

UNIVERSITA' DEGLI STUDI

DI NAPOLI FEDERICO II

FACOLTA' DI SCIENZE MM.FF.NN.

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA

APPLICATA

XXVIII° CICLO

***"MALATTIE INFIAMMATORIE INTESTINALI: VALUTAZIONE
DEL RUOLO DEI COMPARTIMENTI INTESTINALI NELLA
RISPOSTA IMMUNO MUCOSALE NELLA MALATTIA
CELIACA, ANALISI MEDIANTE LASER CAPTURE
MICRODISSECTION. STUDIO DEL RUOLO DI CEPPI AIEC
NELL'EZIOPATOGENESI DEL MORBO DI CROHN "***

TUTOR

Ch.mo Prof. EZIO RICCA

CO-TUTOR

Dott. GIUSEPPE MAZZARELLA

ISA-CNR (AV)

DOTTORANDA

Dott.ssa MARANO ANGELA

Indice

PARTE I

1. INTRODUZIONE.....	3
1.1. LA MALATTIA CELIACA: QUADRO CLINICO E FORME.....	4
1.2. IL GLUTINE E LE PROTEINE IMMUNOGENICHE.....	10
1.3. GENETICA DELLA MC.....	14
1.4. PATOGENESI DELLA MC.....	19
<i>1.4.1. Risposta Immune Mucosale.....</i>	<i>19</i>
<i>1.4.2. Risposta Adattativa.....</i>	<i>20</i>
<i>1.4.3. Risposta Innata.....</i>	<i>21</i>
<i>1.4.4. Il Meccanismo Del Danno.....</i>	<i>24</i>
1.5. LE CITOCHINE.....	27
<i>1.5.1. Le Citochine Infiammatorie nella MC.....</i>	<i>27</i>
<i>1.5.2. Le Citochine Antinfiammatorie nella MC.....</i>	<i>31</i>
<i>1.5.3. La Microdissezione Laser: un approccio innovativo.....</i>	<i>35</i>
1.6. SCOPO PARTE I.....	41
2. MATERIALI E METODI.....	42
2.1. PAZIENTI.....	42
2.2. ANALISI DELLE SEQUENZE NUCLEOTIDICHE E	

SCELTA DEI PRIMERS.....	43
2.3. PREPARAZIONE STRUMENTAZIONE E CAMPIONI PER LCM.....	45
2.4. MICRODISSEZIONE LASER.....	47
2.5. ESTRAZIONE DELL’RNA.....	49
2.6. ANALISI RT-PCR.....	50
2.7. PROFILI DI ESPRESSIONE DIFFERENZIALE.....	54
2.8. ANALISI STATISTICA DEI DATI.....	56
3. RISULTATI.....	58
3.1. OTTIMIZZAZIONE PROTOCOLLO LCM.....	58
3.2. OTTIMIZZAZIONE PROTOCOLLI RT-PCR.....	60
3.3. AUMENTATA ESPRESSIONE DI CITOCHINE DELL' IMMUNITA' INNATA NEL COMPARTIMENTO EPITELIALE DELLA MUCOSA INTESTINALE DI CELIACI.....	63
3.4. AUMENTATA ESPRESSIONE DI CITOCHINE DELL' IMMUNITA' ADATTATIVA NEL COMPARTIMENTO DELLA LP DELLA MUCOSA INTESTINALE DI CELIACI.....	66
3.5. AUMENTATA ESPRESSIONE DI CITOCHINE IMMUNOREGOLATORIE NEI COMPARTIMENTI MUCOSALI: EPITELIO E LP, DI CELIACI.....	69
4. DISCUSSIONE.....	71

5. CONCLUSIONI.....	78
6. PROSPETTIVE FUTURE.....	79
7. BIBLIOGRAFIA PARTE I.....	81

PARTE II

1. INTRODUZIONE.....	88
1.1. EPIDEMIOLOGIA.....	90
1.2. EZIOLOGIA.....	93
1.3. QUADRO CLINICO.....	97
1.4. DIAGNOSI.....	107
1.5. TERAPIA MEDICA.....	110
1.6. RUOLO DELLE DISBIOSI NEL MORBO DI CROHN.....	114
1.7. ESCHERICHIA COLI AIEC E CROHN.....	116
1.8. SCOPO PARTE II.....	123
2. MATERIALI E METODI.....	124
2.1. PAZIENTI.....	124
2.2. COLTURE BATTERICHE.....	124
2.3. COLTURA D'ORGANO.....	126
2.4. IMMUNOISTOCHEMICA.....	128
2.5. IMMUNOFLUORESCENZA.....	129
2.6. ANALISI IMMUNOMORFOMETRICA.....	129

2.7. COLTURA CELLULARE.....	130
2.8. SAGGI DI INVASIONE.....	131
2.9. CITOMETRIA A FLUSSO PER IL RILEVAMENTO DEL CICLO CELLULARE.....	132
2.10. RT - PCR.....	133
2.11. ANALISI STATISTICHE.....	138
3. RISULTATI.....	140
3.1. AUMENTATA ESPRESSIONE DI CEACAM6, LAMP1, HLA- DR E ICAM1 IN PRESENZA DEI CEPPI AIEC.....	140
3.2. LIVELLI DI ESPRESSIONE DI TNF- α , IFN- γ E IL-8.....	146
3.3. BLOCCO IN FASE S DELLE CELLULE Caco2 INFETTATE DAI CEPPI AIEC.....	147
3.4. L' INFEZIONE CON CEPPI AIEC INDUCE GRAVI DANNI AL DNA DELLE CELLULE INFETTATE.....	149
3.5. LIVELLI DI ESPRESSIONE DEI GENI MGMT E DNMT1..	150
4. DISCUSSIONE.....	152
5. CONCLUSIONI.....	156
6. PROSPETTIVE FUTURE.....	157
7. BIBLIOGRAFIA PARTE II.....	158

PREMESSA

Durante il percorso di dottorato è stato preso in esame il ruolo della risposta immunitaria nell'eziopatogenesi di due patologie infiammatorie intestinali: la malattia celiaca (MC) ed il morbo di Crohn (Crohn's Disease, CD). Il progetto è stato suddiviso in due parti: nella prima fase si è analizzato il ruolo dei compartimenti mucosali nella risposta immunitaria al glutine, mediante l'utilizzo di una tecnica innovativa, la microdissezione laser. Nella seconda fase si è cercato di chiarire il ruolo di ceppi patogeni AIEC di E. Coli nell'eziopatogenesi del morbo di Crohn e della risposta immunitaria ed infiammatoria che si instaura nella mucosa intestinale dei pazienti affetti dalla malattia, mediante la tecnica della coltura d'organo.

PARTE I

***VALUTAZIONE DEL RUOLO DEI
COMPARTIMENTI INTESTINALI
NELLA RISPOSTA IMMUNO
MUCOSALE NELLA MALATTIA
CELIACA, ANALISI MEDIANTE
LASER CAPTURE
MICRODISSECTION.***

1. INTRODUZIONE

La malattia celiaca (MC), o enteropatia glutine-sensibile, è un' intolleranza permanente alle gliadine del grano ed alle prolammine corrispondenti di altri cereali, quali orzo e segale⁽¹⁾. Essa è responsabile nei soggetti geneticamente suscettibili del grave danno della mucosa intestinale. Secondo dati recentemente presentati all'Associazione Italiana Celiachia, in Italia l'incidenza di questa intolleranza è stimata in un soggetto ogni 100/150 persone⁽²⁾. I celiaci potenzialmente sarebbero quindi 400.000, ma ne sono stati diagnosticati intorno agli 85.000. Ogni anno vengono effettuate 5.000 nuove diagnosi e nascono 2.800 celiaci, con un incremento annuo di circa il 10%. Si stima che, su circa 380.000 pazienti affetti da malattia celiaca, l'85% dei pazienti è affetto da malattia celiaca asintomatica non diagnosticata, mentre il 15% soffre di una malattia celiaca sintomatica e quindi conclamata. Di questi ultimi solo il 60% ha già ricevuto specifica diagnosi. Ne consegue che la celiachia, pur essendo una malattia nota da molti anni, solo in tempi recenti viene riconosciuta come un problema piuttosto comune e, quindi, riceve una maggiore attenzione anche da parte dei produttori di alimenti e dei ristoratori.

Un aspetto della malattia celiaca da non sottovalutare è quello psicologico del paziente affetto. Questi, infatti, soprattutto a causa della necessità di seguire una dieta priva di glutine, sente profondamente la propria disabilità e spesso si sente emarginato. Tale disagio è particolarmente vivo tra gli adolescenti nei quali si va costruendo il senso di identità attraverso la consapevolezza delle proprie caratteristiche psico-fisiche ed il confronto con gli altri.

1.1. LA MALATTIA CELIACA: QUADRO CLINICO E FORME

In una persona affetta da celiachia il glutine provoca un' intensa reazione immunitaria nell'intestino tenue risultante in un' atrofia della mucosa intestinale con conseguente perdita della capacità di assorbire i nutrienti⁽³⁾. Queste lesioni colpiscono inizialmente il duodeno ed il digiuno prossimale per poi diffondersi distalmente verso l'ileo (Fig. 1.1). Ciò comporta la riduzione della superficie utile all'assorbimento dei nutrienti presenti nel lume intestinale e si instaura quindi una condizione di malassorbimento. Questo malassorbimento sarà tanto più grave quanto più estese sono le lesioni lungo l'intestino tenue.

La MC in fase florida è caratterizzata da una complessa lesione morfologica digiunale con:

1. atrofia parziale o totale dei villi;
2. allungamento delle cripte;
3. aumentato indice mitotico nelle cripte;
4. aumento del numero dei linfociti intraepiteliali (IELs);
5. infiltrazione di plasmacellule, linfociti e mastcellule nella lamina propria;
6. anomalie morfologiche dell'epitelio, che perde il suo aspetto cilindrico e appare cuboide.

Tuttavia queste lesioni non sono peculiari della MC e possono essere riscontrate in altre enteropatie, quali l'ipersensibilità ad altre proteine alimentari o le gravi infestazioni da *Giardia Lamblia*, in corso di colonizzazione batterica dell'intestino tenue. E' pertanto assolutamente indispensabile verificarne la glutine-dipendenza, cioè la remissione dopo eliminazione del glutine dalla dieta (Fig. 1.2).

Le manifestazioni cliniche della malattia celiaca sono molteplici; l'evoluzione delle conoscenze scientifiche avvenuta in questi ultimi anni ha permesso di inquadrare in maniera più completa la celiachia in tutti i suoi aspetti, anche se l'estrema eterogenicità delle diverse forme cliniche (quadri atipici o silenti) può rendere difficile o, comunque,

tardiva la diagnosi. Le conoscenze attuali permettono di riconoscere diverse forme cliniche di celiachia⁽⁴⁾:

1. FORMA TIPICA
2. FORMA ATIPICA
3. FORMA SILENTE
4. FORMA LATENTE

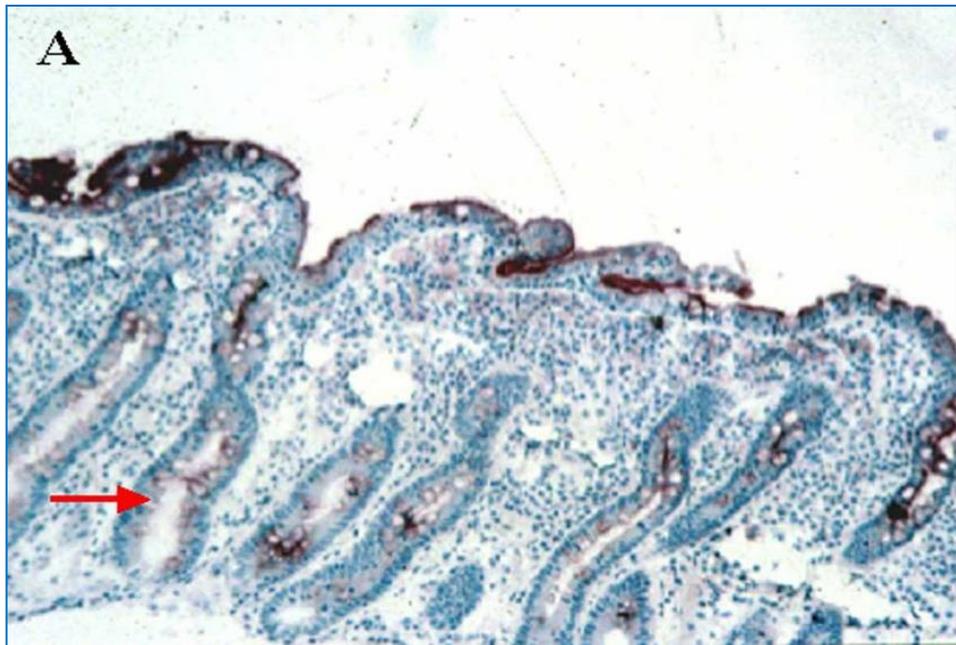


Fig. 1.1 - Mucosa di un paziente celiaco che si presenta atrofica (scomparsa dei villi), con cripte ipertrofiche (freccia rossa).

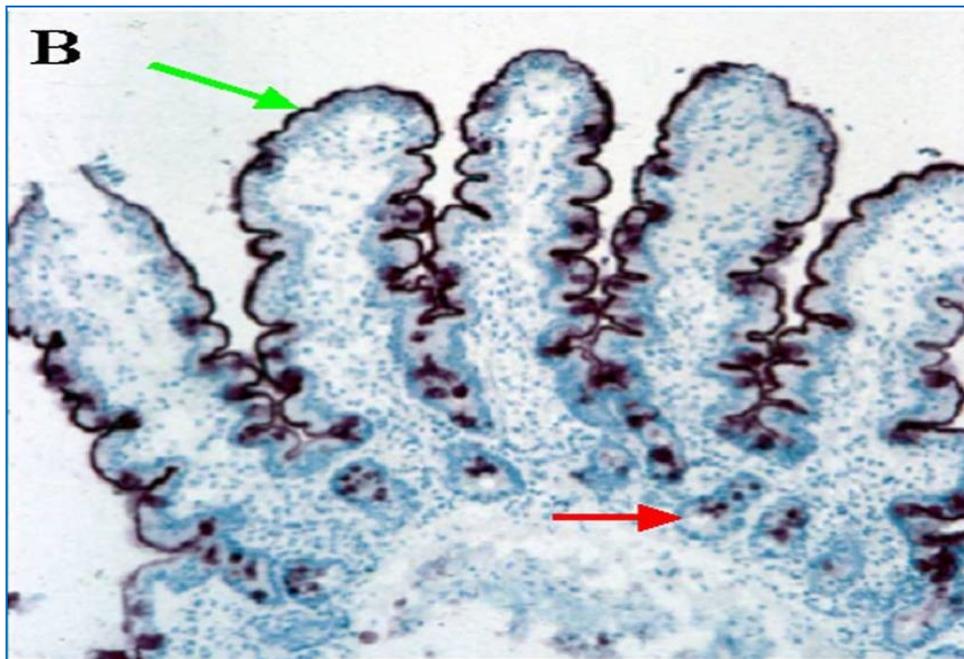


Fig. 1.2 - Mucosa intestinale di un individuo normale o di un celiaco a dieta senza glutine (in remissione), caratterizzata da villi intestinali ben sviluppati (freccia verde) e da piccole cripte (freccia rossa).

MALATTIA CELIACA TIPICA

Il sintomo che caratterizza l'esordio della forma tipica è la diarrea. Può essere acuta oppure cronica con inizio insidioso; le feci sono abbondanti, maleodoranti, lucide, chiare, ricche di acqua; le evacuazioni sono spesso numerose anche se talora può verificarsi una sola evacuazione giornaliera abbondante. Raramente, ed in totale contrasto con l'esordio più comune, il sintomo principale può essere una stipsi ostinata. In alcuni casi la diarrea può assumere particolare gravità con disidratazione e shock (crisi celiaca). A questi sintomi possono associarsi anoressia, dolori addominali, vomito, arresto della

crescita e calo ponderale; l'addome si presenta espanso, globoso e contrasta con la magrezza degli arti inferiori e dei glutei; talora sono presenti edemi agli arti inferiori ed alle palpebre e spesso vi sono alterazioni dell'umore e del carattere con irritabilità o addirittura apatia, che può in certi casi simulare un atteggiamento autistico. Tale quadro è attualmente sempre meno frequente perché grazie a test sierologici semplici ed affidabili ed all'evoluzione delle conoscenze scientifiche, la diagnosi di celiachia è sempre più precoce.

