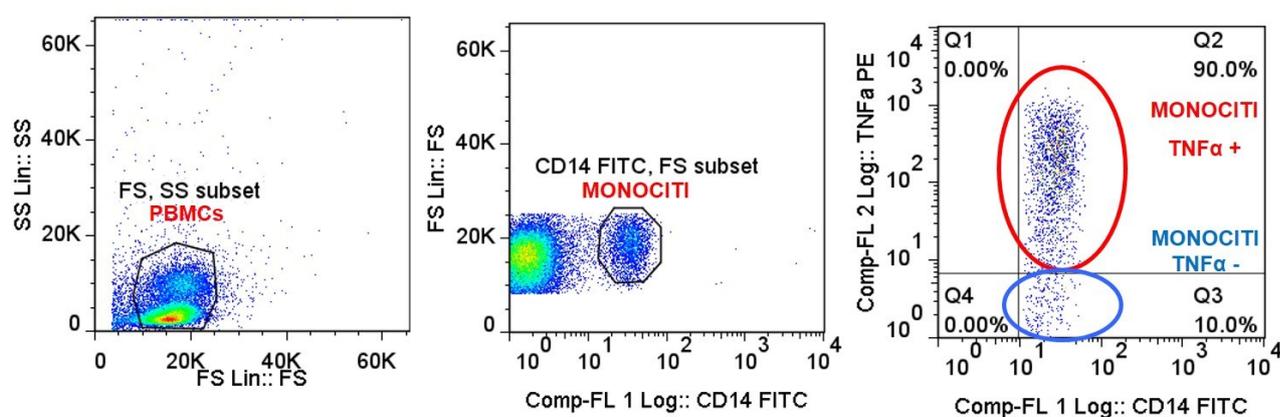


Figura 11. Strategia di gating, per la valutazione del TNF α nei monociti periferici, positivi al marker CD14.

Contrariamente a quanto ci si aspettava, i pazienti con MC presentano un'aumentata espressione basale di TNF α , se comparata a quella dei donatori sani (media CTRL 4.3 ± 0.4 ; media MC 14.5 ± 2.5 , $P < 0.01$; media RCU 10.7 ± 1.9 , $P < 0.05$) (Fig. 12A). Una maggiore espressione della citochina è riscontrabile anche nei soggetti affetti da RCU.

Dopo la stimolazione con Pam₃CSK₄, si osserva una maggior percentuale di attivazione monocitaria nei pazienti con MC rispetto ai controlli (MC vs CTRL: 68.4 ± 2.7 vs 55.6 ± 2.1 , $P < 0.01$) (Fig. 12B); l'aggiunta di MDP induce invece un'aumentata produzione di TNF α nei soggetti con MC, che risulta significativamente maggiore rispetto a quella osservata sia nei pazienti con RCU sia nei controlli sani (media MC 44.2 ± 3.0 ; media RCU 30.2 ± 3.0 , $P < 0.01$; media CTRL 24.9 ± 1.4 , $P < 0.001$) (Fig. 12C).

La stimolazione con LPS e il PolyI:C non ha portato a differenze significative tra i gruppi presi in analisi (Fig. 12D e 12E).

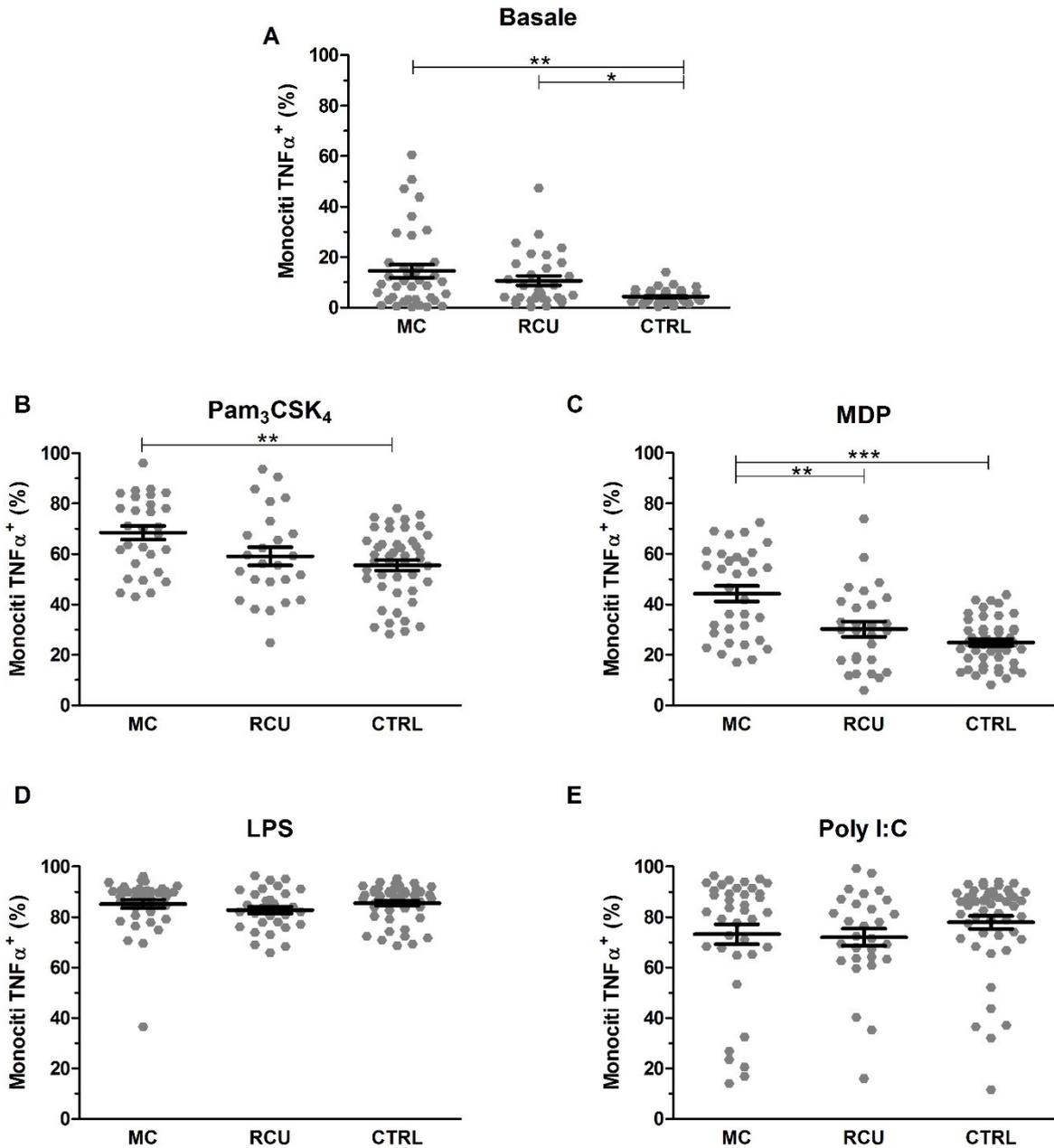


Figura 12. Espressione (in percentuale) del TNF α in monociti periferici, ottenuti da pazienti affetti da malattia di Crohn's (MC), da rettocolite ulcerosa (RCU) o da donatori sani (CTRL). L'espressione del TNF α , rappresentata come media \pm SEM, è stata valutata in condizioni basali, o in seguito a stimolazione con Pam₃CSK₄ (ligando TLR2/1), MDP-L18 (ligando NOD2), LPS (ligando TLR4) o PolyI:C (ligando TLR3). Significatività: *= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$.

Dai risultati ottenuti, sembra che nei pazienti con MC non ci sia un difetto delle *pathway* immunitarie innate, ma anzi una tendenza all'eccesso di risposta.

Abbiamo voluto quindi indagare se l'espressione di TNF α dipendesse dal diverso genotipo di NOD2, da una stimolazione dei monociti periferici da parte di componenti

batteriche immesse in circolo in seguito alla traslocazione intestinale, o dalla diversa attività di malattia nei pazienti analizzati.

Analisi genotipica di *NOD2*

L'indagine genetica è stata condotta su 36 pazienti affetti da MC, per misurare la presenza delle tre varianti più comuni associate a malattia (R702W, G908R e L1007Pfs*2).

L'analisi di sequenziamento ha rivelato che 13 pazienti sono portatori, in omozigosi o eterozigosi, di uno o più polimorfismi (Tabella 2 e Appendice 1). Gli altri 23 pazienti sono risultati essere *wild type* (WT) per le tre varianti studiate.

Tabella 2: Analisi dei genotipi di *NOD2* nei pazienti con MC

Pazienti	Genotipi di <i>NOD2</i>		
	Es. 4 C>T R702W	Es. 8 G>C G908R	Es. 11 InsC L1007Pfs*2
03	C/C	G/G	InsC/-
04	T/T	G/G	-/-
07	C/T	G/G	InsC/-
14	C/C	G/C	-/-
18	C/C	G/C	InsC/-
24	C/T	G/G	-/-
25	C/C	G/C	-/-
44	C/C	G/G	InsC/-
45	C/C	G/G	InsC/-
47	C/C	G/C	InsC/-
53	C/C	G/G	InsC/-
54	C/C	G/C	-/-
63	C/C	G/G	InsC/-

MC: Malattia di Crohn's

Le varianti sono evidenziate in grassetto.

Suddividendo i soggetti in base al genotipo di *NOD2* e incrociando i dati genetici con l'espressione di TNF α monocitaria, non si sono osservate differenze significative tra i pazienti WT e quelli mutati (media MC WT: 14.87 ± 3.1 vs media MC Mut 13.82 ± 4.5) (Fig. 13A). Anche analizzando i singoli polimorfismi, si osserva che i pazienti con le diverse varianti in *NOD2* presentano un'espressione basale di TNF α comparabile a quella osservata nei pazienti WT (Fig. 13B). Non c'è quindi una correlazione diretta tra il genotipo di *NOD2* e lo stato iper-attivato riscontrato nei monociti.

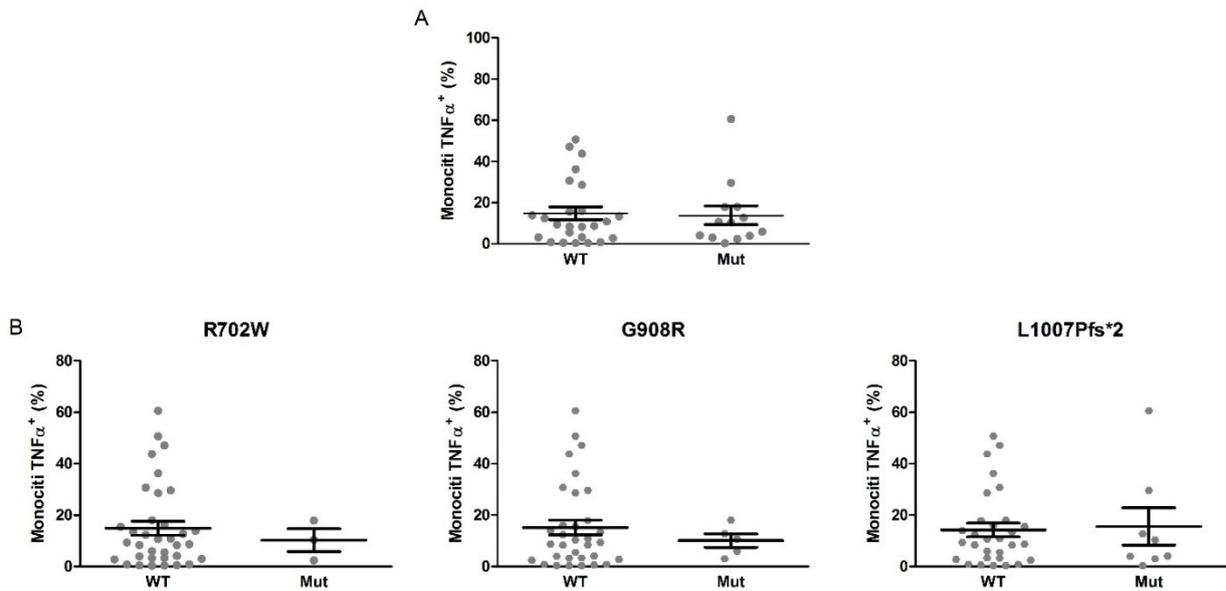


Figura 13. Espressione di TNF α nei pazienti wild type (WT) o mutati (Mut) per tutte e tre le varianti (A), o per le singole varianti (B). Nessuna significatività statistica riscontrata.

Dosaggio di LPS Binding Protein (LBP) e CD14 solubile

Abbiamo voluto dosare due proteine plasmatiche, LPS Binding Protein (LBP) e il CD14 solubile (CD14s), che possono essere considerati degli indicatori della presenza in circolo di componenti batteriche, dato che sono fondamentali per far avvenire correttamente il legame LPS-TLR4. Sono stati quantificati i livelli plasmatici di queste due proteine, per verificare se lo stato infiammatorio dei pazienti con MC potesse essere dovuto all'esposizione di componenti microbiche ai monociti circolanti.

I livelli del LBP sono significativamente più elevati nei pazienti con MC rispetto ai controlli sani [(mediana MC 19.11 (16.35-21.89), CTRL 15.01 (11.85-18.84), $P < 0.05$)] (Fig. 14A). Questa differenza si osserva anche quando i pazienti vengono suddivisi in base allo stato di malattia [(mediana MC attivi: 20.44 (16.81-26.31) vs CTRL: 15.01 (11.85-18.84); $P < 0.05$)] (Fig. 14B); inoltre è stata riscontrata una differenza significativa comparando i soggetti attivi con quelli remissivi, affetti da RCU [(mediana RCU attivi: 20.74 (14.55-21.57) vs RCU remissivi: 12.35 (8.35-13.5); $P < 0.05$)] (Fig. 14B).

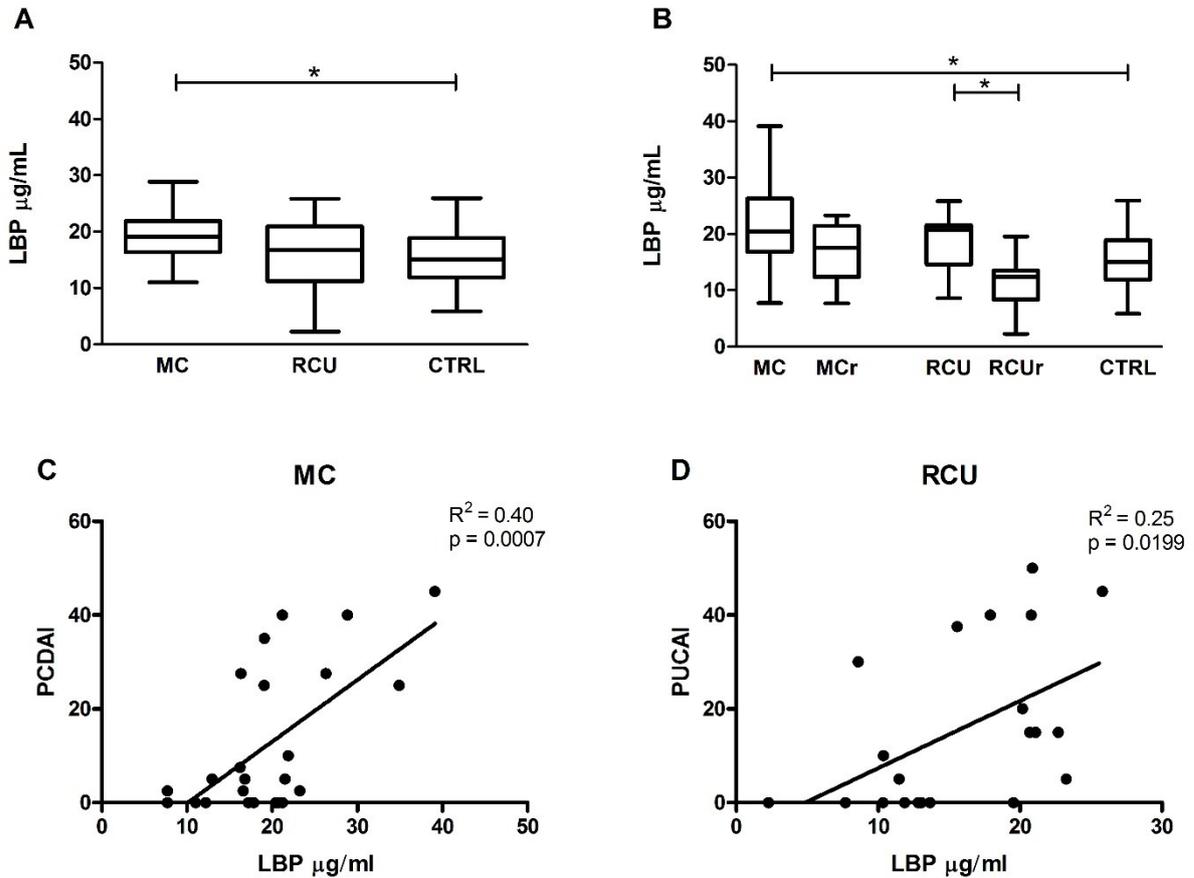


Figura 14. Dosaggio plasmatico del LPS Binding Protein (LBP) e correlazione con gli indici di attività di malattia. Quantificazione del LBP nei pazienti affetti da MC in fase attiva (MC) o in fase remissiva (MCr), da RCU in fase attiva (RCU) o in fase remissiva (RCUr) e nei soggetti sani (A e B). Correlazione tra gli indici di attività di malattia della malattia di Crohn's (PCDAI) o della Rettocolite ulcerosa (PUCAI) e i livelli plasmatici del LBP in pazienti con MC (C, $R^2 = 0.40$) o RCU (D, $R^2 = 0.25$). Significatività statistica: $* = p < 0.05$.

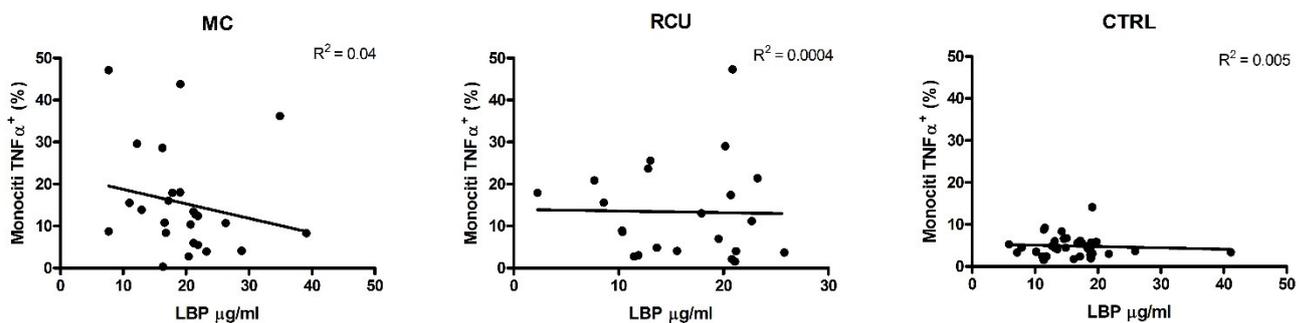


Figura 15. Correlazione tra l'espressione monocitaria di TNF α e i livelli plasmatici del LBP in pazienti con malattia di Crohn's (MC, $R^2 = 0.04$), con rettocolite ulcerosa (RCU, $R^2 = 0.0004$) e nei soggetti sani (CTRL, $R^2 = 0.005$). Nessuna significatività statistica riscontrata.

Per ciascun paziente incluso nello studio è stato ricavato lo *score* clinico pediatrico di attività di malattia, espresso come PCDAI per la MC o PUCAI per la RCU (riportati in Appendice 1). I valori plasmatici di LBP mostrano una chiara e significativa correlazione con gli indici di attività di malattia, specialmente con i PCDAI ($R^2 = 0.40$, $P < 0.001$) (Fig. 14C). Questo risultato conferma i dati presenti in letteratura, che assegnano al LBP un ruolo di *marker* sierico dell'attività di malattia nei pazienti affetti da MC [73, 74].

Nonostante LBP sia considerato un buon marcatore periferico, in condizioni basali non è stata trovata alcuna correlazione tra i livelli plasmatici di questa proteina e l'espressione monocitaria di $TNF\alpha$ (MC: $R^2 = 0.04$, RCU: $R^2 = 0.0004$, CTRL: $R^2 = 0.005$) (Fig. 15).

La quantificazione del CD14 solubile non ha portato a risultati significativi: i livelli della proteina plasmatica risultano comparabili nei pazienti affetti da MICI e nei controlli sani (Fig. 16A e B). Correlando inoltre gli *score* pediatrici con i valori di CD14s, è emerso un dato significativo solo nei pazienti con MC ($R^2 = 0.2255$, $P < 0.05$) (Fig. 16C), a testimoniare il fatto che, come il LBP, anche il CD14s risulta un buon marcatore di attività di malattia nella MC [73].

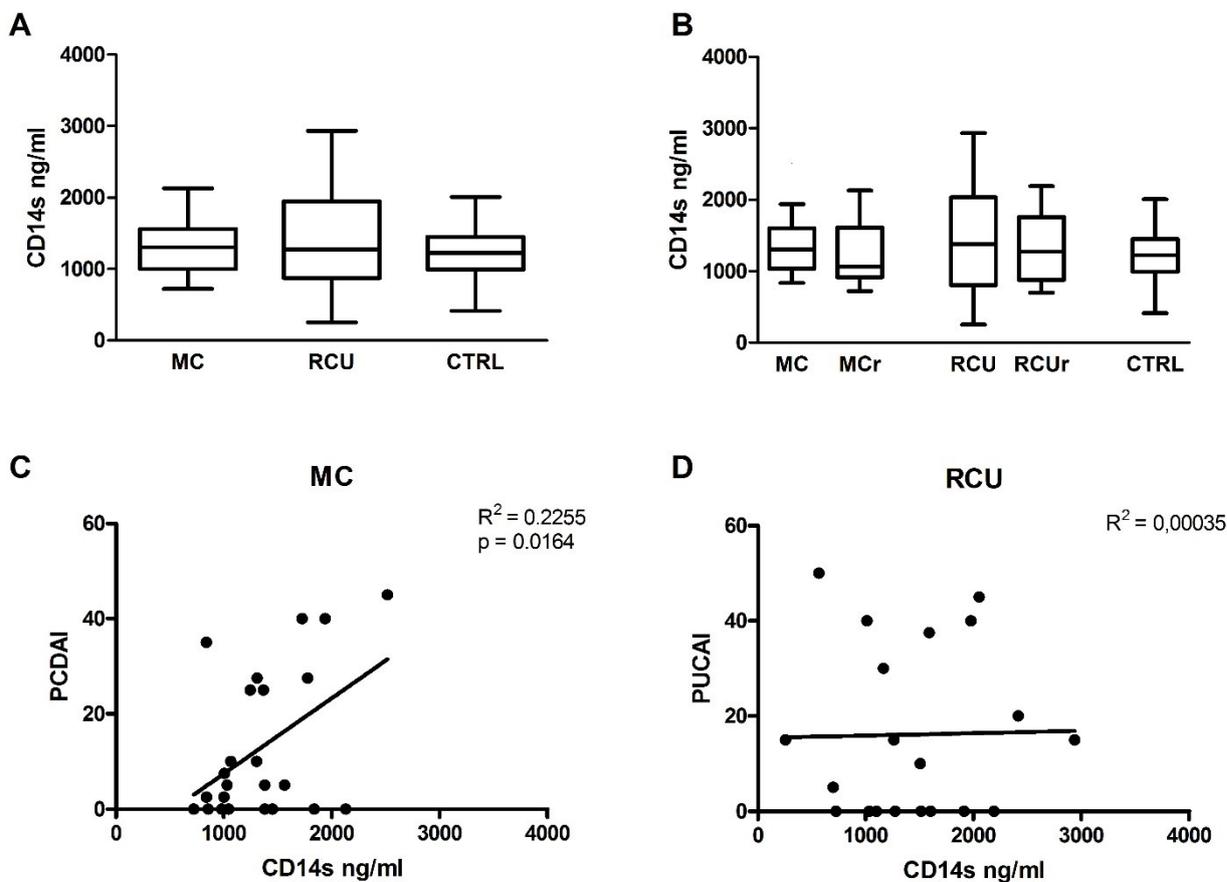


Figura 16. Dosaggio plasmatico del CD14 solubile (CD14s) e correlazione con gli indici di attività di malattia. Quantificazione del CD14s nei pazienti affetti da MC in fase attiva (MC) o in fase remissiva (MCr), da RCU in fase attiva (RCU) o in fase remissiva (RCUr) e nei soggetti sani (A e B). Correlazione tra gli indici di attività di malattia della malattia di Crohn's (PCDAI) o della Rettocolite ulcerosa (PUCAI) e i livelli plasmatici del CD14s in pazienti con MC (C, $R^2 = 0.22$, $p < 0.05$) o RCU (D, $R^2 = 0.00035$).

Attività di malattia nei pazienti con MICI

La produzione intracellulare del TNF α dei pazienti con MICI è stata correlata con i rispettivi indici di attività di malattia, ma nessuna evidente correlazione è stata riscontrata tra questi due parametri, nè nei pazienti con la MC ($R^2 = 0.004$) né in quelli affetti da RCU ($R^2 = 0.01$) (Fig. 17).

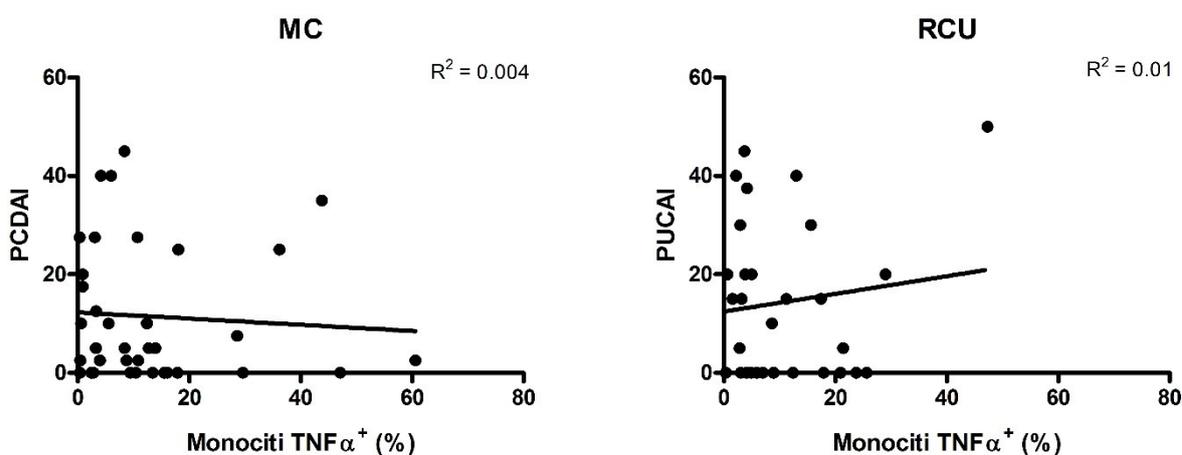


Figura 17. Correlazione tra l'espressione monocitaria di TNF α e gli score clinici di attività di malattia in pazienti con malattia di Crohn's (MC, espressi come PCDAI, $R^2 = 0.004$), con rettocolite ulcerosa (RCU, espressi come PUCAI, $R^2 = 0.01$). Nessuna significatività statistica riscontrata.

I risultati che sono stati ottenuti in questo set di esperimenti sono stati oggetto di una pubblicazione:

Altered pattern of TNF α production in peripheral blood monocytes from Crohn's Disease;
World J Gastroenterol. 2016 Nov 7;22(41):9117-9126. PMID: 27895399.

Studio 2: coltura *ex vivo* di biopsie coliche e analisi citochinica

Le caratteristiche cliniche di tutti i pazienti inclusi nello studio sono schematizzate nella Tabella 3 e rappresentate dettagliatamente nell'Appendice 2.

Tabella 3. Caratteristiche dei soggetti inclusi nell'analisi

Soggetti (n = 56)		Età (anni) (media±dev.st.)	Maschi/Femmine	Attivi/Remissivi
MICI (n = 48)	MC (n = 26)	11±3,08	16/10	23/3
	RCU (n = 22)	15±3,88	12/10	15/7
CONTROLLI (n=8)	CTRL (n = 8)	10±4,60	4/4	-

MICI: Malattie infiammatorie croniche dell'intestino; MC: Malattia di Crohn's; RCU: Rettocolite ulcerosa; CTRL: Controlli

Disegno sperimentale

La coltura *ex vivo* di biopsie intestinali è stata messa a punto per ottenere un modello di malattia completo, che comprendesse sia il *background* immunologico sia quello microbiologico.

Appena prelevate le due biopsie da colonscopia, vengono tagliate a metà ortogonalmente rispetto agli strati intestinali e messe in coltura per 24 ore in incubatore (a 37°C, 5% CO₂) in diverse condizioni di stimolazione. Per evidenziare il contributo sull'infiammazione dato dai batteri associati a mucosa, i frammenti bioptici sono stati stimolati in presenza o assenza di un miscela di antibiotici (penicillina e streptomina). Inoltre per studiare la funzionalità della *pathway* di NOD2 nei pazienti affetti da MC, rispetto a quelli affetti da RCU e ai controlli, è stata utilizzato lo stimolo infiammatorio, muramil dipeptide (MDP).

Riassumendo, ogni campione è stato analizzato in 4 condizioni sperimentali diverse:

- condizione basale, che prevede la presenza dei batteri commensali associati a mucosa (BM);
- condizione basale con l'aggiunta di antibiotici, per inattivare i batteri mucosali (PS);
- condizione stimolata, con il MDP in presenza di batteri vivi associati a mucosa (BM+MDP);
- condizione stimolata, con il MDP in presenza di batteri inattivati dagli antibiotici (MDP).

Dopo 24 ore di incubazione, il terreno di coltura è stato prelevato per la quantificazione di 17 analiti, tra cui citochine, chemochine e fattori di crescita (Fig. 18).

I livelli di 3 citochine (IL5, IL7 e IL13) sono risultati al di sotto del limite di quantificazione in tutte le condizioni sperimentali; sono stati quindi esclusi dall'analisi.

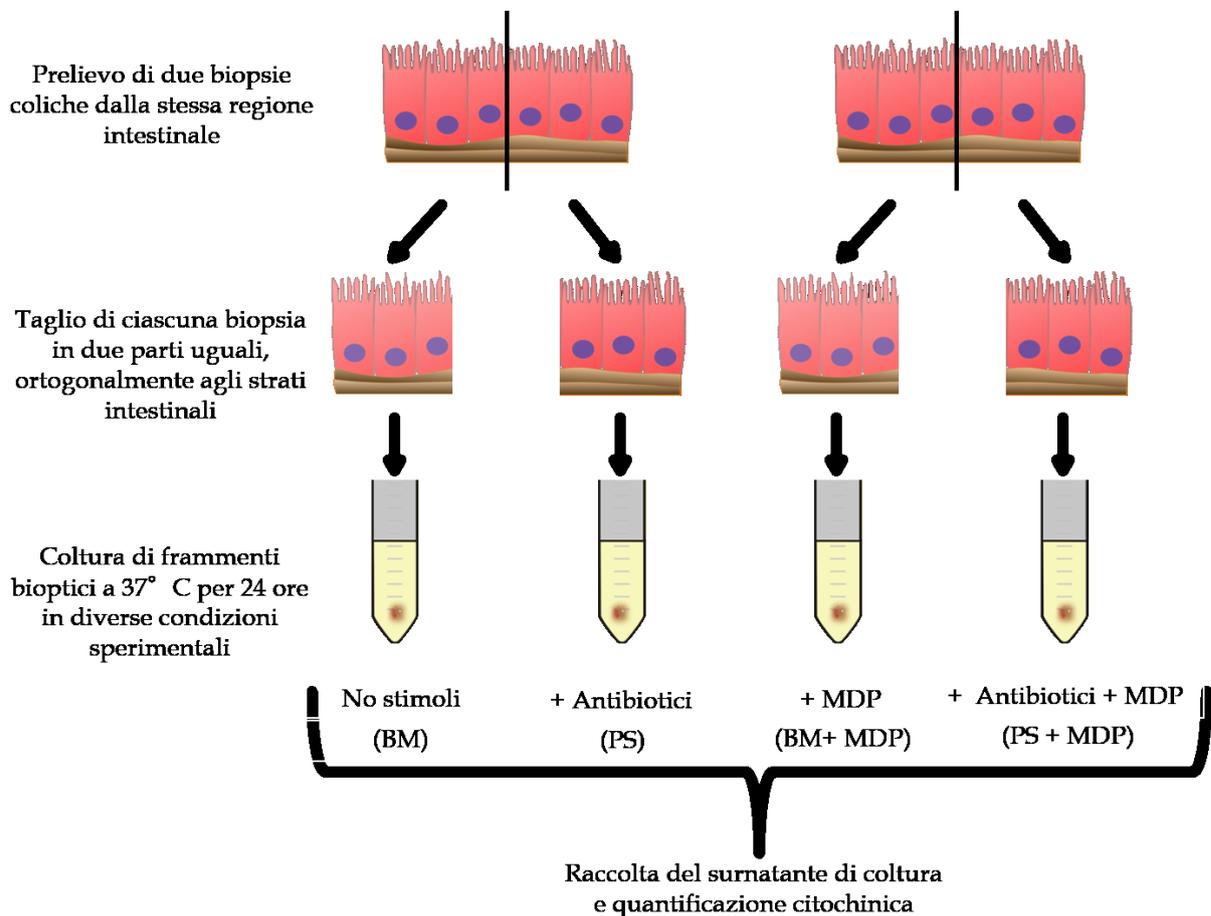


Figura 18. Illustrazione schematica del disegno sperimentale: coltura di frammenti biopistici, derivati da colonscopia. BM: Batteri mucosali; PS: Penicillina-streptomycin; BM+MDP: Muramil dipeptide con batteri vivi; PS+MDP: Muramil dipeptide con batteri inattivati.