MALATTIA CELIACA ATIPICA

Nella forma atipica si ha una prevalenza dei sintomi extraintestinali, con assenza di diarrea; le manifestazioni cliniche sono secondarie al malassorbimento e comprendono: bassa statura, anemia da carenza di ferro o di acido folico, non rispondenti alla terapia orale, rachitismo, osteoporosi, displasia dello smalto dentario, che può variare da alterazioni cromatiche a presenza di solchi e picchiettature fino alla perdita totale dello smalto. Altri sintomi della forma atipica sono rappresentati da: dolori addominali ricorrenti, aftosi recidivante, ritardo puberale, stipsi, ipertransaminasemia idiopatica, sindromi emorragiche, alopecia.

MALATTIA CELIACA SILENTE

E' caratterizzata dalla presenza di lesioni della mucosa intestinale tipiche della celiachia in assenza di sintomatologia, che regrediscono dopo dieta priva di glutine. L'esistenza di queste forme clinicamente silenti è stata dimostrata dallo screening dei familiari di 1° grado asintomatici di pazienti celiaci e da studi di screening su studenti.

Circa il 10-15% dei parenti di primo grado asintomatici di soggetti celiaci presenta una mucosa intestinale atrofica.

MALATTIA CELIACA LATENTE

Per MC latente si vuole indicare una variante clinica in cui la malattia esiste ma non si è ancora manifestata. Si tratta di soggetti che al momento della diagnosi presentano una mucosa intestinale normale in presenza di marcatori anticorpali positivi. Questi pazienti non vengono sottoposti ad un regime dietetico privo di glutine, ma è opportuno controllarli nel tempo per poter cogliere i segni della malattia alla prima insorgenza ed avviare il trattamento prima della comparsa di complicazioni, che potrebbero essere la prima manifestazione clinica della celiachia.

Alcuni studi hanno evidenziato in questi soggetti caratteristiche sieriche ed immunologiche (presenza di AGA ed EMA nel siero,

incremento del numero dei linfociti intraepiteliali, con recettori, aumento delle cellule CD25+ della lamina propria) e genetiche (fenotipo HLADQA1*0501 e DQB1*0201) tipiche della celiachia. I pazienti con malattia celiaca latente a distanza di tempo presenteranno un'atrofia della mucosa intestinale, che regredisce dopo dieta priva di glutine⁽⁵⁻⁸⁾.

Accanto a queste forme esiste, poi, una forma potenziale, in cui si ha l'assenza di sintomatologia e di lesioni istologiche, che caratterizza i pazienti che appartengono a categorie a rischio per malattia (es. parenti di primo grado di celiaci)⁽⁸⁾.

1.2. IL GLUTINE E LE PROTEINE IMMUNOGENICHE

Il glutine è una sostanza lipoproteica che si ritrova nell'endosperma delle cariossidi di cereali quali frumento, farro, segale, kamut e orzo che, per tale motivo, sono ritenuti tossici per i celiaci. Tra questi cereali, probabilmente il più conosciuto ed il più utilizzato in cucina è il grano (noto anche come frumento). Il grano, infatti, è un componente alimentare divenuto basilare nella dieta di molte popolazioni e contiene diverse proteine, distinte in albumine, globuline e prolamine. Queste ultime vanno a costituire la parte

proteica del glutine, che a sua volta rappresenta la riserva proteica del grano. Le prolammine si distinguono in gliadine e glutenine (Fig. 1.3) in base alla loro differente solubilità in soluzioni alcoliche. Le glutenine, infatti, sono aggregati polimerici ad alto peso molecolare costituiti da proteine legate attraverso ponti disolfuro intermolecolari e sono insolubili in alcool, mentre le gliadine rappresentano la frazione alcool-solubile del glutine e sono costituite da proteine monomeriche che vengono classificate, sulla base delle loro mobilità elettroforetiche a pH acido, in 4 frazioni: alfa-, beta-, gamma- ed omega-⁽¹⁰⁾.

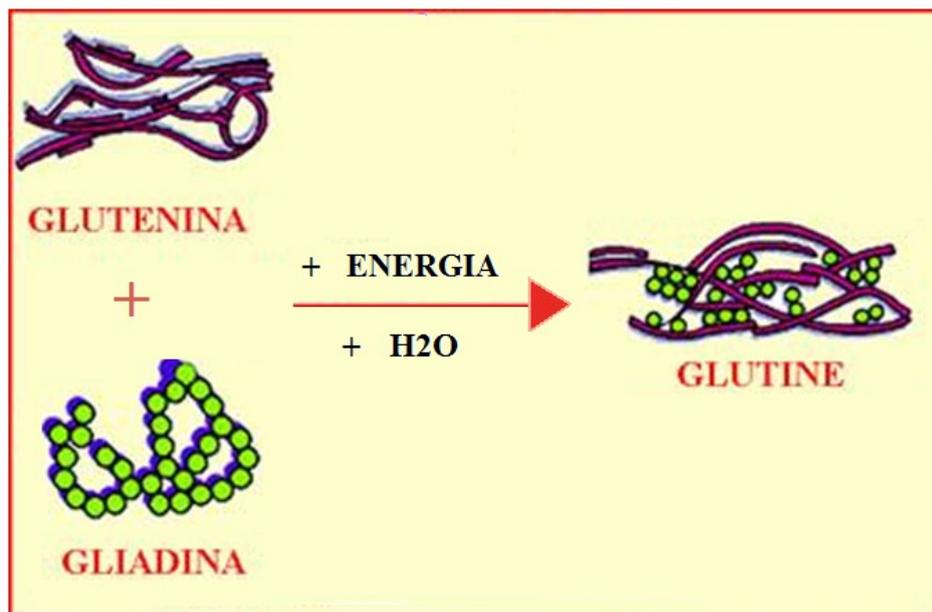


Fig. 1.3 - Le proteine del glutine.

La frazione gliadinica del glutine è costituita da circa 30 componenti, estremamente conservati e difficilmente separabili con le correnti metodiche biochimiche. Una loro caratteristica peculiare è la

composizione amminoacidica, costituita per circa il 60% da residui di glutammina e prolina con un 40% di residui di glutammina e 15-20% di prolina. Poiché l'omega-gliadina, la frazione meno tossica, ha il più alto contenuto di glutammina e prolina, la ricchezza di questi amminoacidi non sembra correlarsi con la lesività dell'intera molecola⁽⁹⁾. Le gliadine rappresentano la frazione del glutine responsabile della tossicità nel celiaco⁽¹⁰⁾. L'isolamento di cloni di DNA complementare per la gliadina ha permesso di sequenziare e determinare i 266 amminoacidi costituenti l'A-gliadina, che è una sottofrazione tossica dell'alfa-gliadina⁽¹¹⁾. Mediante digestione cianobromidica e triptica sono state identificate nell'ambito dell'A-gliadina due sequenze (1-30 e 31-55) tossiche in vitro⁽¹²⁾ e caratterizzate dalla frequente ricorrenza di due tetrapeptidi (-gln-gln-gln-pro- e -pro-ser-gln-gln-)⁽¹³⁻¹⁵⁾. L'importanza di questi 2 oligopeptidi è indirettamente confermata dalla loro assenza in cereali non tossici, quali mais e riso, e dal fatto di non poter essere ulteriormente digeriti da parte di enzimi attivi in vivo, quali pepsina, tripsina, chimotripsina, pancreatina ed endopeptidasi. Recentemente sono stati sintetizzati tre peptidi corrispondenti ai residui 3-21, 31-49, 202-220 dell'A-gliadina. Solo la somministrazione in vitro del secondo, contenente la sequenza -gln-gln-gln-pro- ma non quella -pro-ser-gln-gln- contenuta nel primo e nel terzo, ha riattivato le lesioni

intestinali in un gruppo di celiaci a dieta priva di glutine⁽¹⁶⁾. Questa sequenza del peptide 31-49 dell'A-gliadina è ora considerata l'agente lesivo della malattia celiaca. L'importanza di questo peptide nella patogenesi della MC è ulteriormente confermata dal fatto che esso viene riconosciuto da linfociti T gliadina-specifici-DQ2-ristretti.

In altri cereali, pur tossici per i celiaci, sono state identificate prolammine correlate alle gliadine quali le ordeine dell'orzo, le secaline della segale, mentre è ad oggi ancora dubbia la tossicità dell'avena e quindi delle avenine che, infatti, mostrano un minor grado di conservazione filogenetica con le altre prolammine⁽¹⁷⁾.

Il normale introito medio di glutine nella dieta di un europeo adulto è pari a 15/20 g/die. Studi di intervento e valutazioni sulla dieta portano a dimostrare che un apporto quotidiano di 100 mg di gliadina/die è sufficiente a dare patologia celiaca nel soggetto predisposto; mentre altri studi dimostrano che un apporto giornaliero di 4-14 mg di gliadina non causano danno alla mucosa intestinale⁽¹⁸⁾.

E' lecito sperare che la conoscenza della struttura molecolare della gliadina possa favorire da un lato la comprensione dei meccanismi che portano alla lesione della mucosa intestinale del celiaco, dall'altro la selezione di varietà di cereali contenenti gliadine "detossificate" e/o la

produzione di prodotti contenenti glutine ma privi della sua componente tossica.

1.3. GENETICA DELLA MC

Esiste una base genetica all'origine della celiachia che determina la predisposizione alla malattia, mentre l'ambiente fornisce l'elemento scatenante che determina l'insorgenza della patologia.

Infatti la prevalenza della MC nei parenti di primo grado varia da 1% a 18% e la concordanza tra gemelli monozigoti è del 70%^(19,20). La correlazione genetica fino ad oggi dimostrata per la MC è stata quella con i geni per il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), noto nell'uomo come Human Leucocyte Antigen (HLA, in ragione delle prime osservazioni condotte sui leucociti), e con un'altra regione sul cromosoma 5 che contiene molti geni ancora da studiare⁽²¹⁻²³⁾.

Tra le attività specifiche attraverso le quali il sistema immunitario svolge la funzione primaria di immunosorveglianza nei confronti degli agenti patogeni o tossici, vi è la sintesi di glicoproteine finalizzate a presentare, sulle membrane cellulari, una serie di peptidi antigenici necessari all'attivazione dei linfociti, chiave delle reattività immunitarie, sia umorali che cellulari. Tali molecole appartengono all'

MHC, e, nell'uomo all' HLA. Il sistema HLA è costituito da un cluster genico di 36 kb localizzato sul cromosoma 6, ed in esso sono stati mappati oltre 250 geni, raggruppati in tre classi distinte: HLA classe I, HLA classe II e HLA classe III (Fig. 1.4).



Fig. 1.4 - Schematizzazione dell'MHC.

I geni HLA A, B, e C, detti geni HLA di classe I, producono glicoproteine di membrana espresse praticamente in tutte le cellule nucleate dell'organismo. D'altro canto, i geni HLA DR, DQ e DP, chiamati geni HLA di classe II, producono ed esprimono le glicoproteine solo su alcune cellule specializzate come macrofagi, cellule dendritiche, linfociti B, cellule endoteliali e pochi altri tipi cellulari.

L'HLA è di fondamentale importanza nello sviluppo e nel controllo sia delle risposte immunitarie di tipo umorale che di quelle cellulo-mediate. I linfociti T, infatti, non riconoscono gli antigeni proteici in forma libera o in soluzione, ma frammenti di essi nel contesto delle molecole HLA. Le molecole HLA di classe I e II hanno un ruolo differente: le molecole di classe I presentano l'antigene ai linfociti T

CD8+, mentre la funzione delle molecole HLA di classe II è quella di presentare l'antigene ai linfociti T CD4+.

Dunque, le molecole HLA di classe I e di classe II fungono da bersaglio per i linfociti T dopo che il determinante antigenico è stato endocitato e processato da una Cellula Presentante l'Antigene (APC). E' solo al termine di questa elaborazione che l'antigene, con la sua frazione proteica, potrà interagire con l'HLA I o II, e quest'ultime potranno essere riconosciute dai rispettivi linfociti T.

Per quanto riguarda la celiachia, l'intolleranza al glutine è legata specificamente alla presenza di particolari alleli di geni della classe II del sistema HLA, del sottogruppo DQ A e B, strettamente legati con i geni del sottogruppo DR. Il 90-95% dei celiaci esprime i geni DQA1*0501/DQB1*0201 codificanti rispettivamente per le catene alfa e beta dell'eterodimero DQ2. La maggioranza dei soggetti celiaci DQ2-negativi esprime invece l'eterodimero DQ8 codificato dai geni DQA1*0301 e DQB1*0302^(24,25).

Condizione necessaria per sviluppare la celiachia è, infatti, la presenza sulla membrana delle cellule immunocompetenti di una molecola HLA di classe II (il cosiddetto eterodimero HLA celiaco DQ2), formata da due particolari catene alfa e beta, codificate dagli alleli

A0501 e B0201, in grado di legare con alta affinità peptidi di gliadina e di presentarli agli specifici linfociti T (Fig. 1.5).

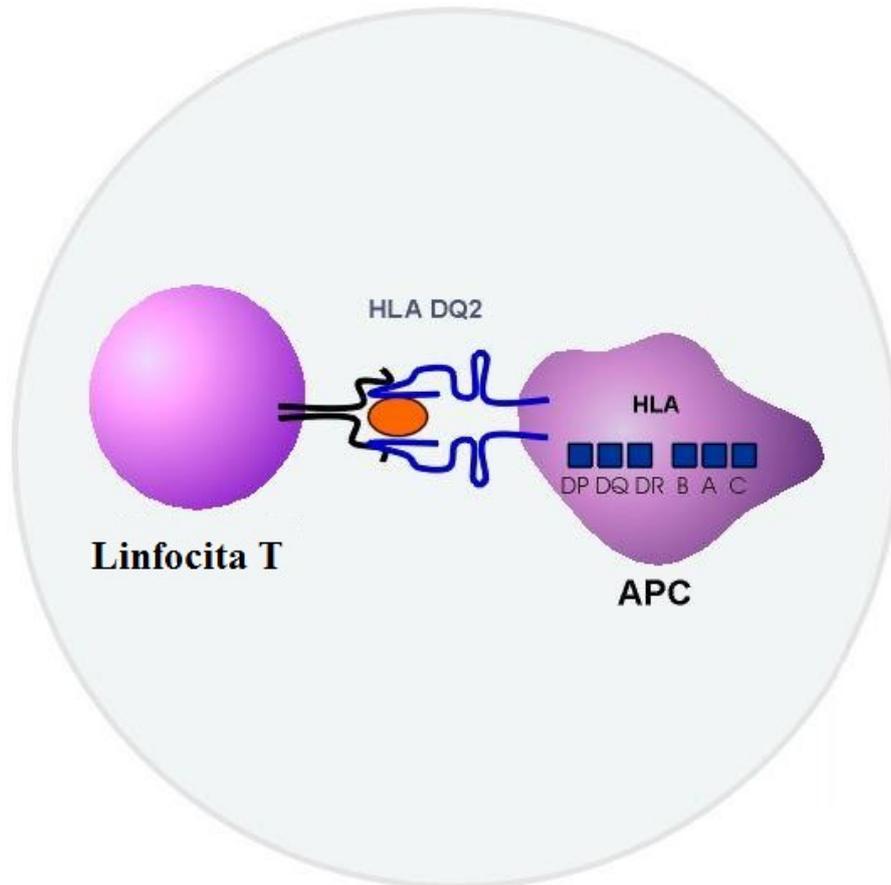


Fig. 1.5 – Presentazione dell'antigene al linfocita T.

I geni dell'HLA definiscono la predisposizione genetica e sono essenziali per lo sviluppo dell'intolleranza al glutine, ma non spiegano l'intero meccanismo della risposta immunitaria.

Senza questi geni specifici non si sviluppa la MC, ma chi li possiede non sarà necessariamente intollerante. L'analisi dei geni HLA serve pertanto a escludere l'intolleranza, ma non a confermare la diagnosi.

Il motivo che spiega l'associazione fra lo sviluppo dell'intolleranza al glutine con i geni HLA di classe II, consiste nella capacità di legame delle molecole DQ2 o DQ8 ad un frammento peptidico della gliadina che viene presentato alle cellule T CD4⁺⁽²⁶⁾.

Benchè sia stato ampiamente dimostrato che l'intolleranza al glutine è legata specificamente a geni HLA di classe II, con particolare coinvolgimento delle cellule T CD4⁺ della lamina propria nell'induzione dei danni alla mucosa intestinale, recentemente è stata dimostrata l'associazione della malattia celiaca anche con i geni HLA di classe I. E' stato evidenziato, infatti, che un peptide della gliadina di 10 amminoacidi, corrispondenti ai residui 123-132 della A-gliadina, lega molecole HLA di classe I A*0201, con elevata affinità; tale peptide è riconosciuto dai linfociti T CD8⁺ del sangue periferico e della mucosa intestinale dei pazienti celiaci HLA-A2 positivi⁽²⁷⁾ e induce, da parte di questi, la produzione di INF- γ e la lisi di cellule bersaglio. Le linee T CD8⁺ generate dalla mucosa intestinale celiaca rilasciano Granzime-B e inducono l'apoptosi di cellule epiteliali Caco2 (A2+) quando sono stimulate con il peptide citotossico⁽²⁸⁾.

Questi risultati sono in linea con precedenti osservazioni attestanti la presenza di un infiltrato di linfociti T CD8⁺ nell'epitelio della mucosa di pazienti con lesioni intestinali associate alla celiachia⁽²⁹⁾.

Sebbene geni diversi dall'HLA sono verosimilmente implicati nella MC, studi di screening dell'intero genoma non sono riusciti ad identificare, al di fuori dell' HLA, altro/i gene/i con un forte effetto. L'importanza, quindi, dei fattori genetici nella malattia non è dovuta ad un gene deficitario o alterato, ma bensì ad una serie di caratteristiche genetiche (polimorfismi), che esercitano singolarmente uno scarso effetto, ma che, tutte insieme, caratterizzano l'intolleranza al glutine^(30,31).

1.4. PATOGENESI DELLA MC

1.4.1 Risposta Immune Mucosale

Il protagonista indiscusso nella patogenesi della MC è il sistema immunitario. La risposta immune ai peptidi derivati dalla gliadina, nei pazienti affetti da MC, è mediata sia da una componente adattativa sia da una componente innata, le quali svolgono differenti funzioni ma interagiscono strettamente nell'innescare della malattia. Il sistema immunitario "innato" ha la capacità di conferire una pronta e rapida risposta protettiva, prima della sintesi anticorpale o della risposta T cellulare. Le cellule T e le cellule B fanno invece parte della componente adattativa caratterizzata dalla capacità di sviluppare

memoria nei confronti di precedenti esperienze immunologiche e di modificare (adattare) la risposta immunologica nel tempo.

Il coinvolgimento e l'interazione dell'immunità innata e dell'immunità adattativa sono alla base della patogenesi della MC.

1.4.2 Risposta Adattativa

La componente adattativa del sistema immunitario, riconosce la gliadina come un antigene. Quando la gliadina supera la barriera intestinale, interagisce con la transglutaminasi tissutale, un enzima che catalizza una reazione di deamidazione Ca-dipendente di uno specifico residuo glutammico, convertendo la glutamina in acido glutammico, carico negativamente⁽³²⁾. A questo punto, la gliadina acquisisce una forte affinità per le molecole HLA-DQ2 e DQ8 poste sulla superficie delle cellule APC e attiva i linfociti T CD4+. L'attivazione linfocitaria, comporta non solo la produzione di anticorpi verso la gliadina stessa⁽³³⁾, ma anche di autoanticorpi verso la tTG tessutale⁽³⁴⁾ e stimola una risposta Th1-mediata, che attraverso la secrezione di citochine pro-infiammatorie vanno a distruggere l'integrità della barriera intestinale⁽³⁵⁾.

Tra i diversi peptidi che costituiscono la gliadina, il 33-mer dell'estremità N-terminale dell'A-gliadina è stato definito immunodominante, in quanto viene riconosciuto dalle cellule T della

maggior parte dei pazienti celiaci studiati. Questo peptide di 33 aminoacidi, inoltre, contenendo ben 6 copie di 3 epitopi diversi, stimola fortemente i linfociti T a proliferare e a produrre γ -interferone⁽³⁵⁾.

Recenti studi hanno dimostrato che la A-gliadina contiene un corto peptide di 10 aminoacidi (123-132) in grado di attivare linfociti T CD8+ citotossici ottenuti sia da sangue periferico sia da intestino di celiaci e di indurre, da parte di questi, la produzione di IFN- γ e la lisi di cellule bersaglio⁽³⁶⁾. Inoltre questo peptide citotossico elicitava, in coltura d'organo di mucosa celiaca, una forte reazione immunitaria sia a livello della lamina propria, con aumento delle cellule che esprimono marcatori di attivazione (CD25 e CD80) e di apoptosi (FASL), sia a livello epiteliale, dove si osserva aumento dell'espressione del FAS e dell'apoptosi. Infine, le linee T CD8+ generate dalla mucosa intestinale celiaca rilasciano Granzyme-B ed inducono l'apoptosi di cellule epiteliali Caco2 (A2+) quando stimulate con il peptide citotossico⁽²⁸⁾.

1.4.3 Risposta Innata

L'immunità innata è quella parte del sistema immunitario che protegge dai batteri e che agisce rapidamente, in minuti, al massimo ore, molto prima che inizi la sintesi di anticorpi e l'attivazione delle

cellule T, del sistema immune adattivo. Solo negli ultimi anni, grazie ad approfondite analisi immunoistochimiche eseguite sia sulla mucosa del celiaco atrofico che in remissione, si è andato via via definendo l'importante ruolo dell'immunità innata nella celiachia⁽³⁷⁾.

Nella mucosa intestinale del celiaco in remissione, esposta in vitro al glutine, l'attivazione delle cellule T è preceduta da una serie di fenomeni di attivazione immunologica, quali l'espressione di molecole DR ed ICAM-1 sui macrofagi della lamina propria e sull'enterocita e la migrazione delle cellule T nello spazio sottoepiteliale. Questa risposta immune precoce, che è apparentemente indipendente dalle cellule T, coinvolge molto probabilmente meccanismi dell'immunità innata ed è dovuta, almeno in parte, alla produzione di IL-15^(38,39).

Molto interessante è l'osservazione che i peptidi della gliadina, che sono capaci di indurre una risposta infiammatoria precoce nell'intestino del celiaco, possono essere diversi dai peptidi che sono riconosciuti dalle cellule T intestinali.

Tra i peptidi gliadinici coinvolti nella patogenesi della malattia celiaca, il peptide 31-43 è stato identificato come tossico, sia in vitro che in vivo⁽¹⁰⁻¹⁴⁾, ed il peptide 56-68 come un epitopo immunodominante, capace di stimolare, in modo DQ2 ristretto, le cellule T CD4+ della maggior parte dei pazienti celiaci⁽⁴⁰⁾. E' apparso

evidente che esistono discrepanze tra tossicità e immunodominanza, poiché il peptide tossico 31-43 danneggia la mucosa ma non attiva le cellule T di intestino celiaco, mentre il peptide immunodominante 56-68 non sembra capace di ledere la mucosa intestinale del celiaco in vitro e in vivo^(41,42).

Soltanto il peptide 31-43 è capace di indurre in tempi brevi una risposta dell'immunità innata. Sembra quindi che le gliadine hanno sequenze specializzate nella risposta immune adattativa delle cellule T e sequenze specializzate nella risposta dell'immunità innata. Si è visto che il peptide 31-43 è capace di agire sulla mucosa del celiaco come "danger signal", analogamente a quanto si verifica nei tessuti in risposta ad agenti infettivi, inducendo una rapida risposta immune, il cui mediatore chiave è l'IL-15, un fattore di crescita cruciale per i linfociti sia della branca innata sia adattativa (Fig. 1.6).

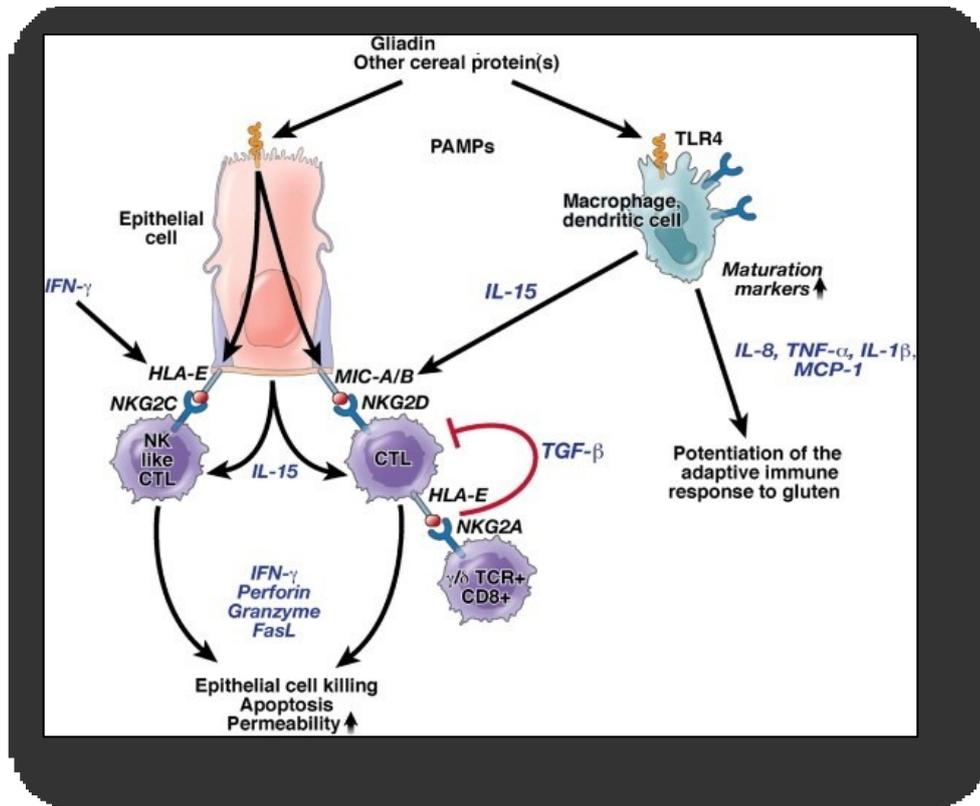


Fig. 1.6 – Risposta innata nella MC.

Dove sia la specificità della risposta precoce ad alcuni peptidi della gliadina da parte dell'intestino del celiaco non è noto, nè è noto che rapporto ci sia tra il coinvolgimento dell'immunità innata e l'effetto tossico su cellule e tessuti, in fasi diverse dello sviluppo, da parte di (questi stessi) peptidi della gliadina; è importante, però, sottolineare che questi fenomeni sono indipendenti dall'attivazione del TCR sui linfociti T e non ristretti da molecole HLA⁽⁴³⁾.

1.4.4 Il Meccanismo Del Danno

Il glutine ingerito con la dieta da soggetti geneticamente predisposti, è scisso durante la digestione in amminoacidi innocui ed in peptidi

immunotossici, resistenti alla digestione proteolitica nel piccolo intestino. Questi peptidi, ed in particolar modo la gliadina, possono superare la barriera intestinale attraverso la via transcellulare, oppure, come dimostrato di recente⁽⁴⁴⁾, attraverso le tight junctions aperte grazie ad un messaggio di attivazione della zonulina in sede intestinale, condotto da molecole non ancora identificate, che provoca il rimodellamento di queste giunzioni e l'aumento della permeabilità intestinale. Attraverso queste due possibili strade, la gliadina raggiunge la sottomucosa, dove interagisce con un enzima extracellulare, la transglutaminasi tessutale (tTG), che ha un ruolo fondamentale nella patogenesi della MC^(32-34,45). Questo enzima catalizza una reazione calcio-dipendente di deaminazione di uno specifico residuo glutammico, convertendo la glutamina in acido glutammico, carico negativamente. Dopo aver subito questa modifica la gliadina acquisisce una forte affinità per le molecole HLA-DQ2 e DQ8 poste sulla superficie delle cellule presentanti l'antigene ai linfociti T-CD4+. L'attivazione linfocitaria porta alla selezione di cloni specifici per la gliadina, principalmente di fenotipo Th1/Th0 che rilasciano, in seguito al riconoscimento della gliadina, prevalentemente citochine pro-infiammatorie, in particolare interferone-gamma⁽⁴⁶⁾. Inoltre vengono attivati i linfociti B glutine-specifici e, attraverso la loro trasformazione in plasmacellule, vengono

prodotti, non solo anticorpi verso la gliadina stessa, ma anche autoanticorpi verso la tTG e verso complessi proteici tTG-gliadina che, analogamente a quanto avviene in altre patologie autoimmuni, innescherebbero i meccanismi del danno⁽³⁴⁾ (Fig. 1.7).

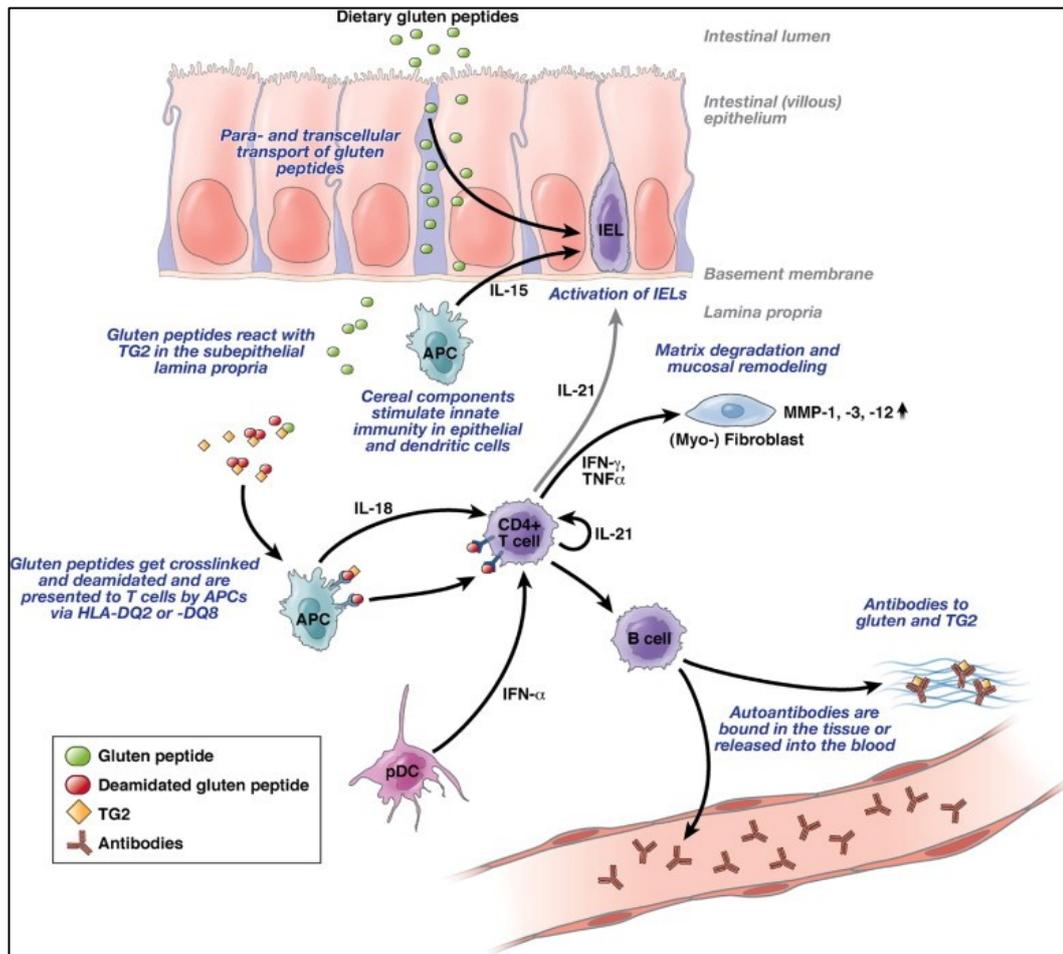


Fig. 1.7 – Meccanismo del danno nella MC.