Espressione citochinica basale

In condizione basale in presenza di soli batteri associati a mucosa, 5 analiti presentano un livello significativamente più alto nei pazienti con MC rispetto ai controlli (CTRL) (MC vs CTRL: G-CSF, $P = 0.024$, IL6 $P = 0.037$, IL8 $P = 0.033$, IL10 $P = 0.049$, IL12, $P = 0.028$) (Figura 9); i pazienti con RCU presentano livelli tendenzialmente più alti, ma con un'ampia variabilità che non permette di ottenere differenze significative, eccetto per il fattore di crescita GM-CSF, i cui livelli sono più alti nei soggetti con RCU rispetto sia ai pazienti con MC ($P = 0.034$) sia ai controlli ($P = 0.031$) (Fig. 19).

In tutti gli analiti, i controlli mostrano una bassa variabilità rispetto ai pazienti con MICI. I livelli di IL1 β , IL2, IL4, IL17, IFN γ , TNF α , MCP1 e MIP1 β non differiscono significativamente tra i tre gruppi analizzati, anche se i livelli mediani della maggior parte delle citochine tendono ad essere più alti nei soggetti con MICI, e specificatamente in quelli con RCU, rispetto ai controlli (Appendice 3).

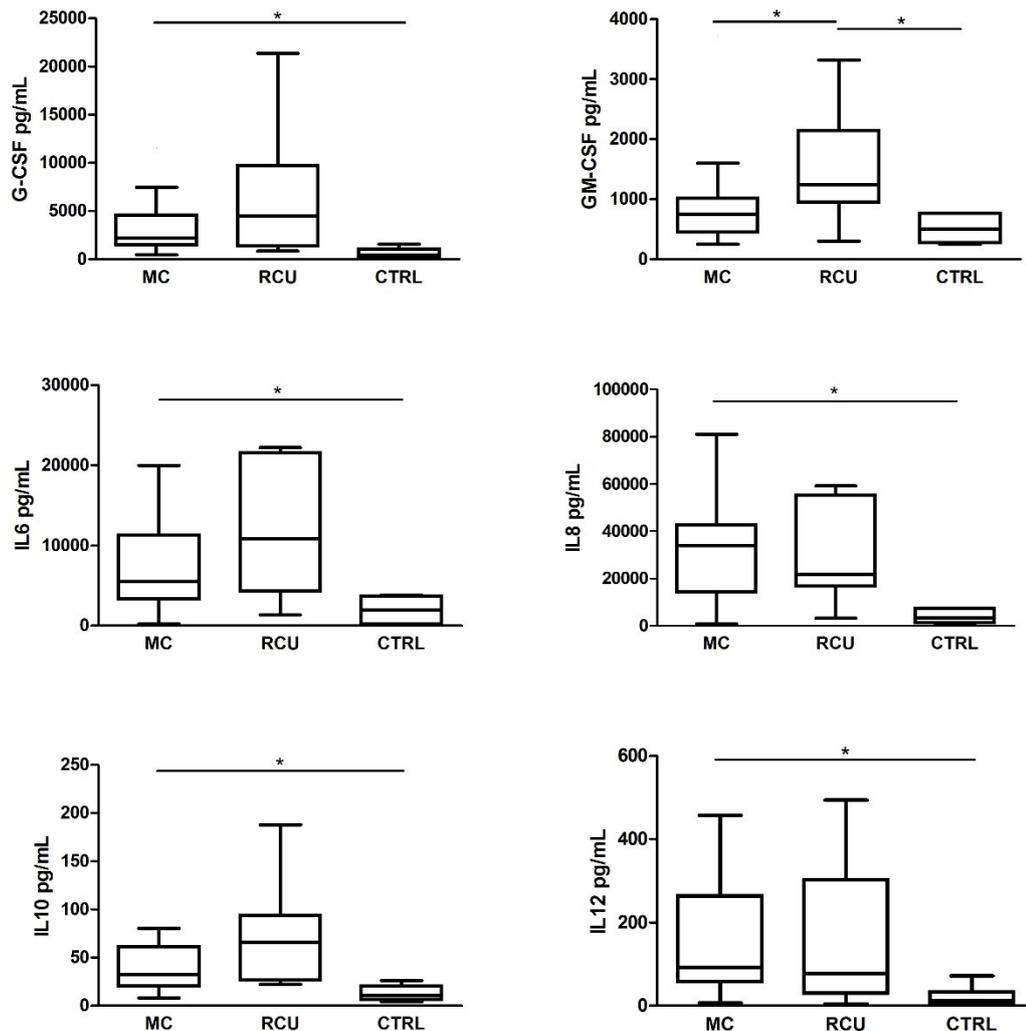


Figura 19. Livelli di secrezione citochinica da biopsie intestinali derivate da pazienti con malattia di Crohn's attiva (MC), con rettocolite ulcerosa attiva (RCU) e da soggetti sani, in condizioni basali (batteri mucosali, BM). Significatività statistica: *= $p < 0.05$.

I livelli medi di tutte le citochine analizzate nei tre diversi gruppi, nelle quattro condizioni di sperimentazione, sono rappresentati ed evidenziati con una scala analogica colorata (Fig. 20): per ogni analita, i valori che vanno dallo 0 al 24% del più alto valore osservato

sono rappresentati in verde, dal 25 al 49% in arancione, dal 50 al 74% in rosso e quelli sopra il 75% in rosso scuro.

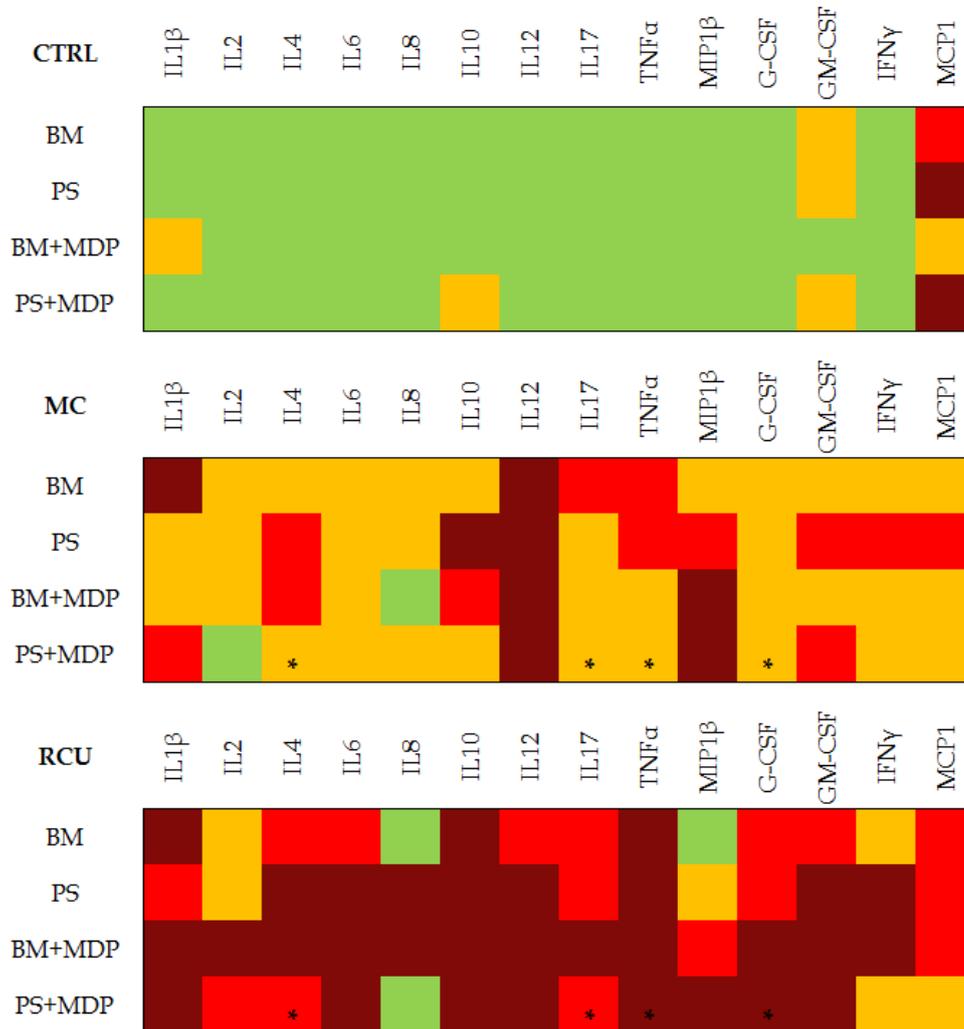


Figura 20. Scala analogica colorata che rappresenta i livelli mediани di tutte le citochine, nei soggetti sani (CTRL), nei pazienti con malattia di Crohn's (MC) e con rettocolite ulcerosa (RCU) nelle 4 condizioni sperimentali: basale con batteri mucosali (BM), basale con antibiotici (PS), stimolata con MDP in presenza di batteri mucosali (BM+MDP), stimolata con MDP in presenza di antibiotici (PS+MDP). I valori 0-24% del più alto valore sono mostrati in verde, 25%-49% in arancione, 50%-74% in rosso e sopra il 75% in rosso scuro. Gli asterischi indicano i set di citochine i cui valori hanno permesso di discriminare la MC dalla RCU con una sensibilità di 92% e una specificità di 50%.

Per quanto riguarda i campioni prelevati da pazienti con malattia in fase di remissione (valutata endoscopicamente), la maggior parte delle citochine risultano essere presenti, come previsto, a più bassi livelli rispetto a quelli riscontrati nei pazienti con malattia attiva (Appendice 4).

L'aggiunta di una miscela di antibiotici nel terreno di coltura, per inattivare la crescita e l'effetto dei batteri costitutivamente associati a mucosa, non va ad alterare in modo rilevante il *pattern* di secrezione citochinica nei tre gruppi analizzati (Appendice 5), fatta eccezione per IL8. Comparando i livelli di questa interleuchina, in assenza (-PS) o in presenza (+PS) della penicillina-streptomicina, si evidenzia un aumentato *trend* di secrezione dopo l'aggiunta degli antibiotici, specialmente nella RCU. Questo aumento nei pazienti affetti da RCU è così evidente che la differenza rispetto ai controlli e ai soggetti con MC diventa significativa (Fig. 21).

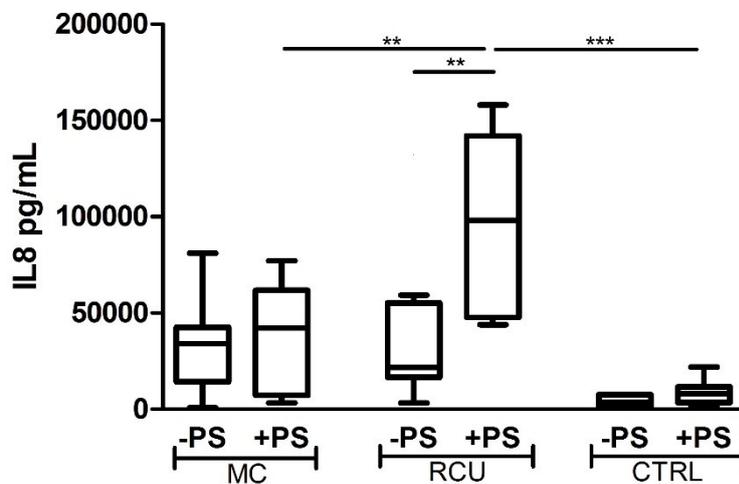


Figura 21. Quantificazione della secrezione di IL8 da coltura di frammenti biotici in assenza (-PS) o presenza (+PS) di una miscela di antibiotici (Penicillina-Streptomicina), in pazienti affetti da malattia di Crohn's (MC), da rettocolite ulcerosa (RCU) e in soggetti sani (CTRL). Significatività statistica: **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$.

Pattern citochinico indotto dal MDP

Lo stimolo pro-infiammatorio MDP è stato utilizzato per studiare la funzionalità *ex vivo* della *pathway* di NOD2 nella MC rispetto alla RCU.

In generale, la risposta al MDP risulta essere maggiore nei pazienti affetti da RCU rispetto a quelli affetti da MC (vedi scala analogica colorata, Fig. 20). Dopo l'aggiunta di MDP, in assenza di antibiotici (presenza di batteri mucosali vivi), anche se le differenze non risultano significative, si evidenzia un chiaro aumento di secrezione del IL2, IL6, IL8, IL17 e IFN γ nella RCU, mentre nessun cambiamento evidente si osserva nella MC.

I controlli, in presenza di MDP, tendono invece a secernere minori quantità di IL2, IL6 e IFN γ , anche se in scala minore (Fig. 22).

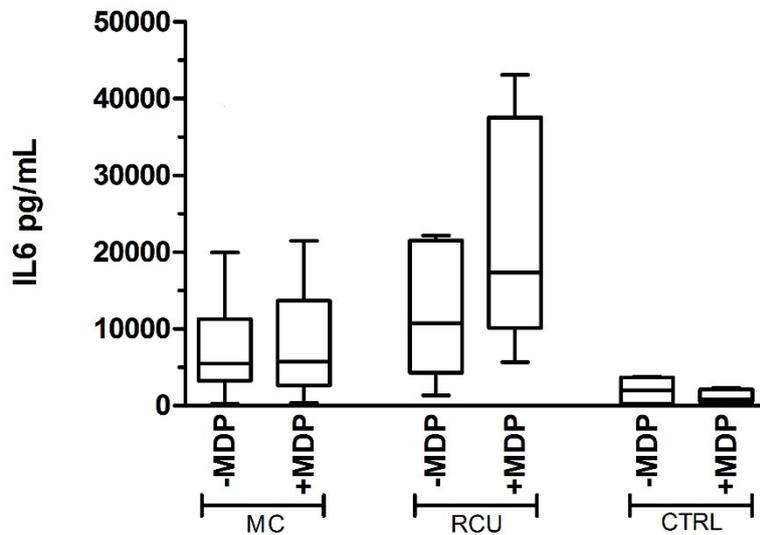


Figura 22. Grafico rappresentativo della secrezione citochinica in seguito all'aggiunta di MDP, in assenza di antibiotici (presenza di batteri mucosali, BM). Sono rappresentati i trend di secrezione del IL6 in presenza (+MDP) o assenza (-MDP) dello stimolo pro-infiammatorio, in pazienti affetti da malattia di Crohn's (MC), da rettocolite ulcerosa (RCU) e in soggetti sani (CTRL). Nessuna significatività statistica riscontrata.

In seguito all'aggiunta della miscela di antibiotici, il *pattern* di secrezione viene sovvertito: la stimolazione con il MDP non è più in grado di indurre un evidente aumento della secrezione citochinica, in nessuno dei tre gruppi analizzati. E' possibile notare invece un'importante riduzione dei livelli del IL8 nei pazienti affetti da RCU (Fig. 23).

Gli altri analiti studiati, i cui valori sono riportati nell'Appendice 6 e 7, non hanno mostrato delle differenze evidenti nei *trend* di secrezione citochinica, in presenza o assenza di MDP.

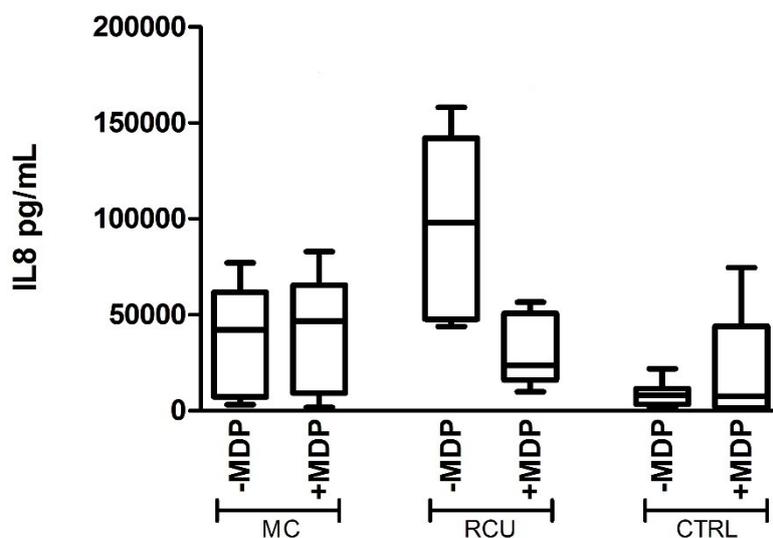


Figura 23. Grafico rappresentativo della secrezione citochinica in seguito all'aggiunta di MDP, in presenza di antibiotici (penicillina-streptomina, PS). Sono rappresentati i trend di secrezione del IL8 in presenza (+MDP) o assenza (-MDP) dello stimolo pro-infiammatorio, in pazienti affetti da malattia di Crohn's (MC), da rettocolite ulcerosa (RCU) e in soggetti sani (CTRL). Nessuna significatività statistica riscontrata.

Regressione logistica multivariata e analisi della curva ROC per identificare profili di citochine pro-infiammatorie associate a MICI

Regressioni logistiche multivariate sono state condotte per valutare l'esistenza di combinazioni di citochine associate con esiti relativi alle MICI.