Ovviamente accanto alla risposta adattativa, umorale e cellulo-mediata, c'è una risposta innata che contribuisce a determinare il danno mucosale^(47,48), infatti, in parallelo, peptidi innati agiscono sugli enterociti inducendo l'espressione di MIC e IL-15. L'IL-15 promuove

l'infiltrazione di linfociti intraepiteliali CD8+, induce l'espressione di NK-receptor, e attiva fenomeni apoptotici causando quindi l'appiattimento dei villi^(39,49).

Quindi la gliadina nell'intestino del celiaco innesca una risposta anticorpale e cellulo-mediata nei confronti dei villi della mucosa intestinale che diviene, nel tempo, completamente piatta (atrofica) causando il "malassorbimento" tipico della celiachia. La persistenza del glutine nella dieta conduce ad un'inflammatione cronica che talvolta può portare allo sviluppo di linfomi⁽⁵⁰⁾.

1.5. LE CITOCHINE

1.5.1 Le Citochine Infiammatorie nella MC

Nel paziente celiaco, in fase florida della malattia, l'epitelio della mucosa intestinale risulta costituito da enterociti immaturi ed è infiltrato da linfociti T CD8+ ad azione citotossica (IELs). Nella lamina propria invece, sono aumentati e attivati i linfociti T CD4+ (LPLs).

I meccanismi che conducono al danno della mucosa intestinale del celiaco, sembrano in parte ascrivibili alla produzione di citochine

proinfiammatorie del tipo Th1, tra cui l'interferone gamma (INF- γ), rilasciate soprattutto dai linfociti CD4+ della lamina propria .

Infatti, L'INF- γ è la citochina predominante nella mucosa del celiaco in fase florida di malattia⁽⁵¹⁾.

Tra i fattori che regolano gli effetti biologici dell'INF- γ troviamo due fattori di trascrizione: STAT-1, che regola la sintesi delle citochine proinfiammatorie, e SOCS-1, che blocca l'attivazione di STAT-1, inibendo così la sintesi dell'INF- γ . Recentemente è stata dimostrata una persistente attivazione di STAT-1, determinata dall'assenza della proteina SOCS-1; ciò spiegherebbe il mantenimento e l'espansione della risposta infiammatoria locale a livello della mucosa intestinale del celiaco^(52,53).

Paradossalmente l'IL-12, la citochina più coinvolta nella polarizzazione in senso Th1 della risposta immune, non è stata dimostrata nella mucosa intestinale del paziente celiaco. Altri studi dimostrano il coinvolgimento di altre citochine infiammatorie nel danno mucosale, principalmente TNF- α , IL-15 e IL-21⁽⁵⁴⁻⁵⁶⁾.

TNF- α (Tumor Necrosis Factor) è una citochina proinfiammatoria prodotta oltre che dai macrofagi attivati, da linfociti T e B, neutrofili, eosinofili e basofili, mastociti, cellule NK, astrociti, cellule della microglia e cellule di Kuppfer. Il TNF- α funziona da segnalatore multiplo dell'infiammazione che viene attivato da molteplici stimoli:

virus, batteri, parassiti, fattori del complemento (C5a), IL-1, tossine enteriche, radicali liberi, leucotrieni, ipossia, cellule tumorali. E' coinvolto in numerosissimi processi come la morte apoptotica delle cellule, la proliferazione, il differenziamento, la cancerogenesi, la replicazione virale, ma il suo ruolo principale è nella regolazione delle cellule del sistema immunitario. In particolare nella MC attiva c'è un' iperproduzione di TNF- α ^(55,57), principalmente da parte dei linfociti T attivati, che determina, insieme alle altre citochine proinfiammatorie, apoptosi e iperproliferazione cellulare con conseguente appiattimento della mucosa intestinale.

Per quanto concerne l'IL-15, essa è presente in gran quantità nella mucosa intestinale del celiaco^(39,49) ed è prodotta da cellule mieloidi, cellule epiteliali ma non da cellule linfoidi (salvo in particolari condizioni), quindi non è espressione di una risposta immune T-dipendente. L'IL-15, sembra avere un ruolo importante nella patogenesi della MC in quanto, è capace di turbare l'omeostasi mucosale del paziente celiaco in differenti modi^(58,59). Prodotta dall'enterocita del celiaco in seguito al contatto con il peptide 31-43, l'IL-15 induce l'espressione autocrina del MICA e dell'HLA-E sugli enterociti, e del NKG2D/CD94 sui linfociti CD8+ citotossici intraepiteliali. L'interazione tra il MICA e l'NKG2D e tra HLA-E e il

CD94 trasforma i linfociti T CD8+ intraepiteliali in cellule NK, con conseguente rapida lisi delle cellule epiteliali mediante apoptosi⁽⁶⁰⁾.

Oltre a ciò, questa citochina sarebbe la principale responsabile della più severa complicanza della celiachia, il linfoma; pertanto il blocco della sua azione, attraverso un anticorpo specifico, potrebbe rivelarsi una terapia utile per i celiaci “refrattari” alla dieta priva di glutine⁽⁵⁸⁾.

Questa citochina potrebbe rappresentare, quindi, un fattore importante di induzione della risposta Th1 nella malattia celiaca in cui il ruolo di altri fattori cardini della differenziazione Th1, quali l’IL-12, è stato escluso e quello dell’IL-18 è stato ipotizzato, ma non ancora provato⁽⁶¹⁾. Recentemente nella mucosa intestinale di pazienti celiaci in fase attiva di malattia, è stata dimostrata una forte produzione di un’altra citochina proinfiammatoria: IL-21^(62,63). Inoltre gli stessi autori hanno evidenziato, nel modello in vitro della coltura d’organo intestinale di pazienti celiaci, che la neutralizzazione dell’IL-21 riduce la produzione di IFN-gamma⁽⁶²⁾. Pertanto anche l’IL-21 sembrerebbe essere coinvolto nel differenziamento di tipo Th1^(62,64) (Fig. 1.8).

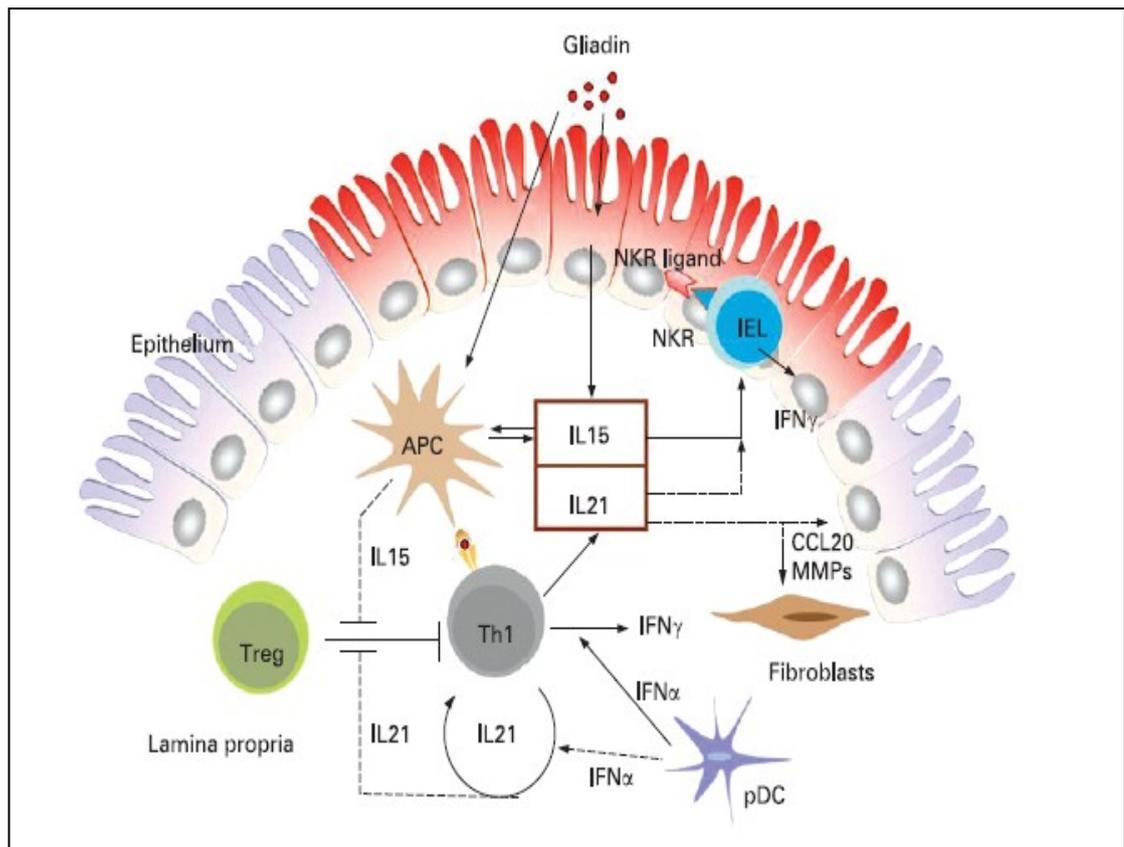


Fig. 1.8 – Ruolo dell’IL-21 e dell’IL-15 nella patogenesi della MC.

1.5.2 Le Citochine Antinfiammatorie nella MC

Durante la risposta immune mucosale nella celiachia, oltre alle citochine proinfiammatorie vengono prodotte anche citochine con azione antinfiammatorie principalmente IL-10 e TGF-beta⁽⁶⁵⁾. E’ ormai noto che in condizioni normali, il sistema immune, attraverso un meccanismo noto come “tolleranza orale” riconosce grandi quantità di proteine introdotte all’interno del tratto gastrointestinale con la dieta⁽⁶⁶⁾. I meccanismi alla base della tolleranza orale agli

alimenti sono complessi e coinvolgono un meccanismo di soppressione mediato da cellule T regolatorie (T reg).

Queste cellule regolatorie, giocano un ruolo fondamentale nell'omeostasi immunologica in quanto, in condizioni normali, la capacità di risposta immunitaria di un individuo è in equilibrio con la capacità di regolare tale risposta^(67,68). Diverse sono le cellule Treg coinvolte nella tolleranza immunologica (Fig. 1.9):

- le cellule Tr1, in grado di sopprimere la risposta immune di tipo Th1 in vivo ed in vitro attraverso la secrezione di IL-10 e TGF- β ⁽⁶⁹⁾;
- le cellule Th3, che producono esclusivamente TGF β ;
- cellule Treg naturali che esprimono in modo specifico il gene Foxp3, che viene definito come un repressore trascrizionale di diversi promotori di citochine proinfiammatorie⁽⁷⁰⁾.

Il fattore di trascrizione Foxp3 rappresenta un marker delle cellule Treg CD4+CD25+ ed risulta essere essenziale per la loro funzione regolatoria⁽⁷¹⁾.

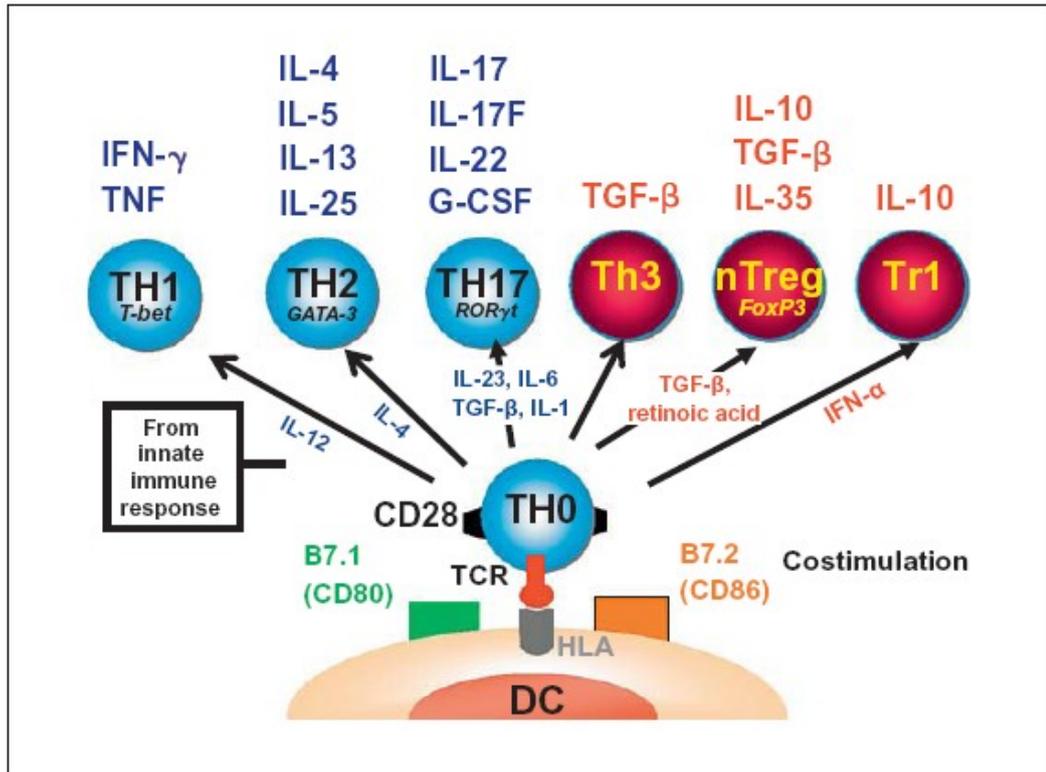


Fig. 1.9 – Differenziamento linfociti T naive.

Per quanto attiene i meccanismi immunoregolatori nella malattia celiaca recenti studi, utilizzando il modello in vitro della coltura d'organo, hanno dimostrato che il trattamento della mucosa intestinale di pazienti celiaci in remissione con l'IL-10, previene la massiva attivazione immunitaria indotta dal challenge in vitro con il glutine e determina una soppressione, duratura nel tempo, della produzione di IFN- γ ⁽⁷²⁾. IL-10, infatti, è un'importante citochina immunoregolatoria che agisce sulle cellule presentanti l'antigene, inibendo la sintesi di citochine infiammatorie e l'espressione di molecole costimolatorie e MHC di classe II, inoltre IL-10 interferisce direttamente con la

proliferazione e il differenziamento delle cellule T. Pertanto gli autori ipotizzano che la soppressione dell'attivazione delle cellule T gliadina-specifiche potrebbe essere causata da un'inibizione, da parte dell'IL-10, delle molecole costimolatorie nonché delle molecole MHC di classe II sulle cellule presentanti gli antigeni, cellule presenti nella lamina propria della mucosa intestinale del celiaco. Questi risultati offrono, nei celiaci, nuove prospettive riguardo a strategie terapeutiche basate sull'effetto immuno-modulatorio dell'IL-10⁽⁷³⁾.

Il TGF-beta, l'altra principale citochina regolatoria, appartiene alla superfamiglia dei fattori di crescita, è prodotto dalle cellule emopoietiche, dai linfociti Th3 e dalle cellule Treg e nei processi infiammatori svolge un'attività chemiotattica per i monociti in un primo stadio, mentre in una fase successiva attiverrebbe le stesse cellule per il rilascio di altri mediatori (es. IL-1). Il TGF-beta è anche dotato di un potenziale immunosoppressivo in quanto inibisce la proliferazione linfocitaria sia in vitro che in vivo. Gli effetti principali del TGF-beta sarebbero quelli di inibire i processi infiammatori facilitando quelli riparativi attraverso il rilascio di svariati mediatori⁽⁷⁴⁾. Studi di qPCR hanno evidenziato che i livelli di mRNA per il TGF- β , sono elevati nella MC attiva⁽⁶⁵⁾. Altri studi, mediante analisi immunostochimica, hanno mostrato un'overespressione del

TGF- β , predominantemente a livello delle regioni sub-epiteliali, nella MC in fase florida⁽⁷⁶⁾.

Recentemente si è visto che l'IL-15, oltre ad orchestrare il differenziamento dei linfociti intraepiteliali, determina l'inibizione del segnale del TGF- β , contribuendo alla perdita dell'omeostasi immunitaria che si ha nella MC attiva⁽⁵⁹⁾.

1.5.3 La Microdissezione Laser: un approccio innovativo

Diversi approcci sono stati usati per studiare il pattern di citochine espresse nella celiachia (RT-PCR, ELISA, ELISPOT, citofluorimetria, ibridizzazione in situ, etc) che spesso hanno portato a risultati contraddittori⁽⁷⁷⁾. Tuttavia, ad oggi non vi è uno studio riportante la produzione di citochine da parte delle singole popolazioni cellulari e/o dei compartimenti costituenti la mucosa intestinale dei celiaci. L'eterogeneità cellulare dei campioni di tessuto è un fattore problematico nella determinazione dei livelli di analiti in tipi cellulari specifici. La microdissezione a cattura laser (LCM) è una tecnologia rivoluzionaria, ideata da un gruppo di ricercatori diretti da Lance Liotta, Robert Bonner e Michael Emmert-Buck del National Institutes of Health (NIH), la quale consente di raccogliere sottopopolazioni omogenee di cellule intatte da sezioni solide di tessuto per

l'esecuzione di analisi molecolari⁽⁷⁸⁻⁸⁰⁾. Le cellule possono essere selezionate sulla base di caratteristiche morfologiche o immunoistologiche. Il microdissettore laser (Fig. 1.10) è uno strumento di precisione che vuole conciliare un dominio più tecnico e grossolano, quello istologico, con uno più complesso e per molti versi fragile, come quello molecolare. La stazione di LCM integra un microscopio invertito di ricerca, un laser a infrarossi (IR) a basso potenziale, uno stativo controllato con un joystick ed il meccanismo di manipolazione dotato di monitor per il controllo. Le tecniche molecolari applicate ai campioni di cellule selezionate con la LCM includono: l'amplificazione in RT-PCR, la LOH, l'instabilità dei microsatelliti, l'esecuzione del gene profiling differenziale, le microarray di cDNA, l'analisi dei prodotti proteici tramite elettroforesi bidimensionale su gel di poliacrilamide (2D-PAGE), ed il Western blotting.



Fig. 1.10 - Microdissettore laser della LEICA, modello DM6000, utilizzato nel lavoro di tesi.

Protocollo per l'isolamento delle cellule tramite LCM: i campioni bioptici devono essere prelevati speditamente e senza traumi durante la procedura chirurgica. Il campione di tessuto, ai fini del mantenimento dell'integrità biologica delle macromolecole deve essere rapidamente trattato, a secondo del protocollo da utilizzare per la LCM. Ad esempio, quando bisogna condurre studi che impiegano analisi sull'RNA, come nel nostro caso, è preferibile congelare il campione immediatamente dopo il prelievo, in OCT (Optimum Cutting Temperature) e conservarlo in azoto liquido fino all'esecuzione della LCM. Il composto OCT non sembra influenzare in modo significativo alcuni analiti clinici⁽⁸¹⁾. Le sezioni tagliate al criostato, vengono raccolte su vetrini da LCM e si procede con fissazione, colorazione e disidratazione. Una volta fissate, colorate e disidratate le sezioni sul vetrino si passa alla microdissezione laser.

Tramite il microscopio, associato al monitor, l'utente seleziona le cellule o l'area di interesse, dopodichè il laser a infrarossi (IR) o UV a basso potenziale, provvede a tagliare e separare la parte selezionata, dal tessuto adiacente. A questo punto bisogna raccogliere le cellule selezionate e separate. Essenzialmente ci sono tre diversi modi per raccogliere il tessuto di interesse:

- Raccolta per gravità (Fig. 1.11): il tessuto selezionato, semplicemente per effetto della forza di gravità cade in un contenitore di raccolta, in genere il tappo di un'epENDORF, adeguatamente posizionato al di sotto del collector (come nel caso del microdissettore della LEICA da noi utilizzato).

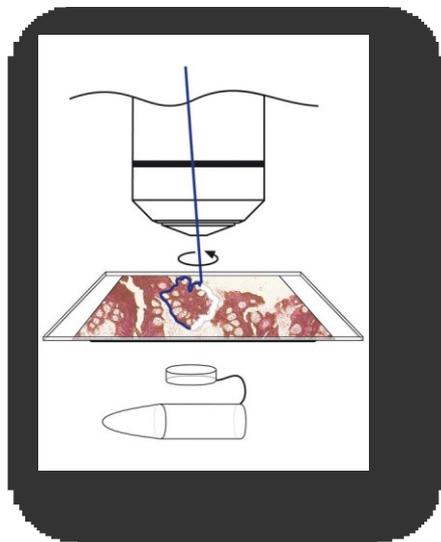


Fig. 1.11 – Raccolta del materiale selezionato mediante gravità.

- Raccolta mediante catapulta: il campione selezionato viene “catapultato” (Fig. 1.12), mediante un impulso laser che genera una forza fotonica in grado di spingere il materiale dal vetrino al tappo di

una provetta che contiene un tampone o un materiale appiccicoso specifico che permette al tessuto di aderire. Questo processo evita alcuni dei problemi statici che si potrebbero verificare quando si utilizzano vetrini rivestiti da membrana.



Fig. 1.12 – Raccolta mediante catapulta.

- L'approccio più recente prevede l' utilizzo di una tecnologia basata sul trasferimento del materiale selezionato mediante un laser pulsato (Laser Induced Forward Transfer-LIFT).
- Meccanismo "Cut-and-capture": un tappo rivestito con un adesivo è posizionato direttamente sulla sezione di tessuto. Un laser IR riscalda leggermente il collante sul tappo, il quale si fonde al tessuto sottostante e un laser UV taglia il tessuto che andrà ad aderire al tappo dell'ependorf permettendo la raccolta del campione selezionato.

La colorazione in HE può essere d'aiuto nel creare il sufficiente contrasto, necessario per identificare con sicurezza le cellule. È stato

dimostrato che la colorazione in HE non influisce (se non minimamente) sulla resa e sulla qualità di DNA, mentre quest'ultima è influenzata dalle colorazioni di immunistochemica⁽⁸²⁾.

1.6. SCOPO PARTE 1

In virtù di quanto detto, lo scopo della prima parte del mio percorso di dottorato è stato quello di indagare il pattern di citochine espresse in compartimenti diversi della mucosa intestinale di pazienti celiaci, selezionati mediante la tecnica della microdissezione laser. La microdissezione laser è stata combinata con la real time PCR per ottenere il profilo trascrizionale dei geni per le citochine analizzate, nei due compartimenti mucosali, epitelio e lamina propria, cercando di far luce così sul ruolo di questi ultimi nella patogenesi della malattia.

2. MATERIALI E METODI

2.1. PAZIENTI

Sono stati reclutati, dal reparto di gastroenterologia dell'Ospedale "San G. Moscati" di Avellino, 30 pazienti; 15 di essi erano celiaci in fase attiva della malattia (5 maschi e 10 femmine di età media pari a 35 anni, range tra 21 e 57 anni), ovvero con diagnosi istologica di atrofia totale della mucosa intestinale e sierologia positiva per anticorpi antiendomizio, mentre i restanti 15 soggetti erano rappresentati da controlli non celiaci (6 maschi e 9 femmine di età media pari a 43 anni, range tra 29 e 58 anni), con presenza di lieve dispepsia.

Da ciascun paziente sono stati prelevati, mediante gastroendoscopia intestinale, diversi frammenti bioptici di mucosa digiunale. Dopo recisione, le biopsie intestinali sono state osservate accuratamente allo stereomicroscopio, per effettuare una prima diagnosi macroscopica di atrofia villare e/o di mucosa normale. Dopodiché, onde salvaguardare il più possibile l'integrità dell'RNA, le biopsie venivano immediatamente, incluse in una soluzione acquosa di alcool polivinilico e polietilenglicole (OCT), sostanza che consentiva l'aderenza del campione al supporto e che favoriva il successivo taglio al criostato. Il supporto ed il campione venivano poi immersi

(aiutandosi con delle pinze) in un thermos contenente azoto liquido, e trasportate in laboratorio. Per i pazienti che, dall'analisi morfologica allo stereomicroscopio, risultavano celiaci in fase florida, la diagnosi è stata successivamente confermata mediante tecnica immunoistologica. Lo studio ha ricevuto l'approvazione del comitato etico dell'ospedale San G. Moscati di Avellino, in conformità alle disposizioni previste dalla Dichiarazione di Helsinki. Da ogni paziente è stato, inoltre, ottenuto il consenso informato.

2.2. ANALISI DELLE SEQUENZE NUCLEOTIDICHE E SCELTA DEI PRIMERS

La progettazione e la scelta delle sequenze nucleotidiche utilizzate per la PCR è stata condotta su di un *personal computer* equipaggiato con sistema operativo Windows XP e connessione in rete per l'utilizzo delle principali banche dati.

Il *software DNASTAR* (DNASTAR, INC) è stato utilizzato per l'analisi delle sequenze nucleotidiche. I primers utilizzati nelle reazioni di amplificazione sono stati disegnati utilizzando il software ABI Prism Primer Express (versione 2.0), (Applied Biosystems, Life Technologies, Italia). Per il disegno dei primers sono state prese in considerazione i seguenti parametri:

- Contenuto di GC del 50-60%;

- Adeguata temperatura di melting (T_m);
- Evitare strutture secondarie;
- Evitare *repeats* di G o di C più lunghi di 3 basi;
- Posizionare le G e le C alla fine dei primers;
- Verifica di dimeri e self-dimeri;
- Verifica della specificità dei primers usando strumenti come BLAST.

Le sequenze dei primer selezionati per le PCR sono riportate nella tabella 2.1. Tutti gli oligonucleotidi sono stati scelti in modo da amplificare una zona di giunzione tra due esoni per evitare la possibile amplificazione del DNA genomico contaminante eventualmente presente nella preparazione dell'RNA. Gli oligonucleotidi fosforodiesteri, di lunghezza variabile, sono stati sintetizzati dalla Sigma-Aldrich seguendo il protocollo convenzionale di sintesi dei fosforamiditi in fase solida.

Diluizione dei primers

I primers liofilizzati sono stati sospesi in H_2O dietilpirocarbonato (DEPC). Nei tubini è stata aggiunta una quantità di H_2O DEPC tale da ottenere una concentrazione finale di 20 pmol/ μ l.

Gene	Accession number	Oligonucleotide sequences (5'→3')	
		<i>forward primer</i>	<i>reverse primer</i>
<i>IL-10</i>	AY029171.1	GCTGGAGGACTTTAAGGGTT ACCT	CTTGATGTCTGGGTCTTGGTT CT
<i>IL-15</i>	U14407	CCATCCAGTGCTACTTGTGTT TACTT	CCAGTTGGCTTCTGTTTTAGG AA
<i>IL-21</i>	NM_021803	CATGGAGAGGATTGTCATCT GTC	CAGAAATTCAGGGACCAAGT CAT
<i>IFN-γ</i>	NM_000619	GTTTTGGGTTCTCTTGGCTGT TA	AAAAGAGTTCCATTATCCGCT ACATC
<i>TNF-α</i>	NM_000594	CCCCAGGGACCTCTCTCTAA TC	GGTTTGCTACAACATGGGCTA CA
<i>TGF-β1</i>	NM_000660	CAAGGGCTACCATGCCAACT	AGGGCCAGGACCTTGCTG
<i>GAPDH</i>	NM_002046.2	ATGACATCAAGAAGGTGGTG	CATACCAGGAAATGAGCTTG

Tabella 2.1 - Tabella primers usati per la qRT-PCR.

2.3. PREPARAZIONE STRUMENTAZIONE E CAMPIONI PER LCM

I campioni biotici congelati sono stati tagliati al criostato (Leica CM1850; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Il taglio è stato effettuato a 8 µm e per ogni campione si sono ottenute 6 sezioni che sono state adagiate su un vetrino RNase-free dotato di una membrana di polietilene naftalato (PEN, Carl Zeiss MicroImaging, Munich, Germany), precedentemente incubato per 2 ore in cappa a flusso laminare sotto raggi UV per garantirne la sterilità. A questo punto si è

proceduto alla fissazione, colorazione e disidratazione delle sezioni di tessuto tagliate, seguendo il seguente protocollo:

- Fissazione in acetone freddo per 2 minuti in ghiaccio secco
- Idratazione in acqua RNase-free per 1 minuto
- Colorazione in Ematossilina Carazzi per 1 minuto.
- Disidratazione. Questa fase ha previsto 4 passaggi in una serie crescente di alcoli e xylene finale, tutti in ghiaccio secco:
 - Alcool 70 per 30 secondi
 - Alcool 95 per 15 secondi
 - Alcool 100 per 1 minuto
 - Xylene per 2 minuti
- Asciugatura all'aria a temperatura ambiente per 3 minuti

Il criostato, la vetreria e la plasticheira venivano trattate con RNaseZap[®], mentre le varie soluzioni acquose, quali tamponi e alcoli, sono state preparate con acqua RNase-free utilizzando il Dietilpirocarbonato (DEPC). Sia l' RNaseZap che il DEPC venivano utilizzati come decontaminanti allo scopo di inibire l'eventuale presenza di RNasi.

2.4. MICRODISSEZIONE LASER

I vetrini fissati, colorati e disidratati sono stati posizionati uno alla volta sul supporto portavetrini del microdissettore (Leica DM6000, Leica Microsystems). Il taglio del compartimento epiteliale veniva preceduto dal taglio del compartimento della lamina propria. I compartimenti prima selezionati, poi tagliati, venivano raccolti, per gravità, separatamente, in due provette eppendorf, posizionate al di sotto del supporto porta vetrini, contenenti buffer di estrazione (30 μ l) fornito dal PicoPure[®] RNA Isolation Kit (Life technologies, Italia) e inibitore di RNasi (1 μ l) (RNAsine 10U/ μ l, Promega, Italy).

La potenza del laser veniva settata tra 18-20 Watt. Quest'operazione è stata ripetuta più volte microdissezionando tutte le 6 criosezioni presenti su ciascun vetrino, in modo tale da ottenere una quantità di cellule pari a circa 5.000 per ogni campione (Fig. 2.1). Tale numero è stato da noi definito ottimale per estrarre una quantità di RNA sufficiente a determinare il profilo di espressione delle citochine nei due compartimenti mucosali isolati. Inoltre, è stato valutato il profilo trascrizionale delle citochine nelle cripte del Lieberkün, che è principalmente un compartimento proliferativo contenente cellule staminali intestinali, isolate dai campioni bioptici digiunali di 5 controlli e 5 celiaci non trattati. Terminata la microdissezione, la quale

avveniva in un tempo ottimale, da noi definito, di circa 45 minuti per campione, tale da garantire i migliori risultati in termini di resa dell'RNA, le due eppendorf contenenti le cellule provenienti rispettivamente dall'epitelio e dalla lamina propria, venivano incubate in un termociclatore a 42°C per 30 minuti, centrifugati a 16.000xg per 1-2 minuti, e conservati a -80°C fino al momento dell'estrazione dell'RNA.

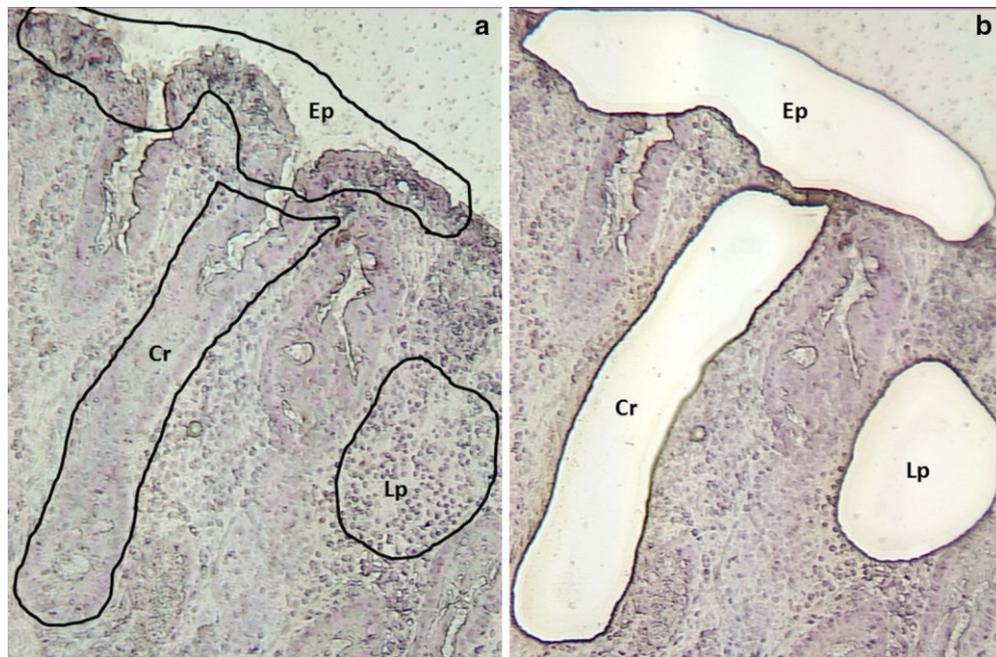


Fig. 2.1- Microdissezione selettiva dei compartimenti mucosali: epitelio (Ep), lamina propria (LP) e cripte del Lieberkühn (Cr). Le aree da microdissezionare vengono prima selezionate e poi raccolte in eppendorf differenti (a), dopo la microdissezione restano le aree vuote (b).