Solo le condizioni che prevedono l'aggiunta di antibiotici hanno prodotto profili significativi. In particolare, senza stimolazione con il MDP, le citochine IL2, IL4 e IL8 sono risultate, tramite analisi multivariata, significativamente associate alle MICI (Tabella 4A). L'analisi ROC (Fig. 24A) mostra che l'area sotto la curva (AUC) è di 0.98 (95% CI: 0.93-1.00), potendo ottenere una sensibilità del 100% con una specificità del 71%.

Con l'aggiunta del MDP nel *medium* di coltura, un altro set di citochine (MCP1, IL8 e IL10) è risultato significativamente associato alle MICI (Tabella 4B). La AUC per questo modello è di 0.91 (95% CI: 0.79-1.00) (Fig. 24B). Mantenendo la sensibilità nell'identificazione delle MICI al 94%, si otterrebbe una specificità del 75% che permetterebbe di identificare 45 pazienti MICI su 48, con due falsi positivi su otto controlli sani.

Dopo la stimolazione con il MDP è stato anche possibile discriminare tra MC e RCU, basandosi sui valori di G-CSF, TNF α , IL4 e IL17 (Tabella 5). Secondo l'analisi ROC (Fig. 24C), la AUC è risultata dello 0.78 (95% CI: 0.65-0.91), potendo arrivare ad una sensibilità per la MC del 92.31%, a fronte di una specificità del 50%.

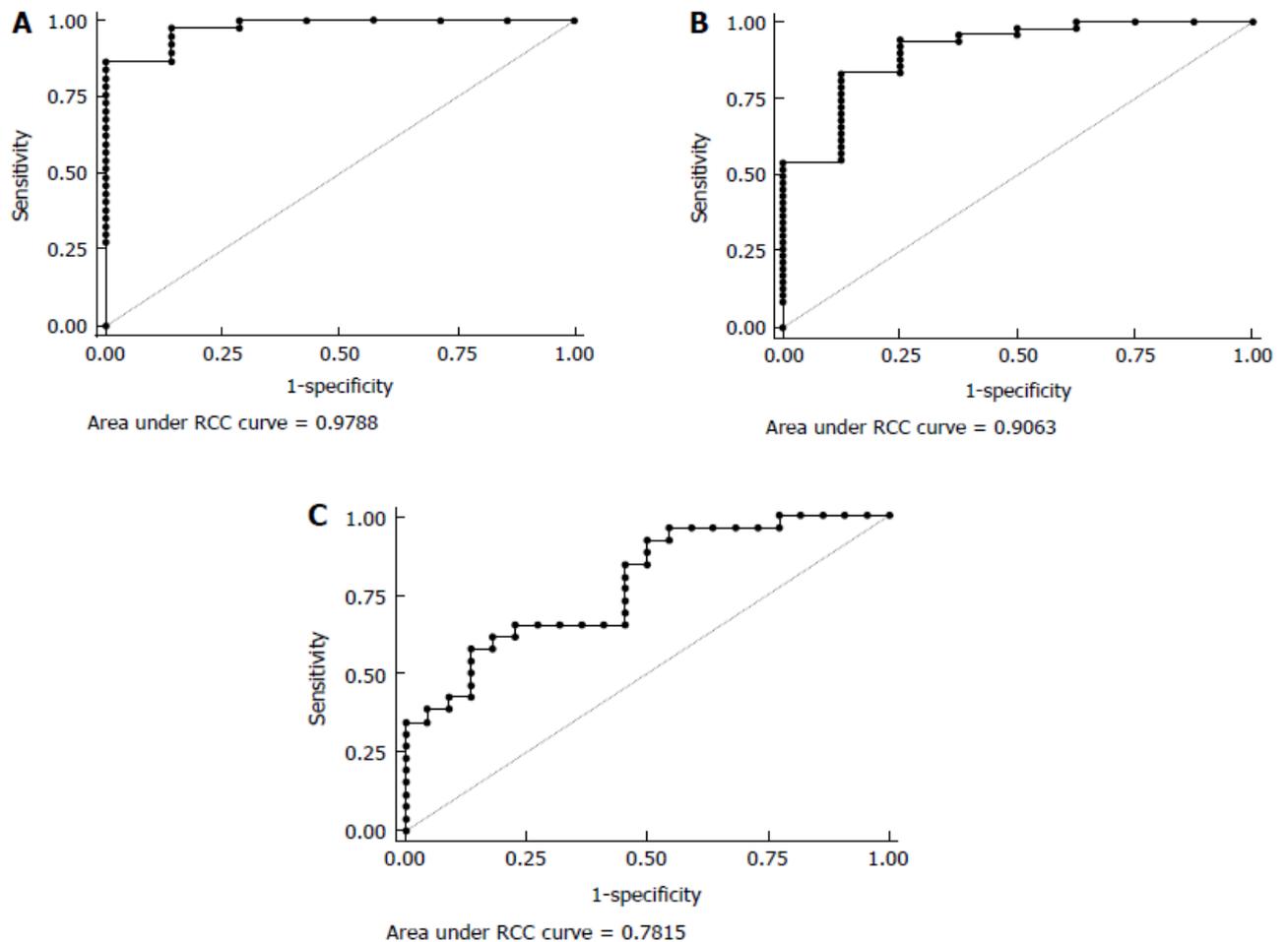


Figura 24. Analisi multivariate. A. Curva ROC del set citochinico IL2, IL4 e IL8 per discriminare le MICI dai controlli sani: AUC = 0.98 (95% CI: 0.93-1.00), sensibilità 100% e specificità 71%. B. Curva ROC del set citochinico MCP1, IL8 and IL10 per discriminare le MICI dai controlli sani: AUC = 0.91 (95% CI: 0.79-1.00), sensibilità 94% e specificità 75%. C. Curva ROC del set citochinico G-CSF, TNF α , IL4 and IL17 per discriminare la MC dalla RCU: AUC = 0.78 (95% CI: 0.65-0.91), sensibilità 92% e specificità 50%.

I risultati che sono stati ottenuti in questi set di esperimenti sono stati oggetto di una pubblicazione:

-Ex vivo response to mucosal bacteria and muramyl dipeptide in inflammatory bowel disease; World J Gastroenterol. 2016 Nov 28;22(44):9734-9743. PMID: 27956797.

Tabella 4. Analisi multivariate MICI vs CTRL

A. In presenza di antibiotici (PS):

Variabili	OR	95% CI	P value	Coefficienti di regressione
IL2	1.553421	1.011162 – 2.386481	0.044	0.440460
IL4	0.473238	0.228780 – 0.978906	0.044	-0.748157
IL8	1.000267	1.000030 – 1.000504	0.027	0.000267
Constant	0.065259	0.003533 – 1.205600	0.067	-2.729393

B. In presenza di antibiotici e MDP (PS+MDP):

Variabili	OR	95% CI	P value	Coefficienti di regressione
MCP1	0.997248	0.995067 – 0.999434	0.014	-0.0027555
IL8	1.000094	1.000019 – 1.000170	0.014	0.0000944
IL10	1.098966	1.009008 – 1.196944	0.030	0.0943694
Constant	0.529026	0.108222 – 2.586054	0.432	-0.636717

OR: *Odds Ratio*; CI: intervallo di confidenza.**Tabella 5. Analisi multivariata MC vs RCU**

In presenza di antibiotici e MDP (PS+MDP):

Variabili	OR	95% CI	P value	Coefficienti di regressione
G-CSF	0.999703	0.999484 – 0.999921	0.008	-0.0002975
TNF α	0.990492	0.981420 – 0.999649	0.042	-0.0095533
IL4	1.155281	1.012918 – 1.317651	0.031	0.1443433
IL17	1.009361	1.000308 – 1.018497	0.043	0.0093177
Constant	1.043247	0.333344 – 3.264992	0.924	0.042338

OR: *Odds Ratio*; CI: intervallo di confidenza.

Studio 3: analisi della risposta epiteliale a componenti batteriche purificate

Abbiamo voluto sviluppare un sistema per analizzare la risposta epiteliale a componenti microbiche sintetiche, utilizzando una linea cellulare altamente stabilizzata e utilizzata in letteratura, le cellule Caco2 di derivazione colica, in grado di ricreare *in vitro* un *monolayer* simil-epiteliale.

Analisi di impedenza elettrica e di vitalità cellulare

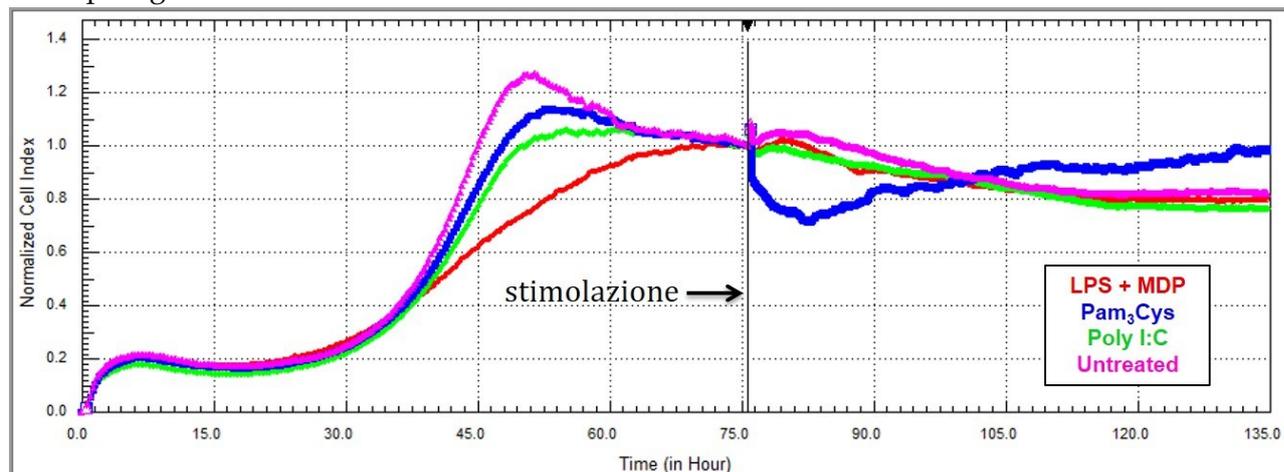
Una volta stabilita la giusta densità cellulare (densità di semina: 15000cellule/pozzetto), le Caco2 sono state seminate in piastre E-plate per essere analizzate con lo strumento automatizzato xCELLigence, senza l'aggiunta di alcun marcatore cellulare.

Raggiunta la fase di *plateau*, le cellule sono state stimolate con diversi componenti microbici solubili [LPS in associazione con il MDP (LPS+MDP), Pam₃Cys e il PolyI:C] e la risposta epiteliale a questi stimoli è stata registrata in tempo reale ogni 15 minuti.

Per osservare meglio le variazioni di Cell Index (CI), è stata eseguita una normalizzazione al momento della stimolazione, in modo che tutte le curve partano dallo stesso valore di CI, uguale a 1. Dal grafico dell'impedenza, si osserva che solo il Pam₃Cys (linea blu) ha indotto una perturbazione della cinetica cellulare rispetto alla condizione di controllo (linea rosa), evidenziata da un abbassamento repentino del CI. Questa alterazione risulta però essere temporanea, dato che tende a normalizzarsi con il passare del tempo (Fig. 25A). Guardando gli istogrammi che riportano le medie dei valori di CI ottenuti in più esperimenti, è possibile confermare che questa perturbazione risulta essere significativa a 2 e 4 ore dalla stimolazione e che tende a ristabilirsi a 16 ore dall'aggiunta dello stimolo (Fig. 26).

Le altre curve invece non sembrano variare in seguito all'aggiunta degli stimoli, in quanto sono molto simili alla curva di controllo, corrispondenti alle cellule *untreated*.

A. Dopo 3 giorni di coltura



B. Dopo 7 giorni di coltura

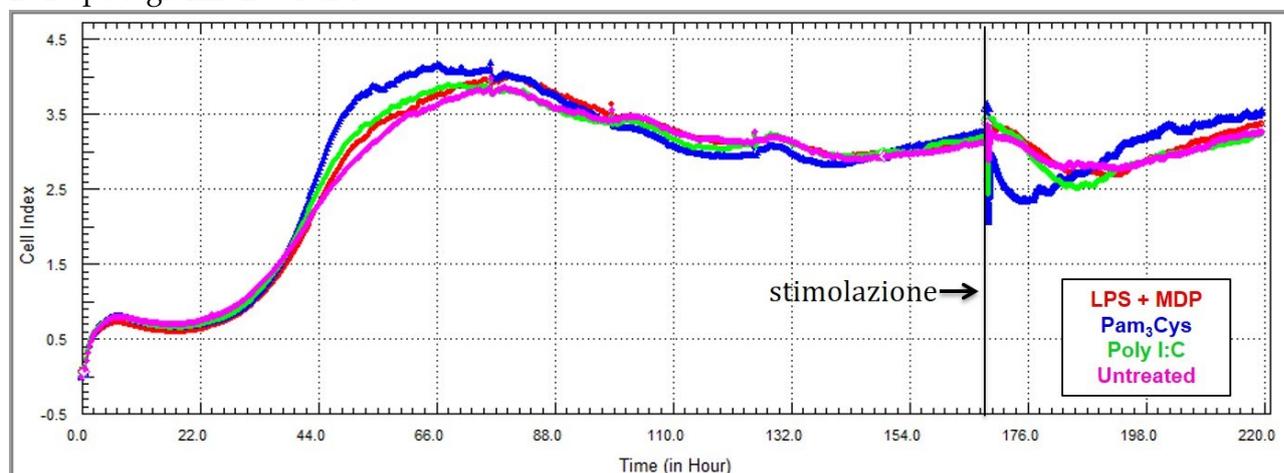


Figura 25. Analisi di impedenza elettrica tramite strumento xCELLigence effettuata sulle cellule Caco2, lasciate crescere per 3 (A) o per 7 giorni (B) in coltura, e stimolate con diversi composti microbici purificati, Lipopolisaccaride e Muramil Dipeptide (LPS+MDP, linea rossa), Pam₃Cys (linea blu), Poly I:C (linea verde). La condizione di controllo (cellule non stimolate) è rappresentata con una linea rosa (Untreated).

Dati in letteratura suggeriscono che le Caco2 in coltura tendono a differenziarsi spontaneamente in enterociti maturi, formando un *monolayer* più compatto, che presenta caratteristiche morfologiche e funzionali simili all'epitelio intestinale umano [75]. Anche sulle cellule più differenziate (lasciate sette giorni in coltura prima della stimolazione, con opportuni cambi di terreno), il Pam₃Cys induce lo stesso effetto sul CI. (Fig. 25B).

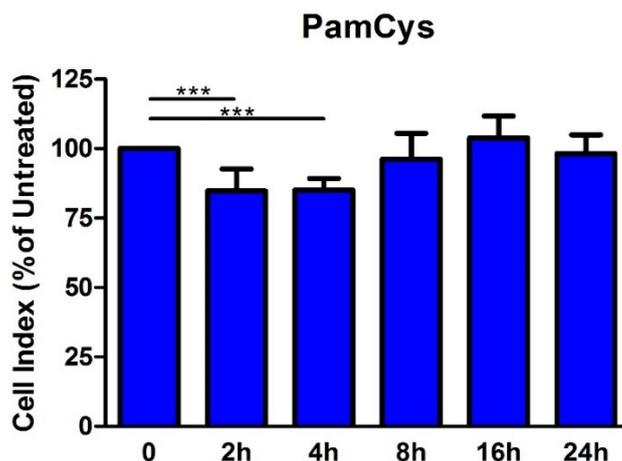


Figura 26. L'effetto temporaneo del Pam₃Cys sulle Caco2 coltivate e analizzate con lo strumento xCELLigence. Gli istogrammi riportano i valori medi del Cell Index (+dv.st.), ottenuti da tre esperimenti indipendenti effettuati in triplicato; i dati sono espressi in percentuale (%) rispetto alla condizione non stimolata. Significatività statistica: ***= $p < 0.001$.

Variando il dosaggio dello stimolo, è stato possibile osservare che il Pam₃Cys induce un effetto dose-dipendente: fino alla concentrazione di 10 μ g/ml, il composto induce una variazione transitoria di impedenza, non dipendente da un'alterazione della vitalità delle cellule, che sono ancora in grado di ridurre il MTT in formazano. Se utilizzato più concentrato (50 μ g/ml), invece di un effetto temporaneo, lo stimolo induce un effetto drastico e permanente, dovuto in questo caso ad un buon tasso di morte cellulare (Fig. 27A e B).