2.5. ESTRAZIONE DELL'RNA

L' RNA totale è stato estratto dai campioni LCM utilizzando il sistema Arcturus, PicoPure[®] RNA Isolation Kit (Life Technologies, Italia) seguendo il protocollo descritto della casa produttrice:

- Preparare le colonne per la purificazione dell'RNA:
 - Aggiungere 250 µl di Conditioning Buffer sulla membrana
 - Incubare a T.A. per 5'
 - Centrifugare a 16.000xg per 1'
- Aggiungere 31 µl di etanolo 70X ad ogni campione (l'etanolo va aggiunto in concentrazione 1:1) e spipettare senza centrifugare
- Aggiungere delicatamente la soluzione di etanolo e materiale biologico sulla colonna di purificazione
- Centrifugare prima a 100xg per 2' e poi a 16.000xg per 30''
- Aggiungere 100 µl di Washing Buffer 1 alla colonna e centrifugare a 8.000xg per 1'
- Effettuare trattamento con RNase-free DNase I (LIFE TECHNOLOGIES, ITALIA) per rimuovere eventuali contaminazioni di DNA (questo step è facoltativo, noi abbiamo ritenuto importante eseguirlo).

- Aggiungere 100 μ l di Washing Buffer 2 alla colonna e centrifugare a 8.000xg per 1'
- Aggiungere altri 100 μ l di Washing Buffer 2 alla colonna e centrifugare a 16.000xg per 2'
- Trasferire la colonna in un'epENDORF sterile da 0,5 ml
- Aggiungere 11 μ l di Elution Buffer direttamente sulla colonna
- Incubare a T.A. per 1'
- Centrifugare prima a 1.000xg per 1', poi a 16.000xg per 1'

La qualità dell' RNA estratto è stata saggiata usando il sistema elettroforetico automatizzato Experion™ (BioRad). L' RNA è stato poi conservato a -80°C, fino al momento della retrotrascrizione. Tutti i passaggi sono stati effettuati in condizioni di massima sterilità, utilizzando puntali RNasi-free con filtro e lavorando sotto cappa sterile.

2.6. ANALISI RT-PCR

Il protocollo di retrotrascrizione, opportunamente ottimizzato, è basato sui protocolli di Foley *et al.* (1993) e Leonard *et al.* (1993). Il cDNA è stato ottenuto dalla retrotrascrizione di 10 μ l di RNA in un volume finale di 20 μ l, tramite il kit SuperScript® VILO cDNA Synthesis Kit (Life Technologies, Italia) utilizzando Random Primers e seguendo le

istruzioni fornite dalla casa produttrice. I reagenti sono stati ottimizzati per ottenere il range dinamico nell'intervallo da 1 pg a 2,5 µg di RNA totale (Tabella 4).

Componenti della reazione	Volume per reazione
Reaction Mix 5X	4 µl
SuperScript VILO 10X	2 µl
H2O DEPC	4 µl
RNA Template	10 µl
Volume totale	20 µl

Tabella 4 – Reazione di retrotrascrizione.

La reazione è stata condotta a:

- 25°C per 10'
- 42°C per 90'
- 85°C per 5' (step necessario per inattivare la SuperScript)
- e quindi raffreddando a 4°C

Il cDNA è stato diluito 1:10 in TE (Tris EDTA) ed ogni campione così ottenuto è stato suddiviso in diverse aliquote in modo da evitare di ripetuti stress termici. I campioni sono stati conservati a -20°C e scongelati all'occorrenza.

Per l'analisi in Real Time-PCR (qPCR) si è scelta la chimica SYBR® Green, per la sua maggiore flessibilità operativa, utilizzando la Master Mix PowerSYBR Green PCR (Applied Biosystems) e come

normalizzatore del segnale, il sistema ROX. La reazione di amplificazione è avvenuta in piastre da 96 pozzetti (Applied, Biosystems, Italia) ed è stata allestita in un volume finale di 35 µl, con 10 µM primer, *forward e reverse* trascritto-specifici, e 2 µl di cDNA, come specificato in tabella 5. Si è ritenuto che la migliore concentrazione di MgCl₂ fosse di 2,5 mM, ovvero quella indicata dalla Master Mix PowerSYBR Green.

Componenti della reazione	Volume per reazione
Master Mix PowerSYBR Green PCR 2X	17,5 µl
Primer Forward	0,7 µl
Primer Reverse	0,7 µl
H ₂ O DEPC	14,1 µl
cDNA	2 µl
Volume finale	35 µl

Tabella 5 – Reazione di qPCR.

L'amplificazione/acquisizione è stata eseguita su un termociclatore ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) equipaggiato con software versione 1.2.3. I cicli di amplificazione ottimizzati sono mostrati nelle tabelle 6 (A e B), stabilendo la Temperatura di Melting (T_m) sulla base dei primer utilizzati.

CICLI OTTIMIZZATI:

a) CICLO A TRE STEP UTILIZZATO PER LA GAPDH

	Fase	Temperatura	Tempo
45 X {	Attivazione TaqGold®	95°C	10'
	Denaturazione	95°C	30''
	Annealing	55°C	30''
	Estensione	72°C	45''

Tabella 6A – Ciclo tristep.

b) CICLO A DUE STEP UTILIZZATO PER TUTTE LE CITOCHINE IN ANALISI

	Fase	Temperatura	Tempo
45 X {	Attivazione TaqGold®	95°C	10'
	Denaturazione	95°C	15''
	Estensione	60°C	1'

Tabella 6B – Ciclo bistep.

In entrambi i casi all'amplificazione è seguito un ciclo di dissociazione per la valutazione della specificità dei prodotti di amplificazione. Tutte le fasi sono state condotte in condizioni di sterilità. Tutti i punti sperimentali sono stati eseguiti in triplicato e diluizioni seriali di cDNA contenenti quantità note di ogni trascritto sono state usate in ogni qPCR per generare una curva standard.

I prodotti di amplificazione sono stati separati e successivamente controllati mediante elettroforesi su gel d' agarosio al 2%. La corsa

elettroforetica è stata effettuata a 90 V in tampone TBE 1X (Tris-HCl 0,45 M, acido borico 0,45 M, EDTA 2,5 mM) utilizzando un marcatore di peso molecolare (GeneRuler™ 50). Le bande corrispondenti ai prodotti di amplificazione sono state visualizzate mediante colorazione con bromuro di etidio (0,5 µg/ml, BioRad) e successivamente digitalizzate e acquisite attraverso lo strumento GelDoc 2000 (BIORAD).

2.7. PROFILI DI ESPRESSIONE DIFFERENZIALE

L'espressione genica è stata normalizzata rispetto al trascritto della Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*, gene housekeeping). Esperimenti preliminari hanno confermato che le reazioni di amplificazione erano completamente dipendenti dalla retrotrascrizione e che i prodotti di reazione si accumulavano linearmente rispetto al cDNA introdotto e al numero di cicli operato (dati non riportati). I dati di espressione sono stati analizzati con il software Data Assist (versione 3) (Applied Biosystems, Italia). I valori di espressione dei diversi trascritti sono stati calcolati con il metodo del $\Delta\Delta CT$ (Livak e Schmittgen, 2001) che rilascia l'indice RQ (*Relative Quantification*). Quando si confrontano più campioni nella

quantizzazione relativa, uno dei campioni è scelto come “calibratore” e l’espressione del gene target in tutti gli altri campioni è espressa come un aumento o una diminuzione rispetto a quella che esso ha nel calibratore. In particolare, nel nostro caso, è stato utilizzato come controllo endogeno l’amplicone per la GAPDH (*gene reference*) che ha consentito di normalizzare la quantità di mRNA del gene *target* e quindi determinare l’indice RQ che quantifica i livelli di trascritto del gene considerato, come calibratore è stata scelta la LP di uno dei controlli. Per determinare l’espressione relativa di un gene target in un campione test e nel calibratore usando un gene reference come normalizzatore, è necessario determinare i valori dei CT (ciclo soglia):

- i CT del gene *target* nel test e nel calibratore;
- i CT del *reference* nel test e nel calibratore.

Quindi, possono essere usati diversi metodi per determinare il livello di espressione del gene *target* nel campione test rispetto al calibratore, il metodo di Livak, da noi utilizzato, assume che sia il gene *target* che il *reference* siano amplificati con un’efficienza prossima al 100%. Una volta verificata l’efficienza di amplificazione, è stata determinata la differenza relativa nel livello di espressione del gene *target* con i seguenti steps:

1) Normalizzazione del CT del gene *target* con quello del *reference* (ref), sia per il test che per il calibratore:

$$\Delta\text{CT}(\text{test}) = \text{CT}(\text{target}, \text{test}) - \text{CT}(\text{ref}, \text{test})$$

$$\Delta\text{CT}(\text{calibratore}) = \text{CT}(\text{target}, \text{calibratore}) - \text{CT}(\text{ref}, \text{calibratore})$$

2) Normalizzazione del ΔCT del campione test con il ΔCT del calibratore:

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT}(\text{test}) - \Delta\text{CT}(\text{calibratore})$$

3) Calcolo del rapporto di espressione:

$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ = Rapporto di espressione normalizzato, ovvero quantificazione relativa (RQ)

Il risultato ottenuto è l'aumento o la diminuzione relative del livello di espressione del gene *target*. Normalizzando l'espressione del gene *target* con quella del *reference*, si compensano le differenze nella quantità di RNA analizzato e, quindi, del numero di cellule analizzate nelle microdissezioni operate.

2.8 ANALISI STATISTICA DEI DATI

I dati sono stati organizzati in Excel (Microsoft) per le successive analisi statistiche, che sono state eseguite in GraphPad Prism (GraphPad Software, CA, USA). I risultati sono stati presentati come espressione media normalizzata \pm l'errore standard (SEM). Le differenze tra i gruppi sono state comparate utilizzando il test *t* di Student e i test di analisi della varianza ad una via (ANOVA). Quando i test ANOVA indicavano differenze significative, venivano effettuati

ulteriori confronti individuali con analisi post hoc usando il test del confronto multiplo Bonferroni. E' stato accettato come statisticamente significativo un valore $p < 0.05$. Sono stati utilizzati anche test non parametrici (Kruskal-Wallis) e i risultati venuti fuori erano in accordo con quelli ottenuti usando i test parametrici.

3. RISULTATI

3.1. OTTIMIZZAZIONE PROTOCOLLO LCM

La fase iniziale del lavoro sperimentale è consistita nella definizione dei protocolli, sia per la microdissezione laser che per l'analisi dei trascritti, con l'obiettivo di ottimizzare la resa e la qualità dell'RNA estratto. In particolare per quanto riguarda il protocollo per la microdissezione laser, due sono stati i parametri maggiormente indagati: la scelta del fissativo per le criosezioni e i tempi di processazione dei campioni, cercando per quest'ultimo di ridurli al minimo. Infatti, dai protocolli presente in letteratura per la microdissezione laser, il tempo di processazione dei campioni, precedente l'analisi dei trascritti, risultava essere il parametro più critico in quanto incideva maggiormente sulla resa e la qualità dell'RNA estratto^(78-80,82). Per quanto riguarda la procedura di fissazione abbiamo comparato gli effetti di acetone e alcol a 70%, i due fissativi maggiormente utilizzati sulle criosezioni. Entrambi i fissativi si sono dimostrati ottimali per quanto concerne il mantenimento della morfologia del tessuto, tuttavia, le criosezioni fissate con l'acetone presentavano una minore resistenza al taglio con il laser durante la microdissezione. Abbiamo verificato che il maggiore ostacolo durante il taglio con il laser si verificava a livello

delle cellule mucipare, cariche di muco e, abbondantemente presenti nella mucosa intestinale. Pertanto, l'acetone, essendo uno dei principali solventi, presentava la capacità di sciogliere buona parte del muco presente nel tessuto, riducendo così la resistenza al taglio. Una minor resistenza durante il taglio significava, non solo ridurre i tempi di esecuzione per la micro dissezione, ma anche utilizzare una minor potenza del laser durante il taglio; quest'ultimo parametro inoltre risultava importante ai fini della resa in termini di quantità e qualità dell'RNA estratto. Infatti, l'utilizzo di una potenza bassa del laser significava incidere sul tessuto con una minore quantità di calore, diminuendo così il rischio di "bruciatura" e quindi di perdita dell'RNA a livello del tessuto adiacente al taglio.

In particolare, sulle criosezioni fissate con l'acetone veniva utilizzata una potenza del laser di circa 20W, in confronto alla potenza di 35 Watt utilizzata per il taglio delle criosezioni fissate con l'alcol 70%. Inoltre il tempo impiegato per il taglio di un mm² di LP da criosezioni fissate con acetone risultava essere di circa la metà rispetto al tempo impiegato per il taglio di un mm² di LP su criosezioni fissate con acetone.

Infine, considerando il numero minimo di circa 5000 cellule necessarie per l'analisi molecolare, abbiamo lavorato sul tempo necessario, per l'ottenimento di tale numero di cellule, durante la

microdissezione. Abbiamo evidenziato che la migliore resa e integrità dell'RNA si otteneva con tempi di microdissezione laser inferiori ai 45 minuti, i quali risultavano sufficienti per selezionare e raccogliere circa 5000 cellule per ogni compartimento.

3.2. OTTIMIZZAZIONE PROTOCOLLI PER RT – PCR

Nella fase iniziale della sperimentazione sono stati utilizzati diversi protocolli di estrazione di RNA al fine di determinare il metodo più adatto alle nostre esigenze. Preliminarmente sono stati confrontati i risultati quali/quantitativi di protocolli di estrazione basati sul metodo di Chomczynski-Sacchi (es. TRIzol[®], Invitrogen, Life Technologies, Italia) e su colonna a scambio ionico (PureLink[®] RNA Mini Kit -Life Technologies, Italia). I metodi, seguendo i protocolli sperimentali descritti dai produttori, si sono dimostrati inadeguati per gli scopi prefissati dal progetto di tesi. È stato necessario ricorrere a un sistema di estrazione di RNA su micro-colonna (PicoPure[®] RNA Isolation Kit, Arcturus[®], Life Technologies, Italia) ottimizzato per campioni microdissezionati. Dai risultati si è evinto che quest'ultimo metodo consentiva di ottenere rese maggiori in RNA totale da microdissezioni in cui il numero di cellule, come nel nostro caso, non superava 6000.

Anche per la fase di retrotrascrizione sono stati inizialmente comparati diversi kit commerciali: A) OmniScript (Qiagen), B) Superscript II - Reverse Transcriptase (Life Technologies), C) SuperScript[®] VILO[™] cDNA Synthesis Kit (Life Technologies, Italia), seguendo le istruzioni fornite della casa produttrice.

Si è deciso di utilizzare il kit SuperScript[®] VILO che si è dimostrato essere il più adeguato, per due motivi: A) maggiore dinamica (ampia linearità di risposta nelle reazioni di PCR a valle); B) pre-assemblaggio dei reagenti (random primers, dNTPs, buffer e inibitore di RNasi), che contribuisce a limitare i rischi di errore e contaminazione accidentale.

Per la qPCR l'ottimizzazione del protocollo è stata laboriosa: sono state effettuate numerose amplificazioni preliminari per determinare le migliori condizioni di amplificazione. Più in dettaglio, sono stati ottimizzati il volume di reazione, la concentrazione dei primers, la concentrazione di MgCl₂ e, infine, il numero di cicli di amplificazione. Dai dati ottenuti, il volume di reazione è stato fissato a 35µl, la concentrazione dei primers a 20 pmoli/ µl, la concentrazione di MgCl₂ migliore si è rivelata quella standard di 2,5 mM infine, il numero di cicli ottimale è stato fissato a 45.

3.3. AUMENTATA ESPRESSIONE DI CITOCHINE DELL' IMMUNITA' INNATA NEL COMPARTIMENTO EPITELIALE DELLA MUCOSA INTESTINALE DI CELIACI

L'espressione dei trascritti per il TNF- α e per l'IL-15 è stata quantificata, mediante qPCR, in campioni di epitelio (Ep) e di lamina propria (LP) da biopsie digiunali ottenute da 15 pazienti celiaci e 15 controlli sani. Dall'analisi dei dati è emerso che tutti i pazienti celiaci presentavano una maggiore espressione del trascritto per il TNF- α e per l'IL-15 rispetto ai controlli; tale aumento si riscontrava sia confrontando i compartimenti epiteliali, sia confrontando i compartimenti della LP. In particolare per il TNF- α , il trascritto era significativamente aumentato ($p < 0,05$) nell'Ep dei celiaci se paragonato all'Ep dei soggetti controllo (Fig. 3.1). Anche a livello della LP dei celiaci il trascritto per il TNF- α , è risultato essere significativamente più elevato ($p < 0,05$) rispetto al compartimento della LP dei controlli (Fig. 3.1). Inoltre, nell'ambito del gruppo dei pazienti celiaci, il trascritto per il TNF- α era significativamente aumentato ($p < 0,05$) nel compartimento epiteliale rispetto al compartimento costituito dalla LP (Fig. 3.1). Nessun incremento significativo ($p > 0,05$), del trascritto per il TNF-alfa è stato riscontrato,

invece, paragonando i due compartimenti nell'ambito del gruppo dei soggetti controllati (Fig. 3.1).

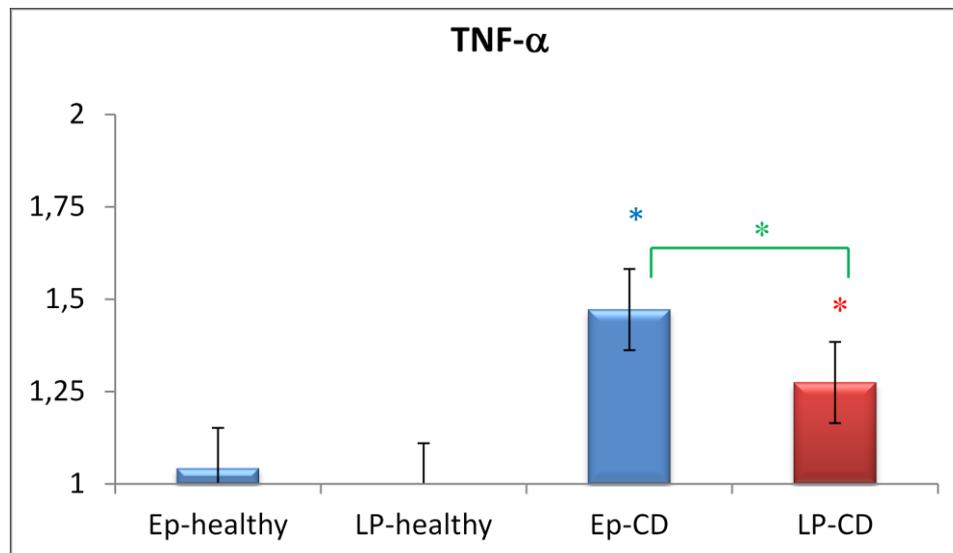


Fig. 3.1 – Espressione differenziale del TNF- α . Healthy sta per controlli sani e CD sta per pazienti celiaci.

- * $p < 0,05$ Ep-CD vs Ep-healthy
- * $p < 0,05$ LP-CD vs LP-healthy
- * $p < 0,05$ Ep-CD vs LP-CD

Stesso trend si riscontrava per quanto riguarda l'espressione del trascritto per l'IL-15. Infatti, tale citochina nei celiaci rispetto ai controlli, risultava significativamente aumentata (Fig. 3.2) sia paragonando fra di loro i due compartimenti epiteliali ($p < 0,05$) sia confrontando tra di loro i due compartimento della LP ($p < 0,05$) (Fig. 3.2). Altresì, all'interno del gruppo dei celiaci, il trascritto per l'IL-15 risultava significativamente incrementato ($p < 0,05$) nel compartimento epiteliale rispetto al compartimento della LP (Fig. 3.2). Non è risultata

statisticamente significativa la differenza di espressione del trascritto paragonando Ep e LP dei soli controlli ($p > 0,05$).

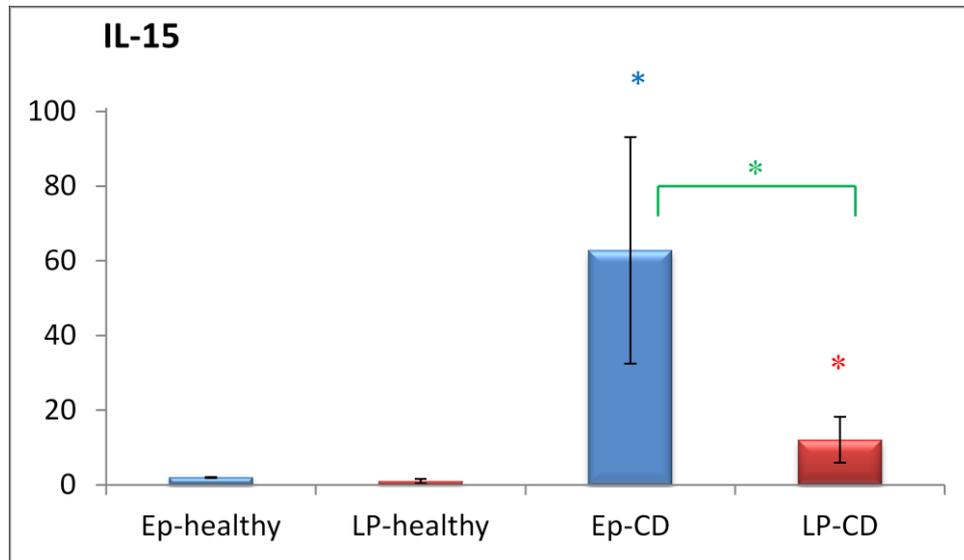


Fig. 3.2 – Espressione differenziale dell'IL-15.

- * $p < 0,05$ Ep-CD vs Ep-healthy
- * $p < 0,05$ LP-CD vs LP-healthy
- * $p < 0,05$ Ep-CD vs LP-CD

3.4. AUMENTATA ESPRESSIONE DI CITOCHINE DELL' IMMUNITA' ADATTATIVA NEL COMPARTIMENTO DELLA LP DELLA MUCOSA INTESTINALE DI CELIACI

L'espressione dei trascritti per il IFN-gamma e per l'IL-21 è stata quantificata, mediante qPCR, in campioni di Ep e di LP da biopsie digiunali prelevate da 15 pazienti celiaci e 15 controlli sani. Dall'analisi dei dati è emerso che tutti i pazienti con celiachia presentavano una maggiore espressione del trascritto per l'IFN- γ rispetto ai controlli, paragonando entrambi i compartimenti mucosali. In particolare il trascritto per l'IFN- γ risultava significativamente più espresso ($p < 0,05$) a livello dell'Ep dei soggetti celiaci rispetto all'Ep dei controlli (Fig. 3.3). Anche a livello della LP il trascritto era significativamente aumentato ($p < 0,05$) nei celiaci, rispetto ai controlli (Fig. 3.3). Nel gruppo dei celiaci risultava, inoltre, un significativo aumento ($p < 0,05$) del trascritto a livello della LP, rispetto al compartimento epiteliale (Fig. 3.3). Non è risultata statisticamente significativa la differenza di espressione del trascritto paragonando Ep e LP dei soli controlli ($p > 0,05$).

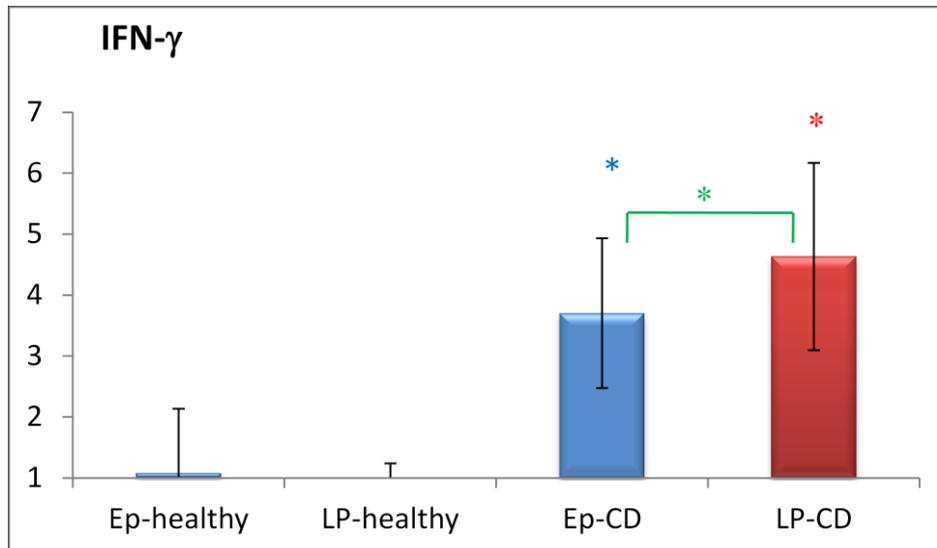


Fig. 3.3 – Espressione differenziale dell'IFN- γ .

- * $p < 0,05$ Ep-CD vs Ep-healthy
- * $p < 0,05$ LP-CD vs LP-healthy
- * $p < 0,05$ Ep-CD vs LP-CD

Per quanto riguarda il trascritto per l'IL-21 dall'analisi dei dati, è emerso, che tale citochina era significativamente più espressa ($p < 0,005$) nella LP dei pazienti celiaci rispetto alla LP dei controlli (Fig. 3.4); nessuna differenza statisticamente significativa si riscontrava invece paragonando il compartimento epiteliale dei due gruppi di soggetti. Nell'ambito dei pazienti celiaci, il trascritto risultava significativamente più alto ($p < 0,05$) a livello della LP, in confronto al compartimento epiteliale (Fig. 3.4). Nell'ambito del

gruppo dei controlli, invece, si notava una maggiore espressione, statisticamente significativa ($p < 0,05$), del trascritto per l'IL-21 a livello epiteliale rispetto alla LP (Fig. 3.4).

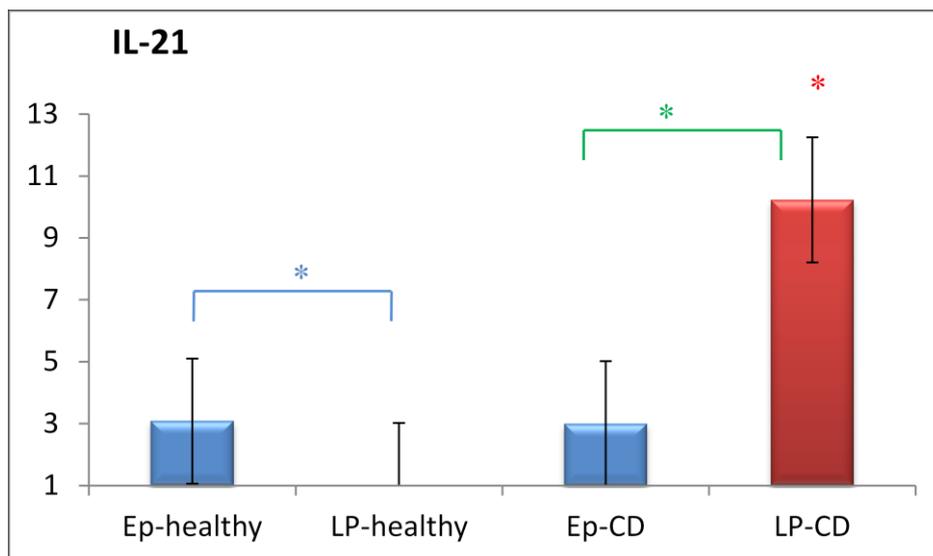


Fig. 3.4 – Espressione differenziale dell'IL-21.

- * $p < 0,05$ LP-CD vs LP-healthy
- * $p < 0,05$ LP-CD vs Ep-CD
- * $p < 0,005$ Ep-healthy vs LP-healthy

3.5. AUMENTATA ESPRESSIONE DI CITOCHINE IMMUNOREGOLATORIE NEI COMPARTIMENTI MUCOSALI: EPITELIO E LP, DI CELIACI

L'espressione dei trascritti per il TGF- β e per l'IL-10 è stata quantificata, mediante qPCR, in campioni di Ep e di LP da biopsie digiunali di 15 pazienti celiaci e 15 controlli sani. Dall'analisi dei dati è emerso che tutti i pazienti celiaci presentavano una maggiore espressione di entrambi i trascritti rispetto ai controlli, sia confrontando i compartimenti epiteliali, sia i compartimenti della LP. In particolare confrontando i livelli di espressione del TGF- β nel compartimento epiteliale si notava un significativo aumento ($p < 0,05$) degli stessi nell'Ep dei celiaci, rispetto ai controlli (Fig. 3.5). Anche a livello del compartimento della LP, il trascritto risultava significativamente più espresso ($p < 0,05$) nella LP dei celiaci rispetto alla LP dei controlli (Fig. 3.5). Nell'ambito dei celiaci, pur risultando alta l'espressione del TGF- β in entrambi i compartimenti, non risultavano differenze statisticamente significative ($p > 0,05$) nei livelli di trascritto paragonando i due compartimenti. Nei controlli, si notava un aumento statisticamente significativo ($p < 0,05$) nei livelli di TGF- β a livello dell'Ep rispetto alla LP.

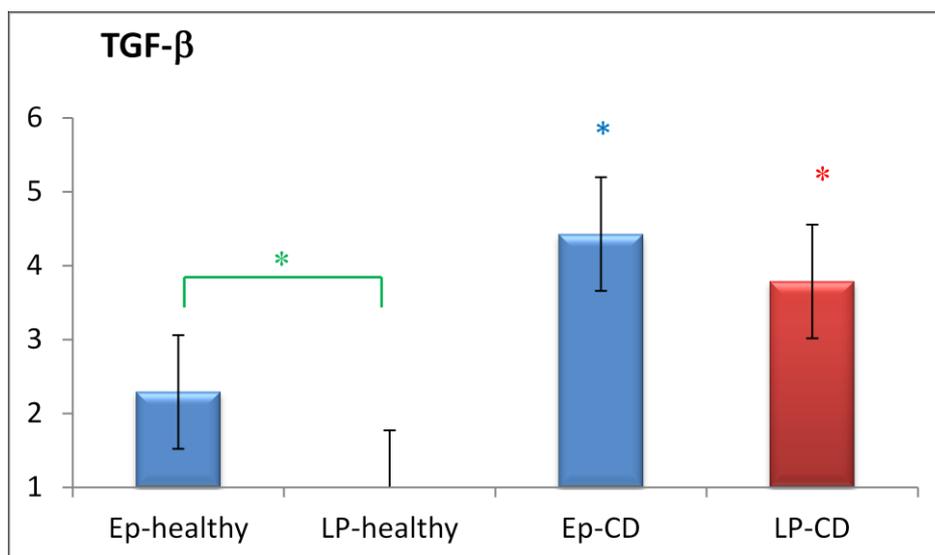


Fig. 3.5 – Espressione differenziale del TGF-β.