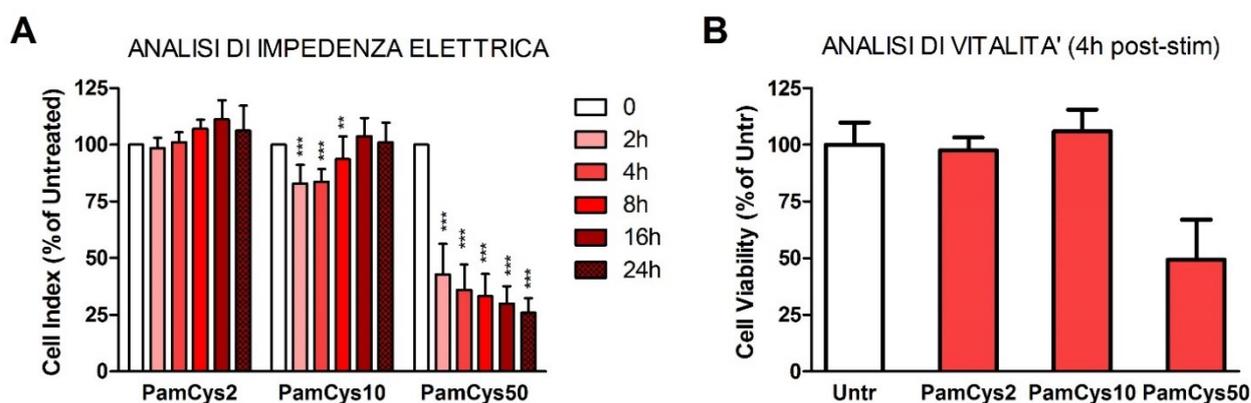


Figura 27. Effetto temporaneo e dose dipendente del Pam₃Cys (2, 10 o 50 μ g/ml) sulle Caco2. A. Gli istogrammi riportano le medie dei valori di Cell Index di tre esperimenti indipendenti effettuati in duplicato. B. Analisi di vitalità cellulare tramite test del MTT, sulle Caco2 stimulate con diverse concentrazioni di Pam₃Cys. L'analisi è stata effettuata a 4ore post-stimolazione. I dati sono espressi in percentuale (%) rispetto alla condizione non stimolata. Significatività statistica: **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$

DISCUSSIONE

DISCUSSIONE

L'eziologia e la patogenesi della MC sono ancora sconosciute, sebbene sia stato osservato un coinvolgimento di alcuni geni dell'immunità innata ed uno squilibrato rapporto tra sistema immune mucosale e microbiota intestinale. Dati clinici e studi genetici portano a pensare che alla base della patogenesi stiano un difettoso funzionamento dell'immunità innata mucosale e una risposta infiammatoria adattativa di natura compensatoria.

Il sistema immunitario innato sembra quindi giocare un ruolo fondamentale nella patogenesi della MC. Molte varianti associate a malattia ricadono in geni (come, per esempio, *NOD2*) coinvolti nella risposta funzionale a componenti microbiche (PAMPs) ed espressi principalmente nei monociti.

Questa tesi ha avuto l'obiettivo di studiare le caratteristiche immuno-patologiche della MC, sviluppando dei modelli che permettessero di evidenziare dei profili di risposta a componenti batteriche, caratteristici della MC. L'ipotesi di partenza è che esistano meccanismi a monte dell'infiammazione la cui identificazione possa fornire bersagli per terapie innovative, che siano basate sulla modulazione piuttosto che sulla soppressione della risposta immunitaria.

Inizialmente abbiamo voluto cercare a livello periferico l'eventuale presenza di un difetto della risposta immunitaria innata nei soggetti affetti da MC. A partire da un test già in uso clinico per lo *screening* di un immunodeficienza (deficit di *IRAK4*), abbiamo sviluppato un test citofluorimetrico di veloce e semplice esecuzione per indagare la funzionalità e l'integrità delle diverse *pathway* immunitarie innate in monociti circolanti. Lo studio si è concentrato sull'analisi di queste cellule, dal momento che sono facilmente recuperabili ed analizzabili con un prelievo di sangue periferico (non invasivo) e sono delle buone rappresentanti sui cui studiare il profilo immunitario innato.

Diversamente da quanto ci si aspettava, non è stato riscontrato alcun difetto nella risposta immunitaria nella MC, ma, al contrario, una tendenza all'eccesso di risposta. I pazienti con MC presentano infatti un'aumentata attivazione basale, testimoniata da una maggior produzione intracellulare di $TNF\alpha$, che si mantiene anche in seguito a stimolazione con il MDP e il Pam₃CSK₄. Questo risultato non permette di spiegare chiaramente i meccanismi che legano il difetto genetico all'aumentata attivazione monocitaria, ma

evidenza ancora il paradosso difetto-eccesso caratteristico della malattia [76]: i monociti dei pazienti con MC mostrano un'aumentata attivazione e produzione di citochine infiammatorie, ma possono presentare difetti funzionali riguardanti la capacità di maturazione e di *clearance* batterico.

Questo stato di iper-attivazione non è influenzato in modo significativo né dal genotipo di *NOD2* (analizzate le principali tre varianti), né dall'attività di malattia dei diversi pazienti presi in analisi. Un'altra ipotesi è che i monociti circolanti potessero essere attivati secondariamente al danno della mucosa e alla traslocazione batterica, con conseguente passaggio nel sangue di derivati batterici, come LPS. In realtà, i nostri dati non mostrano una chiara correlazione dell'attivazione monocitaria nemmeno con l'LBP e il CD14 solubile (indicatori indiretti del LPS circolante), che pure si confermano buoni marcatori periferici dello stato di malattia [77].

La maggiore risposta nei pazienti con MC rispetto ai controlli sani e ai pazienti con RCU dopo la stimolazione di *NOD2* (con il rispettivo ligando MDP) non ha trovato una chiara spiegazione, ma dimostra l'importanza di questa *pathway* nella MC e non nella RCU. Questo risultato è coerente con il fatto che *NOD2* è il fattore genetico maggiormente associato con la MC, anche se i meccanismi immuno-patogenetici rimangono sconosciuti e controversi.

Ipotizziamo quindi che lo stato infiammatorio riscontrato nella MC possa essere dovuto ad una attivazione di *pathway* indipendenti da *NOD2*, innescati direttamente o come tentativo compensatorio di un probabile difetto iniziale. Inoltre il fatto che i monociti dei pazienti con MC mostrino una più alta produzione di TNF α rispetto ai controlli, anche in seguito a stimolazione dei recettori innati, potrebbe essere correlato con una ridotta tolleranza nei confronti dei PAMPs, per un malfunzionamento del meccanismo della *endotoxin tolerance*, che dovrebbe proteggere l'organismo da un eccessivo danno infiammatorio in presenza di cronica esposizione ad endotossina. L'aumentata risposta al ligando del TLR2/1 (Pam₃CSK₄) potrebbe quindi indicare una possibile attivazione dei monociti da una colonizzazione micobatterica, in particolare da parte del MAP (*Mycobacterium avium paratuberculosis*) già indagato secondo l'ipotesi infettiva sulla patogenesi della MC.

Il primo approccio non ha portato a chiari risultati, forse perché si è concentrato sull'analisi di cellule mononucleate isolate da sangue periferico, che non riflettono pienamente lo stato infiammatorio e la risposta immunologica che si manifesta invece a livello mucosale.

Abbiamo quindi spostato la nostra attenzione dal circolo periferico al tessuto intestinale, lì dove si manifesta il quadro infiammatorio. Il secondo approccio prevede la coltura *ex vivo* di biopsie coliche, tessuto non molto accessibile (a differenza del sangue periferico) ottenuto da un esame invasivo, ma allo stesso tempo molto informativo, dal momento che tiene conto contemporaneamente del *background* genetico e dalla componente microbica normalmente associata a mucosa intestinale. Questo metodo ci ha permesso di evidenziare l'importanza del microbiota nella modulazione della risposta infiammatoria intestinale, valutata tramite quantificazione della secrezione *ex vivo* di citochine nel terreno di coltura.

E' noto che i tessuti intestinali derivati da soggetti con MICI sono caratterizzati da un'aumentata secrezione di citochine pro-infiammatorie: un'alterata secrezione di IL8 in seguito a stimolazione con *E.Coli* o altri batteri intestinali è stata infatti documentata da Edward e colleghi e considerata un buon marcatore dello squilibrio mucosale, presente nella MC [78]. In questo caso non era stata considerata l'autoctona colonizzazione della mucosa da parte della propria flora batterica. Il nostro studio ha inserito nella coltura *ex vivo* la presenza (o assenza) di una miscela di antibiotici, per evidenziare l'influenza e la modulazione del microbiota (vitale o inattivato) sul *pattern* citochinico. In condizione basale, la MC è caratterizzata da una maggior produzione di alcune citochine pro-infiammatorie, quali IL6, IL8, IL10, IL12 e G-CSF, rispetto ai controlli, e una diminuita produzione di GM-CSF rispetto alla RCU. Il *trend* di secrezione citochinica non viene alterato in modo significativo dall'aggiunta degli antibiotici nel terreno di coltura, ad eccezione del caso del IL8 nei pazienti con RCU, caratterizzati da un'aumentata produzione della citochina pro-infiammatoria dopo trattamento antibiotico [79]. Gli antibiotici possono indurre questo effetto pro-infiammatorio nella RCU, sia perché riducono l'azione protettiva data dalla flora batterica, sia perché possono portare al rilascio di componenti batteriche infiammatorie. Questo risultato può sostenere l'ipotesi secondo cui gli antibiotici possono influenzare la RCU, come suggerito da alcuni autori [80],

anche se in letteratura si trovano dei risultati contrastanti su questo argomento [81]. Quello che è ben noto è che l'esposizione agli antibiotici in età giovanile aumenta il rischio di sviluppare la MC, ma non la RCU [82]. Gli antibiotici possono causare alterazioni del microbiota che potrebbero potenzialmente contribuire alla disbiosi e ad una risposta immunitaria disregolata che si osserva nelle MICI. Non è chiaro il motivo per cui l'esposizione agli antibiotici è stata associata solo ad una delle due patologie intestinali; gli studi suggeriscono una differenza nella composizione del microbiota tra i pazienti affetti da MC e da RCU. Inoltre un'altra ipotesi è che il trattamento antibiotico possa causare cambiamenti nel microbiota che predispone maggiormente alla MC rispetto alla RCU [82].

Con questo metodo abbiamo potuto dimostrare che la coltura con antibiotici (che inattivano quindi i batteri mucosali) è l'unica condizione *ex vivo* in cui è stato possibile identificare un profilo citochinico in grado di discriminare la MC dalla RCU. Infatti la combinazione dei valori relativi a G-CSF, TNF α , IL4 e IL17, identifica la MC dalla RCU, con una sensibilità del 92% e specificità del 50% [79]. Questi risultati suggeriscono quindi di tener conto della presenza dei batteri mucosali, quando si ha a che fare con analisi *ex vivo* di biopsie intestinali. Va sottolineato inoltre che gli antibiotici utilizzati in coltura vanno ad agire e a neutralizzare la flora adesa alla mucosa; non va escluso però un possibile ruolo patogenetico *in vivo* anche da parte dei batteri intestinali non adesi alla mucosa, attraverso la secrezione di citochine e altre sostanze in grado di alterare l'omeostasi e la risposta immune mucosale.

In questo set di esperimenti, è stato possibile inoltre osservare che, anche se non si sono evidenziate differenze significative, c'è un *trend* di maggiore produzione citochinica nella RCU rispetto alla MC. Questo risultato non è sorprendente, dal momento che sono stati analizzati campioni superficiali della mucosa intestinale, dove la RCU si manifesta maggiormente rispetto alla MC, che, al contrario, si estende anche negli strati sottostanti della parete intestinale.

Questo modello prevede però dei limiti, relativi alla diversità dei pazienti presi in considerazione: un diverso grado di attività di malattia, una diversa storia clinica e terapeutica o una variabilità sul campionamento delle biopsie possono portare a risultati differenti; inoltre i soggetti utilizzati come controlli, non si possono definire

completamente sani, dato che si sono sottoposti ad un esame endoscopico. Nonostante questi limiti, grazie ad una buona casistica, l'analisi ci ha permesso di riscontrare una diversità nella risposta mucosale nella MC.

L'analisi di tessuti intestinali, essendo un sistema molto completo, tiene conto di diverse variabili (fattori genetici, fattori ambientali) ma risente al tempo stesso di diverse limitazioni; per concentrarsi solo sulla componente microbica, indipendentemente dalla suscettibilità genetica, abbiamo voluto sviluppare un altro sistema per analizzare la risposta epiteliale a componenti microbiche purificate, utilizzando una linea cellulare stabilizzata e utilizzata in letteratura, le cellule Caco2 di derivazione colica, in grado di ricreare *in vitro* un *monolayer* simil-epiteliale.

A questo scopo abbiamo utilizzato uno strumento in grado di fornire informazioni su diverse processi biologici (adesione, crescita e morfologia cellulare), registrando cambiamenti di impedenza legata all'adesione cellulare. Il principale vantaggio di questo strumento è quello di fornire informazioni riguardo al numero, alla vitalità o alla morfologia delle cellule in *real time*, registrando una cinetica di risposta allo stimolo.

Le Caco2 sono state stimulate inizialmente solo con composti microbici purificati per verificare se lo strumento utilizzato risultasse idoneo alla nostra analisi; l'obiettivo finale sarà quello di utilizzare lo stesso sistema per l'identificazione di preparati batterici derivati da pazienti affetti da MICI in grado di perturbare il *monolayer* epiteliale.

L'unico stimolo purificato che ha portato ad una rilevante variazione della cinetica di crescita delle cellule in coltura è stato il Pam₃Cys, molecola di derivazione micobatterica. Questo composto è in grado di indurre un'alterazione temporanea che si normalizza a partire da 8-16 ore post-stimolazione, non dipendente dalla morte cellulare. Questi cambiamenti potrebbero correlare con la capacità dello stimolo di indurre un aumento della permeabilità epiteliale; infatti la transitoria diminuzione del Cell Index di un monostrato di cellule a confluenza sta ad indicare la comparsa di spazi paracellulari, che favoriscono la trasmissione della corrente con riduzione dell'impedenza. Il fatto che solo il Pam₃Cys abbia indotto un effetto rilevante non è di chiara interpretazione. E' già noto in letteratura che la linea utilizzata presenta una scarsa sensibilità al LPS [83]. Il ruolo del Pam₃Cys potrebbe al contrario essere di particolare interesse, dato che a più riprese sono state presentate evidenze di un possibile coinvolgimento dei micobatteri nella patogenesi

della MC. Un'azione permeabilizzante da parte di questo composto, derivato dalla parete micobatterica, potrebbe fornire una spiegazione a queste osservazioni. Questi germi potrebbero quindi giocare un ruolo importante nelle fasi iniziali della malattia, portando ad un aumento della permeabilità della barriera intestinale. Coerente con questa ipotesi, ci sono numerosi studi che mostrano un possibile effetto del *Mycobacterium avium paratuberculosis* nello scatenamento della MC [84].

Questo test è risultato un buon modello con cui analizzare cellule epiteliali primarie derivate da pazienti con MC, per valutare se esiste una particolare sensibilità a singoli stimoli batterici o, all'opposto, utilizzare un'unica linea epiteliale standardizzata (le Caco2) sui cui testare germi intestinali derivati da pazienti con MICI o soggetti sani.

I risultati che sono stati ottenuti in questi set di esperimenti sono stati oggetto di due pubblicazioni sulla rivista internazionale "*World Journal of Gastroenterology*".

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

In conclusione i nostri risultati mostrano che è stato possibile sviluppare diversi modelli per evidenziare specifici profili di risposta mucosale tipici della MC.

Questi modelli possono venir sfruttati per studiare l'effetto di nuove strategie terapeutiche correttive, basate sulla modulazione dell'interazione tra immunità mucosale e microbiota intestinale. Ad esempio, invece di sopprimere la risposta infiammatoria (con effetti che possono aggravare la situazione) si potrebbe valutare nei modelli sviluppati farmaci in grado di rinforzare la risposta immune della mucosa, o sostanze capaci di neutralizzare l'azione permeabilizzante di componenti batteriche.

Tuttavia, ci sembra improbabile che una terapia risolutiva per la MC possa basarsi solo su strumenti che esercitano la propria azione sui meccanismi della risposta immune mucosale. Infatti, come già discusso, la patogenesi della MC vede una complessa e varia combinazione di fattori genetici ed ambientali e difficilmente sarà possibile ottenere una guarigione completa senza apportare anche a modifiche sui fattori ambientali, come la dieta. L'alimentazione è uno degli elementi in grado di indurre delle modificazioni sulla composizione del microbiota intestinale: potrebbe avere quindi, indirettamente, un ruolo preventivo nello sviluppo di condizioni infiammatorie croniche intestinali. Ad ora, l'unico trattamento nutrizionale efficace nel modificare la flora intestinale e, quindi, il decorso clinico della malattia è la dieta liquida esclusiva.

Le nuove strategie terapeutiche dovranno avere in comune l'idea di curare la malattia con approcci nuovi, che non siano più basati solo sulla soppressione dei meccanismi infiammatori che, per quanto siano gli eventi responsabili dei sintomi, devono essere oggi considerati eventi secondari nell'eziopatogenesi della malattia.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Crohn, B.B., L. Ginzburg, and G.D. Oppenheimer, *Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. 1932*. Mt Sinai J Med, 2000. **67**(3): p. 263-8.
2. Baumgart, D.C. and W.J. Sandborn, *Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies*. Lancet, 2007. **369**(9573): p. 1641-57.
3. Abraham, C. and J.H. Cho, *Inflammatory bowel disease*. N Engl J Med, 2009. **361**(21): p. 2066-78.
4. Levine, A., et al., *Pediatric modification of the Montreal classification for inflammatory bowel disease: the Paris classification*. Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**(6): p. 1314-21.
5. Silverberg, M.S., et al., *Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology*. Can J Gastroenterol, 2005. **19 Suppl A**: p. 5A-36A.
6. Satsangi, J., et al., *The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications*. Gut, 2006. **55**(6): p. 749-53.
7. Gasche, C., et al., *A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998*. Inflamm Bowel Dis, 2000. **6**(1): p. 8-15.
8. Chandel, S., A. Prakash, and B. Medhi, *Current scenario in inflammatory bowel disease: drug development prospects*. Pharmacol Rep, 2015. **67**(2): p. 224-9.
9. Heuschkel, R.B., et al., *Enteral nutrition and corticosteroids in the treatment of acute Crohn's disease in children*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2000. **31**(1): p. 8-15.
10. Borrelli, O., et al., *Polymeric diet alone versus corticosteroids in the treatment of active pediatric Crohn's disease: a randomized controlled open-label trial*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2006. **4**(6): p. 744-53.
11. Ginsburg, P.M., T. Dassopoulos, and E.D. Ehrenpreis, *Thalidomide treatment for refractory Crohn's disease: a review of the history, pharmacological mechanisms and clinical literature*. Ann Med, 2001. **33**(8): p. 516-25.
12. Sewell, G.W., D.J. Marks, and A.W. Segal, *The immunopathogenesis of Crohn's disease: a three-stage model*. Curr Opin Immunol, 2009. **21**(5): p. 506-13.
13. Marks, D.J., et al., *Defective acute inflammation in Crohn's disease: a clinical investigation*. Lancet, 2006. **367**(9511): p. 668-78.
14. Ek, W.E., M. D'Amato, and J. Halfvarson, *The history of genetics in inflammatory bowel disease*. Ann Gastroenterol, 2014. **27**(4): p. 294-303.
15. Asakura, H., et al., *Association of the human lymphocyte-DR2 antigen with Japanese ulcerative colitis*. Gastroenterology, 1982. **82**(3): p. 413-8.
16. Ahmad, T., et al., *Review article: the genetics of inflammatory bowel disease*. Aliment Pharmacol Ther, 2001. **15**(6): p. 731-48.
17. Hugot, J.P., et al., *Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease*. Nature, 2001. **411**(6837): p. 599-603.
18. Jostins, L., et al., *Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease*. Nature, 2012. **491**(7422): p. 119-24.
19. Duerr, R.H., et al., *A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene*. Science, 2006. **314**(5804): p. 1461-3.
20. Saitoh, T., et al., *Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production*. Nature, 2008. **456**(7219): p. 264-8.
21. Hampe, J., et al., *A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1*. Nat Genet, 2007. **39**(2): p. 207-11.
22. Kuballa, P., et al., *Impaired autophagy of an intracellular pathogen induced by a Crohn's disease associated ATG16L1 variant*. PLoS One, 2008. **3**(10): p. e3391.
23. Deuring, J.J., et al., *Genomic ATG16L1 risk allele-restricted Paneth cell ER stress in quiescent Crohn's disease*. Gut, 2014. **63**(7): p. 1081-91.
24. Villani, A.C., et al., *Common variants in the NLRP3 region contribute to Crohn's disease susceptibility*. Nat Genet, 2009. **41**(1): p. 71-6.

25. Elinav, E., et al., *NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis*. Cell, 2011. **145**(5): p. 745-57.
26. Franchi, L., et al., *NLR4-driven production of IL-1beta discriminates between pathogenic and commensal bacteria and promotes host intestinal defense*. Nat Immunol, 2012. **13**(5): p. 449-56.
27. Ogura, Y., et al., *A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease*. Nature, 2001. **411**(6837): p. 603-6.
28. Hruz, P. and L. Eckmann, *Innate immune defence: NOD2 and autophagy in the pathogenesis of Crohn's disease*. Swiss Med Wkly, 2010. **140**: p. w13135.
29. Biswas, A., T. Petnicki-Ocwieja, and K.S. Kobayashi, *Nod2: a key regulator linking microbiota to intestinal mucosal immunity*. J Mol Med (Berl), 2012. **90**(1): p. 15-24.
30. Strober, W., et al., *Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(1): p. 9-20.
31. Cucchiara, S., et al., *Role of CARD15, DLG5 and OCTN genes polymorphisms in children with inflammatory bowel diseases*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(8): p. 1221-9.
32. Schreiber, S., et al., *Genetics of Crohn disease, an archetypal inflammatory barrier disease*. Nat Rev Genet, 2005. **6**(5): p. 376-88.
33. Bonen, D.K., et al., *Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan*. Gastroenterology, 2003. **124**(1): p. 140-6.
34. Hisamatsu, T., et al., *CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells*. Gastroenterology, 2003. **124**(4): p. 993-1000.
35. Duerr, R.H., et al., *High-density genome scan in Crohn disease shows confirmed linkage to chromosome 14q11-12*. Am J Hum Genet, 2000. **66**(6): p. 1857-62.
36. Hlavaty, T., et al., *Smoking, breastfeeding, physical inactivity, contact with animals, and size of the family influence the risk of inflammatory bowel disease: A Slovak case-control study*. United European Gastroenterol J, 2013. **1**(2): p. 109-19.
37. Mate Jimenez, J., J.M. Pajares Garcia, and M. Perez-Miranda, *[Epidemiology of inflammatory bowel disease: geographic distribution and environmental factors]*. Rev Esp Enferm Dig, 1994. **86**(1): p. 533-9.
38. Reif, S., et al., *Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease*. Gut, 1997. **40**(6): p. 754-60.
39. Lakatos, P.L., T. Szamosi, and L. Lakatos, *Smoking in inflammatory bowel diseases: good, bad or ugly?* World J Gastroenterol, 2007. **13**(46): p. 6134-9.
40. Cornish, J.A., et al., *The risk of oral contraceptives in the etiology of inflammatory bowel disease: a meta-analysis*. Am J Gastroenterol, 2008. **103**(9): p. 2394-400.
41. Cosnes, J., *Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2004. **18**(3): p. 481-96.
42. Sykes, A.P., et al., *An investigation into the effect and mechanisms of action of nicotine in inflammatory bowel disease*. Inflamm Res, 2000. **49**(7): p. 311-9.
43. Shoda, R., et al., *Epidemiologic analysis of Crohn disease in Japan: increased dietary intake of n-6 polyunsaturated fatty acids and animal protein relates to the increased incidence of Crohn disease in Japan*. Am J Clin Nutr, 1996. **63**(5): p. 741-5.
44. Cabre, E. and E. Domenech, *Impact of environmental and dietary factors on the course of inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 2012. **18**(29): p. 3814-22.
45. Liverani, E., et al., *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in the etiology of Crohn's disease, cause or epiphenomenon?* World J Gastroenterol, 2014. **20**(36): p. 13060-70.
46. Pierce, E.S., *Possible transmission of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis through potable water: lessons from an urban cluster of Crohn's disease*. Gut Pathog, 2009. **1**(1): p. 17.
47. Eltholth, M.M., et al., *Contamination of food products with Mycobacterium avium paratuberculosis: a systematic review*. J Appl Microbiol, 2009. **107**(4): p. 1061-71.
48. Chiodini, R.J., et al., *Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. I. An unclassified Mycobacterium species isolated from patients with Crohn's disease*. Dig Dis Sci, 1984. **29**(12): p. 1073-9.

49. Xia, A., et al., *Effect of inflammatory bowel disease therapies on immunogenicity of Mycobacterium paratuberculosis proteins*. Scand J Gastroenterol, 2014. **49**(2): p. 157-63.
50. Borody, T.J., et al., *Anti-mycobacterial therapy in Crohn's disease heals mucosa with longitudinal scars*. Dig Liver Dis, 2007. **39**(5): p. 438-44.
51. Darfeuille-Michaud, A., et al., *High prevalence of adherent-invasive Escherichia coli associated with ileal mucosa in Crohn's disease*. Gastroenterology, 2004. **127**(2): p. 412-21.
52. Liu, Y., et al., *Immunocytochemical evidence of Listeria, Escherichia coli, and Streptococcus antigens in Crohn's disease*. Gastroenterology, 1995. **108**(5): p. 1396-404.
53. Hooper, L.V. and A.J. Macpherson, *Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(3): p. 159-69.
54. Yu, L.C., et al., *Host-microbial interactions and regulation of intestinal epithelial barrier function: From physiology to pathology*. World J Gastrointest Pathophysiol, 2012. **3**(1): p. 27-43.
55. Grenham, S., et al., *Brain-gut-microbe communication in health and disease*. Front Physiol, 2011. **2**: p. 94.
56. Geremia, A., et al., *Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease*. Autoimmun Rev, 2014. **13**(1): p. 3-10.
57. Kawai, T. and S. Akira, *TLR signaling*. Cell Death Differ, 2006. **13**(5): p. 816-25.
58. Medzhitov, R., *Toll-like receptors and innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2001. **1**(2): p. 135-45.
59. Jin, M.S. and J.O. Lee, *Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes*. Immunity, 2008. **29**(2): p. 182-91.
60. Maeshima, N. and R.C. Fernandez, *Recognition of lipid A variants by the TLR4-MD-2 receptor complex*. Front Cell Infect Microbiol, 2013. **3**: p. 3.
61. Yamamoto, M., et al., *Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4*. Nature, 2002. **420**(6913): p. 324-9.
62. Franchi, L., et al., *Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense*. Immunol Rev, 2009. **227**(1): p. 106-28.
63. Kufer, T.A., D.J. Banks, and D.J. Philpott, *Innate immune sensing of microbes by Nod proteins*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1072**: p. 19-27.
64. Petnicki-Ocwieja, T., et al., *Nod2 is required for the regulation of commensal microbiota in the intestine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(37): p. 15813-8.
65. Cerf-Bensussan, N. and V. Gaboriau-Routhiau, *The immune system and the gut microbiota: friends or foes?* Nat Rev Immunol, 2010. **10**(10): p. 735-44.
66. Gentschew, L. and L.R. Ferguson, *Role of nutrition and microbiota in susceptibility to inflammatory bowel diseases*. Mol Nutr Food Res, 2012. **56**(4): p. 524-35.
67. Koboziev, I., et al., *Role of the enteric microbiota in intestinal homeostasis and inflammation*. Free Radic Biol Med, 2014. **68**: p. 122-33.
68. Manichanh, C., et al., *The gut microbiota in IBD*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2012. **9**(10): p. 599-608.
69. Wang, Z.K., et al., *Intestinal microbiota pathogenesis and fecal microbiota transplantation for inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(40): p. 14805-20.
70. Thibault, R., et al., *Butyrate utilization by the colonic mucosa in inflammatory bowel diseases: a transport deficiency*. Inflamm Bowel Dis, 2010. **16**(4): p. 684-95.
71. Swidsinski, A., et al., *Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(7): p. 3380-9.
72. Takada, H., et al., *Delayed separation of the umbilical cord in two siblings with Interleukin-1 receptor-associated kinase 4 deficiency: rapid screening by flow cytometer*. J Pediatr, 2006. **148**(4): p. 546-8.
73. Lakatos, P.L., et al., *Serum lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 are markers of disease activity in patients with Crohn's disease*. Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**(3): p. 767-77.
74. Pastor Rojo, O., et al., *Serum lipopolysaccharide-binding protein in endotoxemic patients with inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2007. **13**(3): p. 269-77.

75. Sambuy, Y., et al., *The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics*. Cell Biol Toxicol, 2005. **21**(1): p. 1-26.
76. Notarangelo, L.D. and A. Tommasini, *Defective and excessive immunities in pediatric diseases*. Curr Pharm Des, 2012. **18**(35): p. 5729-34.
77. Loganes, C., et al., *Altered pattern of tumor necrosis factor-alpha production in peripheral blood monocytes from Crohn's disease*. World J Gastroenterol, 2016. **22**(41): p. 9117-9126.
78. Edwards, L.A., et al., *Aberrant response to commensal Bacteroides thetaiotaomicron in Crohn's disease: an ex vivo human organ culture study*. Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**(5): p. 1201-8.
79. Loganes, C., et al., *Ex vivo response to mucosal bacteria and muramyl dipeptide in inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 2016. **22**(44): p. 9734-9743.
80. Sato, K., T. Chiba, and T. Ohkusa, *Serial changes of cytokines in active ulcerative colitis: effects of antibiotic combination therapy*. Hepatogastroenterology, 2009. **56**(93): p. 1016-21.
81. Mantzaris, G.J., et al., *A prospective randomized controlled trial of oral ciprofloxacin in acute ulcerative colitis*. Am J Gastroenterol, 1997. **92**(3): p. 454-6.
82. Ungaro, R., et al., *Antibiotics associated with increased risk of new-onset Crohn's disease but not ulcerative colitis: a meta-analysis*. Am J Gastroenterol, 2014. **109**(11): p. 1728-38.
83. Suzuki, M., T. Hisamatsu, and D.K. Podolsky, *Gamma interferon augments the intracellular pathway for lipopolysaccharide (LPS) recognition in human intestinal epithelial cells through coordinated up-regulation of LPS uptake and expression of the intracellular Toll-like receptor 4-MD-2 complex*. Infect Immun, 2003. **71**(6): p. 3503-11.
84. Sibartie, S., et al., *Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis (MAP) as a modifying factor in Crohn's disease*. Inflamm Bowel Dis, 2010. **16**(2): p. 296-304.

APPENDICI

Appendice 1. Caratteristiche cliniche e genotipi di *NOD2* nei pazienti con MICI (soggetti reclutati per lo studio 1)

Caratteristiche cliniche						Marker infiammatori			Genotipi di <i>NOD2</i>		
PAZIENTI	SESSO/ ETÀ	DIAGNOSI	ATTIVITÀ MALATTIA	INDICE ATTIVITÀ	TERAPIE	PCR	VES	CALPROTECTINA FECALE	C>T R702W	G>C G908R	InsC L1007Pfs*2
01	M/18	RCU	ATTIVA	15	5ASA, CS	0.47	14	769	NA	NA	NA
02	M/7	RCU	ATTIVA	20	-	0.82	47	1522	NA	NA	NA
03	F/18	MC	REMISSIVA	0	-	0.1	7	NA	C/C	G/G	InsC/-
04	M/19	MC	REMISSIVA	0	AZA	0.8	6	NA	T/T	G/G	-/-
05	M/6	MC	REMISSIVA	0	-	0.17	15	NA	C/C	G/G	-/-
06	F/13	MC	ATTIVA	10	ADA	0.71	66	NA	C/C	G/G	-/-
07	M/12	MC	REMISSIVA	0	5ASA	0.14	14	NA	C/T	G/G	InsC/-
08	F/0	RCU	ATTIVA	50	CS	0.68	10	1031	NA	NA	NA
09	M/20	MC	REMISSIVA	0	TAL	0.11	6	61	C/C	G/G	-/-
10	F/17	MC	REMISSIVA	10	TAL, CS	0.17	20	NA	NA	NA	NA
11	F/5	RCU	REMISSIVA	0	5ASA	0.24	15	32	NA	NA	NA
12	F/14	MC	REMISSIVA	5	IFX	0.02	15	NA	C/C	G/G	-/-
13	M/15	RCU	REMISSIVA	0	5ASA	0.07	22	NA	NA	NA	NA
14	M/10	MC	ATTIVA	27.5	-	5.01	33	8668	C/C	G/C	-/-
15	F/11	RCU	REMISSIVA	0	5ASA	0.01	9	238	NA	NA	NA
16	M/17	RCU	ATTIVA	15	5ASA	0.2	10	NA	NA	NA	NA
17	M/15	MC	REMISSIVA	0	-	0.06	18	25	C/C	G/G	-/-

Caratteristiche cliniche						Marker infiammatori			Genotipi di <i>NOD2</i>		
PAZIENTI	SESSO/ ETÀ	DIAGNOSI	ATTIVITÀ MALATTIA	INDICE ATTIVITÀ	TERAPIE	PCR	VES	CALPROTECTINA FECALE	C>T R702W	G>C G908R	InsC L1007Pfs*2
18	M/15	MC	ATTIVA	27.5	IFX	1.25	34	1681	C/C	G/C	InsC/-
19	M/19	RCU	REMISSIVA	5	CS, 5ASA	0.04	8	NA	NA	NA	NA
20	F/14	RCU	ATTIVA	40	IFX	1.15	31	NA	NA	NA	NA
21	F/14	RCU	ATTIVA	20	IFX	0.23	27	NA	NA	NA	NA
22	F/18	RCU	REMISSIVA	0	AZA, 5ASA	0.06	13	6,6	NA	NA	NA
23	M/17	RCU	ATTIVA	15	AZA	2.05	67	2061	NA	NA	NA
24	F/19	MC	REMISSIVA	0	IFX	0.41	11	NA	C/T	G/G	-/-
25	F/11	MC	ATTIVA	40	-	2.96	120	1372	C/C	G/C	-/-
26	M/16	MC	REMISSIVA	0	AZA	0.01	7	NA	C/C	G/G	-/-
27	M/15	MC	REMISSIVA	0	TAL, CS	NA	24	NA	NA	NA	NA
28	M/16	MC	ATTIVA	45	CS, 5ASA	4.9	75	NA	C/C	G/G	-/-
29	F/15	RCU	ATTIVA	40	CS,AZA, 5ASA	0.04	33	2120	NA	NA	NA
30	M/13	MC	REMISSIVA	2.5	ADA	0.1	27	NA	C/C	G/G	-/-
31	M/11	RCU	REMISSIVA	0	AZA, 5ASA	0.08	32	633	NA	NA	NA
32	M/12	MC	REMISSIVA	5	IFX, 5ASA	0.65	54	71	C/C	G/G	-/-
33	M/18	RCU	ATTIVA	37.5	CS, 5ASA	1.81	31	NA	NA	NA	NA
34	M/10	RCU	REMISSIVA	0	AZA, 5ASA	0.01	13	35	NA	NA	NA

Caratteristiche cliniche						Marker infiammatori			Genotipi di NOD2		
PAZIENTI	SESSO/ ETÀ	DIAGNOSI	ATTIVITÀ MALATTIA	INDICE ATTIVITÀ	TERAPIE	PCR	VES	CALPROTECTINA FECAL	C>T R702W	G>C G908R	InsC L1007Pfs*2
35	F/13	RCU	ATTIVA	NA	-	0.14	50	NA	NA	NA	NA
36	F/14	RCU	ATTIVA	5	AZA, 5ASA	0.26	94	33	NA	NA	NA
37	F/13	RCU	ATTIVA	45	-	1.49	58	1800	NA	NA	NA
38	M/2	RCU	ATTIVA	20	CS,AZA, 5ASA	0.02	15	286	NA	NA	NA
39	M/8	MC	ATTIVA	12.5	TAL	0.06	46	NA	C/C	G/G	-/-
40	F/16	MC	REMISSIVA	0	TAL	0.39	15	NA	C/C	G/G	-/-
41	M/16	RCU	REMISSIVA	0	TAL, 5ASA	0.61	9	116	NA	NA	NA
42	M/16	MC	ATTIVA	10	CS	1.21	18	1053	C/C	G/G	-/-
43	F/16	RCU	ATTIVA	15	TAL, 5ASA	0.31	49	2177	NA	NA	NA
44	F/17	MC	ATTIVA	27.5	IFX	0.21	44	NA	C/C	G/G	InsC/-
45	F/17	MC	REMISSIVA	2.5	IFX	0.4	35	NA	C/C	G/G	InsC/-
46	M/17	MC	REMISSIVA	2.5	AZA	0.2	23	NA	C/C	G/G	-/-
47	M/14	MC	REMISSIVA	5	-	0.09	14	67	C/C	G/C	InsC/-
48	M/9	RCU	REMISSIVA	0	5ASA	0.03	10	48	NA	NA	NA
49	M/11	MC	REMISSIVA	0	AZA	0.03	8	NA	C/C	G/G	-/-
50	F/4	RCU	REMISSIVA	0	CS, 5ASA	0.05	21	17	NA	NA	NA
51	F/14	RCU	ATTIVA	30	5ASA	0.51	27	15800	NA	NA	NA

Caratteristiche cliniche						Marker infiammatori			Genotipi di NOD2		
PAZIENTI	SESSO/ ETÀ	DIAGNOSI	ATTIVITÀ MALATTIA	INDICE ATTIVITÀ	TERAPIE	PCR	VES	CALPROTECTINA FCALE	C>T R702W	G>C G908R	InsC L1007Pfs*2
52	M/20	RCU	REMISSIVA	0	IFX	0.06	6	NA	NA	NA	NA
53	M/16	MC	REMISSIVA	2.5	AZA	2.1	21	366	C/C	G/G	InsC/-
54	M/11	MC	ATTIVA	25	IFX	1.0	37	1051	C/C	G/C	-/-
55	F/8	RCU	ATTIVA	0	5ASA	0.3	20	1402	NA	NA	NA
56	F/10	MC	ATTIVA	25	-	2.07	56	1863	C/C	G/G	-/-
57	M/13	RCU	ATTIVA	30	-	0.1	24	1660	NA	NA	NA
58	F/19	RCU	ATTIVA	10	5ASA	0.2	15	539	NA	NA	NA
59	M/2	MC	ATTIVA	NA	NA	NA	NA	NA	C/C	G/G	-/-
60	M/2	MC	REMISSIVA	NA	NA	NA	NA	NA	C/C	G/G	-/-
61	F/10	MC	ATTIVA	20	-	3.18	77	1477	C/C	G/G	-/-
62	F/10	MC	ATTIVA	17.5	IFX	0.19	31	NA	C/C	G/G	-/-
63	M/10	MC	ATTIVA	40	5ASA	1.39	91	980	C/C	G/G	InsC/-
64	F/11	RCU	REMISSIVA	0	AZA, 5ASA	NA	24	106	NA	NA	NA
65	F/3	MC	ATTIVA	35	-	0.85	70	919	C/C	G/G	-/-
66	M/14	RCU	ATTIVA	20	5ASA	0.02	22	3700	NA	NA	NA
67	M/12	MC	ATTIVA	7.5	-	0.19	41	807	C/C	G/G	-/-
68	M/12	MC	ATTIVA	2.5	IFX	0.07	23	NA	C/C	G/G	-/-

Caratteristiche cliniche						Marker infiammatori			Genotipi di <i>NOD2</i>		
PAZIENTI	SESSO/ ETÀ	DIAGNOSI	ATTIVITÀ MALATTIA	INDICE ATTIVITÀ	TERAPIE	PCR	VES	CALPROTECTINA FECALE	C>T R702W	G>C G908R	InsC L1007Pfs*2
69	M/17	MC	ATTIVA	5	AZA	0.17	6	277	C/C	G/G	-/-

MICI: Malattie Infiammatorie Croniche dell'Intestino; M: Maschio; F: Femmina; MC: Malattia di Crohn's; RCU: Rettocolite Ulcerosa; AZA: Azatioprina; ADA: Adalimumab; TAL: Talidomide; 5ASA: Mesalazina; IFX: Infliximab; CS: Corticosteroidi. ETÀ(anni); PCR (mg/dl), VES (mm/h); Calprotectina fecale (mg/Kg); NA=non analizzato.

Appendice 2. Caratteristiche cliniche dei pazienti con MICI (soggetti reclutati per lo studio 2)

Caratteristiche cliniche								Marker infiammatori		
PAZIENTI	SESSO/ ETÀ	DIAGNOSI	ETÀ ALLA DIAGNOSI	ATTIVITÀ MALATTIA	TERAPIE	PUCAI/ PCDAI	LOCALIZZAZIONE MALATTIA	PCR	VES	CALPROTECTINA FECALE
01	M/17	RCU	12	ATTIVA	AZA. 5-ASA	0	RCU TRATTO DISCENDENTE	0.06	9	-
02	M/7	RCU	6	ATTIVA	-	20	PANCOLITE	0.82	47	1522
03	M/17	RCU	17	ATTIVA	CIPX	45	RCU TRATTO DISCENDENTE	0.4	10	-
04	F/14	RCU	12	ATTIVA	5-ASA. CS	30	RCU TRATTO DISCENDENTE	0.3	44	-
05	M/17	RCU	13	ATTIVA	SSZ	25	PANCOLITE	2.05	67	2060
06	F/15	RCU	14	ATTIVA	CS. 5-ASA. AZA	40	RCU TRATTO DISCENDENTE	0.04	33	2120
07	F/11	RCU	2	ATTIVA	CS. 5-ASA. AZA	40	PANCOLITE	0.59	108	1648
08	F/14	RCU	9	ATTIVA	AZA	5	PANCOLITE	0.26	94	33
09	M/17	RCU	7	ATTIVA	AZA	5	PANCOLITE	0.03	4	-
10	F/12	RCU	7	ATTIVA	AZA 5-ASA	20	PROCTITE ULCERATIVA	0.02	12	1746
11	M/12	RCU	10	ATTIVA	5-ASA	20	PROCTITE ULCERATIVA	0.03	6	21

PAZIENTI	Caratteristiche cliniche							Marker infiammatori		
	SESSO/ ETÀ	DIAGNOSI	ETÀ ALLA DIAGNOSI	ATTIVITÀ MALATTIA	TERAPIE	PUCAI/ PCDAI	LOCALIZZAZIONE MALATTIA	PCR	VES	CALPROTECTINA FECALE
12	M/18	RCU	17	ATTIVA	5-ASA	65	RCU TRATTO DISCENDENTE	0.16	17	-
13	M/18	RCU	18	ATTIVA	5-ASA. MNZ	15	PANCOLITE	0.18	3	-
14	F/18	RCU	17	ATTIVA	-	30	RCU TRATTO DISCENDENTE	0.12	27	50
15	M/13	RCU	11	ATTIVA	-	30	PANCOLITE	0.19	31	1600
16	F/10	RCU	9	REMISSIVA	5-ASA	5	RCU TRATTO DISCENDENTE	0.01	4	602
17	F/14	RCU	12	REMISSIVA	CS. 5-ASA	0	RCU TRATTO DISCENDENTE	0.01	8	126
18	F/18	RCU	13	REMISSIVA	AZA. 5-ASA	0	PANCOLITE	0.06	13	-
19	M/17	RCU	11	REMISSIVA	5-ASA	0	PANCOLITE	0.11	10	124
20	M/10	RCU	6	REMISSIVA	AZA. 5-ASA	0	PANCOLITE	0.01	11	35
21	M/20	RCU	17	REMISSIVA	5-ASA. IFX	0	RCU TRATTO DISCENDENTE	0.06	6	-
22	F/24	RCU	13	REMISSIVA	CS. 5-ASA. AZA	0	PANCOLITE	0.02	6	-
23	M/13	MC	13	ATTIVA	-	15	MC PANENTERICA	3.1	92	1915

Caratteristiche cliniche								Marker infiammatori		
PAZIENTI	SESSO/ ETÀ	DIAGNOSI	ETÀ ALLA DIAGNOSI	ATTIVITÀ MALATTIA	TERAPIE	PUCAI/ PCDAI	LOCALIZZAZIONE MALATTIA	PCR	VES	CALPROTECTINA FECALE
24	F/11	MC	9	ATTIVA	ADA	15	MC PANENTERICA	0.08	11	1080
25	F/10	MC	9	ATTIVA	IFX	2.5	MC PANENTERICA	0.53	35	-
26	F/13	MC	9	ATTIVA	ADA	10	MC PANENTERICA	0.71	66	-
27	M/11	MC	9	ATTIVA	5-ASA	12.5	MC ILEO-COLICA	0.4	27	475
28	M/10	MC	10	ATTIVA	CIPX	27.5	MC PANENTERICA	5.01	33	8688
29	M/15	MC	14	ATTIVA	-	0	MC PANENTERICA	0.04	5	0
30	M/10	MC	10	ATTIVA	MNZ	35	MC ILEO-COLICA	2.88	51	2772
31	M/15	MC	12	ATTIVA	IFX	17.5	MC GASTRICA E ILEO-COLICA	2.64	38	1295
32	M/16	MC	12	ATTIVA	CS. SSZ	45	MC GASTRICA E ILEO-COLICA	4.9	75	-
33	F/11	MC	9	ATTIVA	-	32.5	MC PANENTERICA	2.96	120	1372
34	F/16	MC	11	ATTIVA	MTX. SSZ	40	MC ILEO-COLICA	0.2	46	55483
35	M/11	MC	5	ATTIVA	IFX	25	MC ILEO-COLICA	1.0	37	1050
36	F/10	MC	9	ATTIVA	-	25	MC GASTRICA E ILEO-COLICA	2.07	56	2079
37	F/11	MC	11	ATTIVA	CS	30	MC COLICA	5.76	88	2083
38	F/11	MC	11	ATTIVA	IFX. SSZ	0	MC COLICA	0.03	15	402

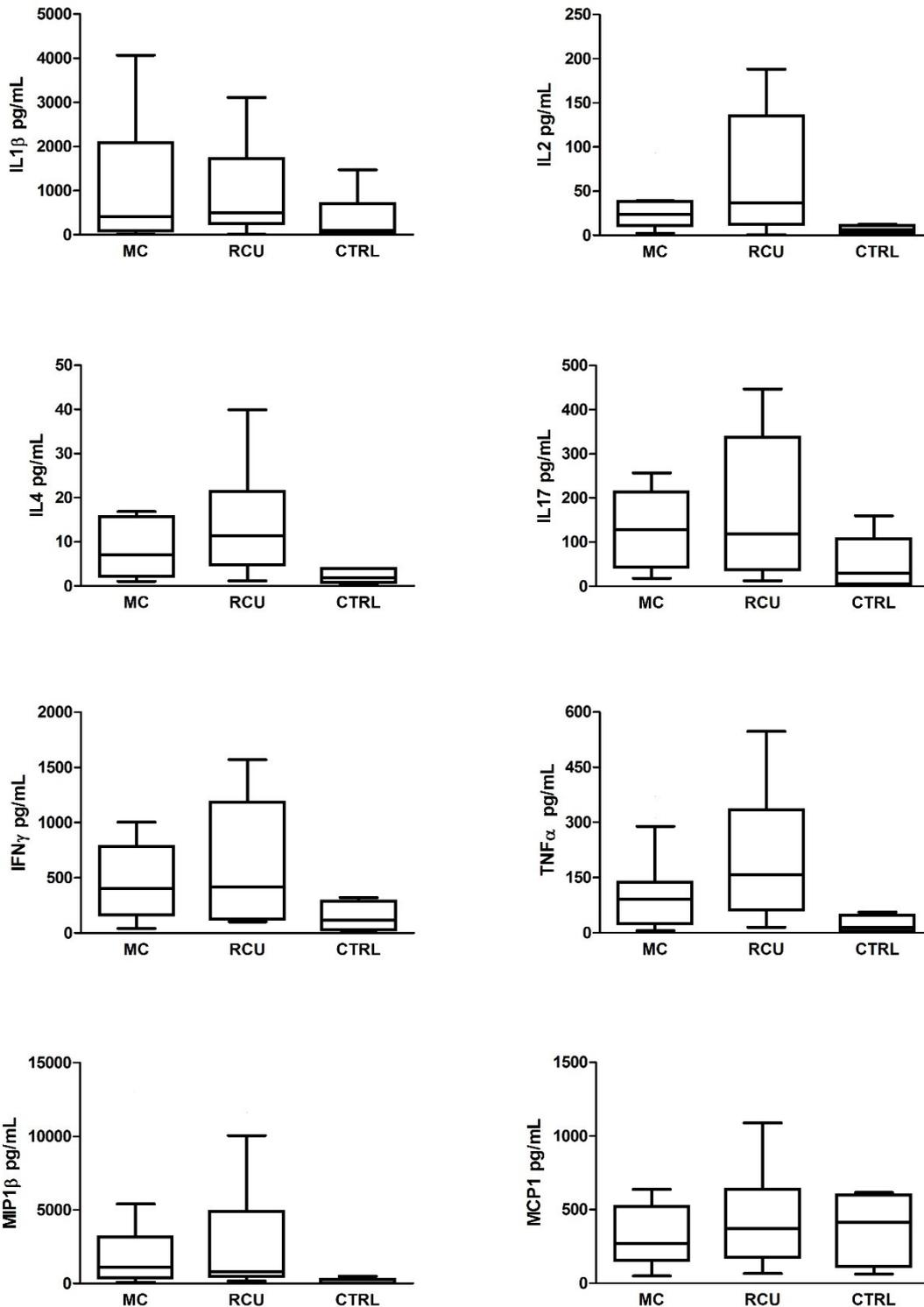
PAZIENTI	Caratteristiche cliniche							Marker infiammatori		
	SESSO/ ETÀ	DIAGNOSI	ETÀ ALLA DIAGNOSI	ATTIVITÀ MALATTIA	TERAPIE	PUCAI/ PCDAI	LOCALIZZAZIONE MALATTIA	PCR	VES	CALPROTECTINA FECALE
39	F/10	MC	10	ATTIVA	-	20	MC COLICA	3.18	77	1477
40	F/10	MC	9	ATTIVA	TAL. SSZ	30	MC GASTRICA E ILEO-COLICA	1.6	25	2175
41	M/6	MC	6	ATTIVA	-	20	COLITE IN CGD	3.12	88	28311
42	M/7	MC	6	ATTIVA	5-ASA	17.5	COLITE IN CGD	0.42	35	3305
43	M/7	MC	6	ATTIVA	MNZ	52.5	MC DIGIUNALE E ILEO-COLICA	1.04	98	648
44	M/12	MC	10	ATTIVA	MNZ	17.5	MC PANENTERICA	0.19	41	807
45	M/16	MC	16	ATTIVA	MNZ, CIPX	17.5	MC PANENTERICA	2.19	34	1087
46	M/18	MC	15	REMISSIVA	IFX	10	MC PANENTERICA	0.35	18	151
47	M/11	MC	6	REMISSIVA	AZA	0	MC ILEO-COLICA	0.03	8	-
48	M/7	MC	1	REMISSIVA	TAL	0	MC NASALE E COLICA	0.05	13	-
49	F/16	AFTOSI, GASTRITE AUTOIMM.	-	COLONS NORMALE	-	-	-	0.05	40	25
50	M/15	PRECEDENTI POLIPI INTESTINALI	-	COLONS NORMALE	-	-	-	0.14	5	-

PAZIENTI	SESSO/ ETÀ	Caratteristiche cliniche					Marker infiammatori			
		DIAGNOSI	ETÀ ALLA DIAGNOSI	ATTIVITÀ MALATTIA	TERAPIE	PUCAI/ PCDAI	LOCALIZZAZIONE MALATTIA	PCR	VES	CALPROTECTINA FECALE
51	M/10	POLIPOSI INTESTINALE GIOVANILE	-	POLIPI INTESTINALI	-	-	COLON	-	-	-
52	M/11	DOLORE ADDOMINALE FUNZIONALE	-	COLONS NORMALE	-	-	-	0.24	39	-
53	M/3	POLIPOSI INTESTINALE GIOVANILE	-	POLIPI INTESTINALI	-	-	COLON	0.03	21	-
54	F/11	INFEZIONE VIRALE	-	COLONS NORMALE	-	-	-	4.86	110	22
55	F/4	DOLORE ADDOMINALE FUNZIONALE	-	COLONS NORMALE	-	-	-	0.03	19	6.5
56	F/10	DOLORE ADDOMINALE FUNZIONALE	-	COLONS NORMALE	-	-	-	0.09	8	-

M: Maschio; F: Femmina; MC: Malattia di Crohn's; RCU: Rettocolite ulcerosa; AZA: azatioprina; ADA: Adalimumab; TAL: Talidomide; 5-ASA: mesalazina; IFX: Infliximab; CS: corticosteroidi; CIPX: ciprofloxacina; SSZ: sulfasalazina; MZN: metronidazolo; COLONS: Colonscopia.
Età (anni); PCR (mg/dl), VES (mm/h); Calprotectina fecale (mg/Kg)

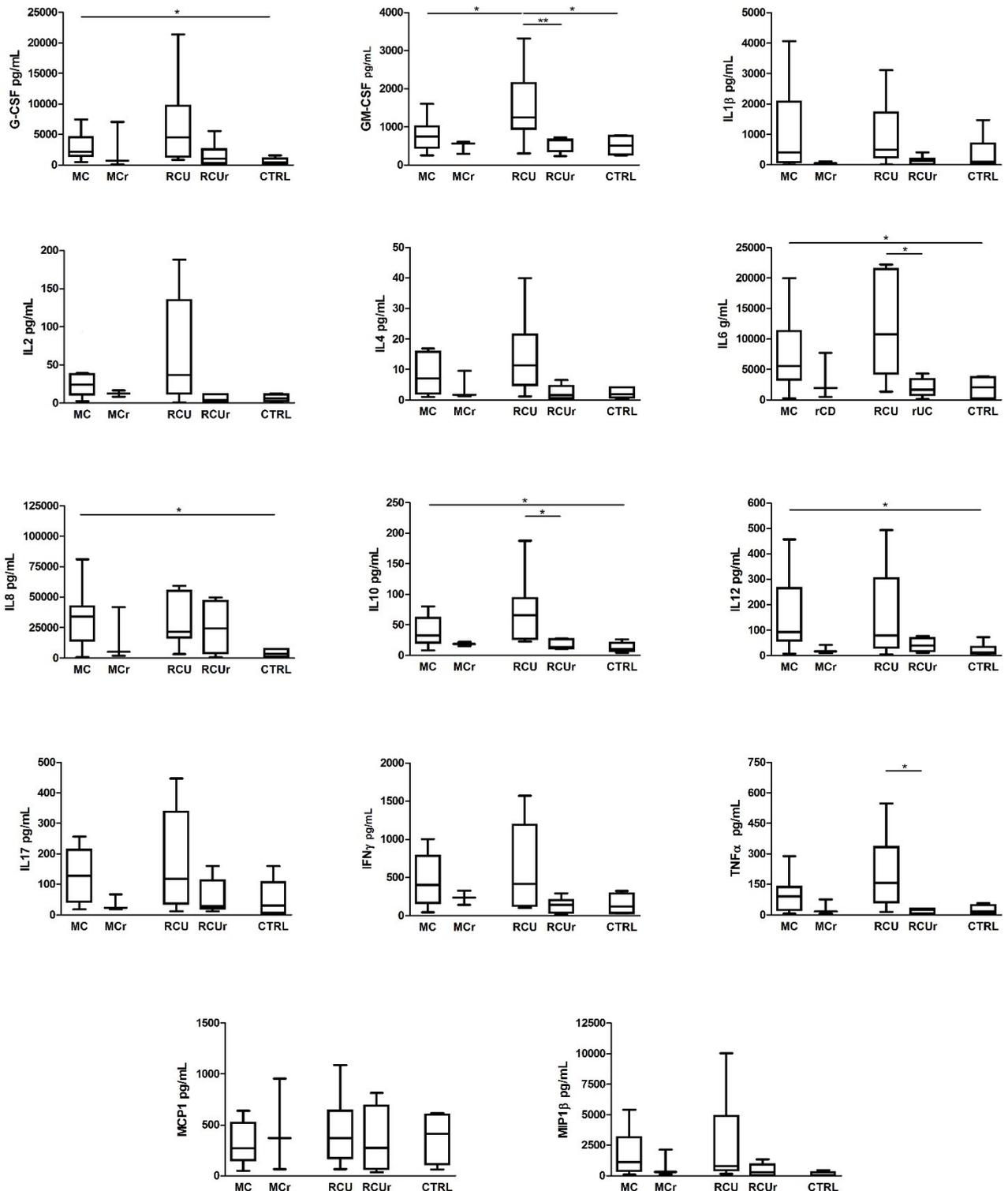
Appendice 3.

Livelli di secrezione citochinica da coltura di biopsie coliche derivate da pazienti affetti da malattia di Crohn's attiva (MC), da rettocolite ulcerosa attiva (RCU) e da soggetti sani (CTRL), in condizione basale (BM). Nessuna significatività statistica riscontrata.



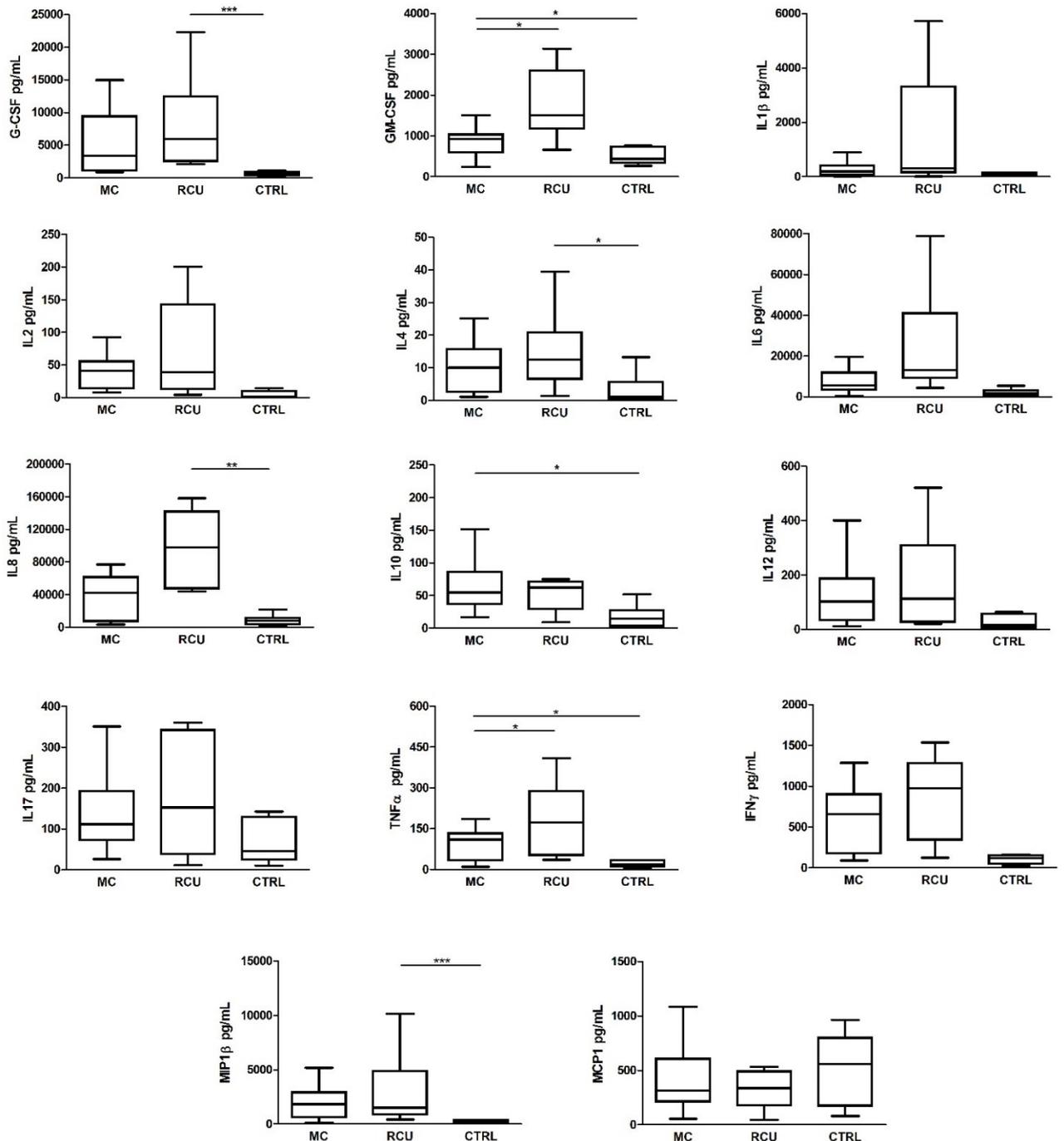
Appendice 4.

Livelli di secrezione citochinica da coltura di biopsie coliche derivate da pazienti affetti da malattia di Crohn's attiva o remission (MC o MCr), da rettocolite ulcerosa attiva o remission (RCU o RCUr) e da soggetti sani (CTRL), in condizione basale (BM). Significatività statistica: *= p<0.05; **=p<0.01.



Appendice 5.

Livelli di secrezione citochinica da coltura di biopsie coliche derivate da pazienti affetti da malattia di Crohn's attiva (MC), da rettocolite ulcerosa attiva (RCU) e da soggetti sani (CTRL), in presenza di antibiotici (PS). Significatività statistica: *= p<0.05; **=p<0.01; ***=p<0.001.



Appendice 6. Valori citochinici in assenza di antibiotici, con o senza l'aggiunta di MDP

	MC		RCU		CTRL	
	-MDP	+MDP	-MDP	+MDP	-MDP	+MDP
G-CSF	2192 (3745±3282)	2580 (6738±10109)	4536 (7301±7694)	7525 (9804±8562)	436 (645.8±572.4)	385.5 (364.2±220.4)
GM-CSF	748.1 (883.4±712.1)	775 (1217±1247)	1247 (1549±867.3)	1717 (1715±759.7)	504.4 (495.8±215)	393.2 (505.9±206.1)
IFN γ	402.7 (510.5±434.3)	377.6 (526.8±427.4)	414.6 (620.6±525.3)	1121 (909.7±479.1)	115.4 (144.6±139.2)	72.89 (122.8±107.5)
IL1 β	408.8 (1275±1535)	215.8 (843.6±1238)	502.8 (1627±2835)	498.3 (1741±2217)	97.27 (377.9±536.2)	126.8 (235.5±335.5)
IL2	23.69 (33.92±32.62)	22.82 (35.17±37.17)	36.64 (65.21±66.51)	86.3 (85.65±60.97)	6.405 (6.74±4.601)	1.875 (2.508±2.258)
IL4	7.08 (10.25±12.55)	7.76 (10.34±9.249)	11.41 (14.07±11.09)	15.42 (18.61±13.08)	1.93 (3.267±3.687)	1.02 (2.917±2.898)
IL6	5512 (8428±8573)	5774 (11007±14697)	10788 (20660±28559)	17345 (28516±31326)	2015 (1775±1576)	793.2 (1096±848.6)
IL8	34163 (35988±26282)	19170 (44152±48640)	21678 (37553±33836)	73990 (81093±63573)	3408 (8853±14711)	5080 (6931±6421)
IL10	32.44 (62.44±75)	46.69 (69.82±73.54)	65.98 (68.16±48.2)	57.28 (63.06±29.97)	10.57 (12.81±8.041)	12.36 (14.09±6.162)
IL12	92.17 (155.8±140.5)	94.54 (141.3±143.8)	78.12 (161.9±169.6)	97.51 (221.1±223.7)	11.98 (21.91±24.42)	20.35 (23.26±23.46)
IL17	128 (134.3±82.9)	104.8 (131.3±96.54)	118.2 (175.4±159.7)	234.1 (204.8±157)	30.21 (59.22±60.62)	47 (53.88±53.89)
MCP1	268.9 (645.9±1333)	268.1 (308.8±195.3)	370.7 (435.6±323)	408.5 (572.4±498.1)	412.4 (370.9±238.5)	273.7 (439.1±479.9)
MIP1 β	1121 (2564±3640)	2864 (2519±2220)	797.1 (3139±3655)	2081 (3531±3241)	59.58 (131.4±194.5)	80.83 (155.1±165.6)
TNF α	90.83 (135.7±163.6)	72.83 (91.8±82.98)	158 (184±161.7)	170.9 (182.2±109.5)	15.03 (21.79±21.48)	27.27 (21.66±14.89)

I valori (pg/ml) sono espressi come mediana (media±dv.st.). MC: Malattia di Crohn's; RCU: Rettocolite ulcerosa; CTRL: Controlli; MDP: Muramil dipeptide

Appendice 7. Valori citochinici in presenza di antibiotici, con o senza l'aggiunta di MDP

	MC		RCU		CTRL	
	-MDP	+MDP	-MDP	+MDP	-MDP	+MDP
G-CSF	3377 (6330±7510)	2407 (3133±2371)	5954 (10270±12725)	8187 (9128±8209)	675.3 (642.9±354.8)	1224 (1199±1080)
GM-CSF	927.1 (921.3±489.6)	853.1 (1186±1804)	1515 (1788±853.7)	1457 (1615±933.3)	436.7 (519±202.1)	526.1 (550.5±258.6)
IFN γ	660.3 (599.3±399.4)	365.6 (434.6±294)	977.2 (835.3±521.5)	452.8 (645.9±509.6)	123 (108.9±56.97)	161.3 (162.1±85)
IL1 β	199.2 (373.2±567.8)	363.2 (759.3±947.7)	308.5 (1475±2023)	478.1 (1606±2436)	89.52 (136±154.5)	53.66 (87.21±112)
IL2	41.21 (40.66±27.39)	21.05 (27.43±27.43)	39.33 (75.02±74.49)	59.79 (76.39±66.97)	1.18 (4.608±6.054)	9.56 (10.25±4.785)
IL4	10.02 (11.25±9.659)	7.64 (9.761±10.29)	12.51 (14.41±11.08)	11.1 (13.55±10.45)	1.13 (3.491±4.66)	1.13 (3.818±6.83)
IL6	5550 (9737±11609)	5576 (9543±11874)	13072 (24974±26737)	14588 (22221±22516)	1704 (2144±1789)	2610 (2934±3254)
IL8	42294 (36328±27994)	46697 (57161±67755)	98115 (95571±48577)	23748 (63080±95386)	8075 (8773±6897)	7501 (19984±28397)
IL10	54.94 (68.84±45.13)	28.17 (85.95±209.8)	62.33 (61.6±48.43)	58.75 (75.9±60.62)	14.55 (17.88±18.22)	25.55 (27.85±18.57)
IL12	102.4 (129.1±111.6)	80.86 (133.3±123)	112.5 (179.3±175.2)	119.2 (146.5±123.5)	14.94 (26.19±25.67)	18.92 (28.33±29.12)
IL17	111.7 (138.2±86.12)	103.7 (140.6±108.2)	152.9 (174.5±146.2)	134.6 (177.8±129.1)	46.3 (66.64±54.21)	44.29 (67.46±72.89)
MCP1	314.8 (394.6±265.4)	254 (848.3±2575)	337.3 (360±264.3)	235.1 (678.1±1112)	560.2 (519±333.5)	608.9 (1228±1730)
MIP1 β	1844 (1965±1521)	2723 (3683±3561)	1502 (3167±3530)	3570 (4325±3739)	195.5 (218.4±175.7)	273.2 (408.3±429.1)
TNF α	110.1 (92.81±57.47)	64.84 (98.78±110.3)	173.7 (183.3±135.9)	165.9 (188.6±161.3)	19.89 (27.02±26.79)	16.73 (25.36±31.78)

I valori (pg/ml) sono espressi come mediana (media±dv.st.). MC: Malattia di Crohn's; RCU: Rettocolite ulcerosa; CTRL: Controlli; MDP: Muramil dipeptide.