- * $p < 0,05$ Ep-CD vs Ep-healthy
- * $p < 0,05$ LP-CD vs LP-healthy
- * $p < 0,05$ Ep-healthy vs LP-healthy

Per quanto concerne l'IL-10, confrontando i livelli di espressione della citochina nell'Ep di entrambi i gruppi, si notava un significativo aumento ($p < 0,05$) nel compartimento epiteliale dei celiaci rispetto ai controlli (Fig. 3.6). Il trascritto risultava significativamente più alto ($p < 0,05$) anche a livello della LP dei celiaci, in confronto alla LP dei controlli (Fig. 3.6). Nell'ambito dei pazienti con MC, non si sono riscontrate differenze significative ($p > 0,05$) tra i livelli di trascritto presenti nei due compartimenti mucosali, pur essendo presenti alti livelli di IL-10, rispetto ai controlli, in entrambi i compartimenti. Nel gruppo dei controlli, così come riportato per il TGF-β, anche per l'IL-

10, si notava un aumento, statisticamente significativo ($p < 0,05$) a livello epiteliale rispetto alla LP (Fig. 3.6).

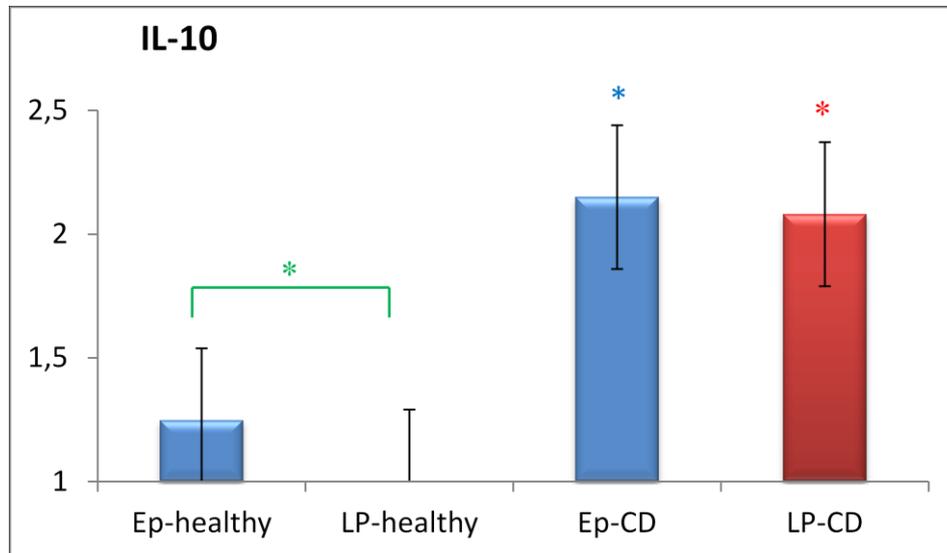


Fig. 3.6 – Espressione differenziale dell'IL-10.

- * $p < 0,05$ Ep-CD vs Ep-healthy
- * $p < 0,05$ LP-CD vs LP-healthy
- * $p < 0,05$ Ep-healthy vs LP-healthy

4. DISCUSSIONE

Nel presente lavoro è stata sperimentata per la prima volta un'analisi differenziale del pattern delle citochine espresse nella mucosa intestinale dei pazienti celiaci, specificatamente a livello del compartimento epiteliale e del compartimento della lamina propria. La microdissezione laser è stata utilizzata come tecnica per la separazione dei due compartimenti, mentre l'espressione delle citochine è stata valutata mediante analisi dei trascritti eseguita RT-PCR.

La maggior parte dei lavori presente in letteratura riguardanti lo studio del pattern di citochine presenti nella mucosa intestinale dei celiaci, è stata eseguita isolando le cellule da biopsie intere, mediante omogeneizzazione^(83,84), oppure isolando una particolare popolazione cellulare mediante immuno-separazione magnetica⁽⁸⁵⁾. Tali tecniche comunque, non hanno consentito di definire il ruolo dei singoli compartimenti tissutali nella risposta immune mucosale e hanno portato spesso a risultati contrastanti. Inoltre, alcuni lavori sono stati eseguiti separando il compartimento epiteliale da quello della LP mediante l'utilizzo di agenti chelanti del calcio (EDTA)⁽⁸⁶⁾. Si evidenzia che l'utilizzo degli agenti chelanti non portava mai ad una separazione completa tra i due compartimenti, generando così delle contaminazioni fra le cellule appartenenti all'epitelio con quelle appartenenti alla LP e viceversa. Tale contaminazione portava

ovviamente ad una inaccuratezza dei risultati. Alla luce dei suddetti problemi, nel presente studio, abbiamo utilizzato una tecnica che finora non era mai stata utilizzata per determinare il pattern di citochine espresse ed il ruolo giocato dai singoli compartimenti mucosali nella patogenesi della MC. La LCM, infatti, permette di superare il problema della *cross*-contaminazione tra le popolazioni cellulari appartenenti a compartimenti tissutali diversi, in quanto consente di raccogliere popolazioni omogenee di cellule intatte da zone ben definite del tessuto, per l'esecuzione di analisi molecolari. I sistemi di microdissezione laser permettono di estrarre le cellule senza che vi sia un contatto fisico con esse, evitando ogni genere di contaminazione da materiale genetico o da strutture proteiche. Si determina, quindi, una maggiore "pulizia" del lavoro, inoltre la selezione mirata delle cellule permette di evitare interferenze di componenti cellulari (acidi nucleici e proteine) provenienti da altre cellule copresenti nella sezione istologica.

La prima parte del lavoro è stata dedicata alla definizione dei protocolli per la microdissezione laser e per l'analisi dei trascritti, con lo scopo di ottimizzare la resa e la qualità dell'RNA estratto.

Riguardo il protocollo per la microdissezione laser, sono stati definiti i parametri del raggio laser e l'efficienza di cattura per il prelievo dei due compartimenti studiati. Abbiamo definito che la potenza del

raggio laser ottimale era di circa 20W; tale risultato era ottenuto essenzialmente utilizzando l'acetone come fissativo in quanto, a differenza degli altri fissativi, l'acetone provocava una minor resistenza del tessuto durante il taglio. L'utilizzo del laser a bassa potenza e, quindi, a bassa energia, ha consentito l'ottenimento di una maggiore resa dell'RNA, specialmente nelle zone di tessuto adiacente al taglio. Infine, abbiamo definito come 5000 il numero di cellule ottimale per le successive analisi molecolari eseguite.

Per le analisi molecolari, abbiamo sperimentato l'uso di diversi protocolli e kit commerciali per l'estrazione dell'RNA, per la sua retrotrascrizione e per l'analisi in qPCR. Svitati metodi, seguendo i protocolli sperimentali descritti dai produttori, si sono dimostrati inadeguati per gli scopi prefissati dal progetto di tesi. Siamo giunti alla conclusione che, nelle condizioni da noi utilizzate, i kit che hanno permesso di ottenere risultati più accurati risultavano essere i seguenti:

- Per l'estrazione dell'RNA è stato utilizzato un sistema di estrazione su micro-colonna (PicoPure[®] RNA Isolation Kit, Arcturus[®], Life Technologies, Italia), ottimizzato per campioni micro-dissezionati. Il protocollo ci ha consentito di ottenere rese maggiori in RNA totale da un numero di cellule di circa 5000.

- Per la retrotrascrizione, il kit SuperScript[®]VILO (*Variable Input Linear Output*) reverse transcriptase (Life Technologies, Italia) si è rivelato il più adatto, in quanto caratterizzato da una maggiore dinamica, se comparato ad altri sistemi di retrotrascrizione. Inoltre, il pre-assemblaggio dei reagenti è una caratteristica che ha contribuito a limitare i rischi di errore e contaminazione accidentale.
- Per la PCR sono stati preliminarmente ottimizzati numerosi parametri che hanno riguardato la scelta della *MasterMix* utilizzata, le concentrazioni dei primers, la concentrazione di MgCl₂, le temperature di annealing, i volumi di reazione e, infine, il numero di cicli di amplificazione.

Diversi studi hanno evidenziato il coinvolgimento, nella patogenesi della malattia celiaca, sia di citochine a prevalente azione infiammatorie sia di citochine a prevalente azione immunoregolatoria^(54-56,74,77,87).

Nel presente lavoro, abbiamo valutato l'espressione, da parte dell'epitelio e della lamina propria intestinale, dell'IL-15, del TNF- α , dell'IFN- γ e dell'IL-21, come citochine infiammatorie, del TGF- β e dell'IL-10 come citochine antinfiammatorie. Tale espressione è stata valutata come mRNA, mediante RT-PCR.

I nostri dati dimostrano, una maggiore espressione dei trascritti sia delle citochine infiammatorie sia di quelle antinfiammatorie, nella mucosa intestinale dei pazienti celiaci rispetto ai controlli. Tale aumento si riscontrava sia confrontando i compartimenti epiteliali sia confrontando i compartimenti della lamina propria, nei due gruppi di soggetti. Questi dati suggeriscono che sia l'epitelio che la lamina propria, nei celiaci in fase florida, hanno un ruolo, non solo nella risposta infiammatoria di tipo Th1, ma anche nella risposta immunoregolatoria; difatti, quest'ultima risposta si dimostrava mediante la produzione di citochine antinfiammatorie, quali IL-10 e TGF- β , le quali hanno il ruolo di controbilanciare l'infiammazione. Inoltre, nell'ambito del gruppo dei celiaci, in particolare per quanto riguarda le citochine infiammatorie, l'epitelio rappresentava la sede di maggior produzione dell'IL-15 e del TNF- α , mentre la lamina propria risultava essere la sede di maggior produzione di IFN- γ e IL-21. Questo dato dimostra che l'epitelio, per la forte produzione di IL-15 rispetto alla lamina propria, potrebbe essere maggiormente coinvolto nella risposta innata, mentre la lamina propria, per la forte produzione di IFN- γ rispetto all'epitelio, sembrerebbe sede primaria della risposta immunitaria adattativa. Inoltre, i nostri dati supportano l'ipotesi attuale degli enterociti della mucosa dei celiaci come principali produttori di IL-15 e delle cellule CD4+ della lamina propria, come

principali produttori dell'IFN- γ ⁽⁴⁶⁾. Possiamo quindi ipotizzare che, nei celiaci l'antigene gliadina a livello del lume intestinale incontra l'epitelio dei villi, innescando come prima risposta quella innata, il cui mediatore principale è IL-15; quest'ultima citochina induce l'espressione autocrina del MICA e dell'HLA-E sugli enterociti, e del NKG2D/CD94 sui linfociti CD8⁺ citotossici intraepiteliali. L'interazione tra il MICA e l'NKG2D e tra HLA-E e il CD94 trasforma i linfociti T CD8⁺ intraepiteliali in cellule NK, con conseguente rapida lisi delle cellule epiteliali ed aumento della permeabilità intestinale^(39,49,60). Pertanto, con l'aumento della permeabilità, l'antigene arriva anche a livello della lamina propria, determinando l'innescamento della risposta adattativa da parte delle cellule CD4⁺ gliadina-specifiche con forte produzione di IFN- γ .

Nell'ambito dei soggetti controllo, invece, una differenza riguardo le citochine infiammatorie, si riscontrava solo per l'IL-21, che risultava essere maggiormente presente nell'epitelio rispetto alla lamina propria. Nessuna differenza invece, si riscontrava, riguardo la produzione di TNF- α , IL-15 e IFN- γ confrontando i due compartimenti.

Per quanto riguarda la differenza di espressione delle citochine antinfiammatorie nell'ambito dei rispettivi gruppi, nei celiaci non risultava nessuna differenza statisticamente significativa nella

produzione del TGF- β e dell'IL-10, confrontando i due compartimenti mucosali. Tuttavia è importante evidenziare che, nei celiaci in fase florida della malattia, la forte produzione del TGF- β e IL-10, rispetto ai controlli, sia nell'epitelio che nella lamina propria, suggerisce che entrambi i compartimenti sono parimenti coinvolti a ristabilire l'omeostasi immunologica della mucosa.

Nei controlli, invece, si riscontrava un aumento statisticamente significativo dei livelli dei trascritti, sia per TGF- β , sia per l'IL-10, nell'epitelio rispetto alla LP. L'aumento di tali citochine immunoregolatrici nei controlli potrebbe essere funzionale al mantenimento dell'omeostasi immune mucosale, in quanto tali citochine potrebbero smorzare un'eventuale risposta infiammatoria che potrebbe alterare l'integrità della barriera epiteliale, consentendo così agli antigeni esogeni di invadere i compartimenti subepiteliali.

Abbiamo, inoltre, analizzato anche i livelli di mRNA delle suddette citochine nelle cripte del Lieberkühn, isolate da campioni biopsici digiunali su 5 controlli sani e 5 pazienti celiaci non trattati. Nessun aumento dei livelli di espressione genica di tutte le citochine indagate sono stati notati nelle cripte di Lieberkühn di entrambi i gruppi di pazienti (dati non riportati). Questi dati hanno dimostrato l'assenza di una risposta immunitaria al glutine in questo particolare comparto

della mucosa, che pertanto si conferma essere esclusivamente un compartimento proliferativo, gestito da cellule staminali⁽⁸⁸⁾.

5. CONCLUSIONI

In conclusione i nostri dati confermano la presenza, a livello della mucosa intestinale dei celiaci in fase florida, di una risposta infiammatoria di tipo Th1. In particolare, abbiamo dimostrato che l'epitelio rappresenta la sede di produzione di citochine proinfiammatorie che hanno un ruolo nell'immunità innata, mentre la lamina propria risulta essere la sede di sintesi di citochine proinfiammatorie che hanno un ruolo nella risposta immunitaria adattativa. Infine, entrambi i compartimenti producono elevati livelli di citochine con dominante attività soppressoria, per controbilanciare la risposta infiammatoria che si innesca sia a livello dell'epitelio che della LP.

Questo studio sottolinea l'importanza della LCM come un valido strumento per determinare, nella risposta immune mucosale, l'esatto ruolo dei vari compartimenti tissutali nonché delle singole popolazioni cellulari nella patogenesi della malattia celiaca. Tale tecnica, combinata alla qPCR, si è dimostrata valida per determinare il “transcriptional profiling” dei geni per le citochine e si può prevedere

che possa essere estesa anche ad altre patologie infiammatorie croniche dell'intestino.

6. PROSPETTIVE FUTURE

Abbiamo previsto di proseguire con il presente lavoro, ampliando la casistica e le citochine in esame. Il nostro scopo sarà poi quello di verificare se, effettivamente, le variazioni riscontrate nei livelli di espressione dei trascritti analizzati, corrispondono a variazioni nei livelli di proteine nei due compartimenti mucosali, passando dalla genomica alla proteomica. Sarà inoltre interessante analizzare il ruolo delle singole popolazioni cellulari nella patogenesi della MC, passando quindi dalle analisi sui compartimenti tissutali, alle analisi sulle singole cellule (macrofagi, linfociti CD4+, linfociti CD8+, ecc.).

7. BIBLIOGRAFIA PARTE 1

1. Maki M, Collin P. Coeliac disease. *Lancet* 1997; 349:1755-9.
2. Volta U, Bellentani S, Bianchi FB et al. High prevalence of celiac disease in Italian general population. *Dig.Dis.Sci* 2001; 46:1500-5.
3. Auricchio S, Troncone R, Maurano F. Coeliac disease in the year 2000. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999; 31: 773-780.
4. Peter H.R. Green Kamran Rostami Michael N. Marsh Best Practice & Research Clinical Gastroenterology Vol. 19, No. 3, pp. 389–400, 2005
5. Corazza G, Valentini RA, Frisoni M et al. Gliadin immune reactivity is associated with overt and latent enteropathy in relatives of celiac patients. *Gastroenterology* 1992; 103:1517-22.
6. Troncone R. Latent coeliac disease in Italy. The SIGEP Working Group on Latent Coeliac Disease. Italian Society for Paediatric Gastroenterology and Hepatology. *Acta Paediatr.* 1995; 84:1252-7.
7. Holmes GK. Potential and latent coeliac disease. *Eur. J. Gastroenterol.Hepatol.* 2001; 13:1057-60.
8. Troncone R, Greco L, Mayer M. Latent and potential coeliac disease. *Acta Paediatr Suppl.* 1996; 412:10-4.
9. Weiser H. Relation between gliadin structure and celiac toxicity. *Acta Paediatr Suppl.* 1996 May; 412: 3-9. Review.
10. Weiser H., Springer G., Belitz H.D., Ashkenazi A., Idar D. Toxicity of different Wheat gliadins in coeliac disease *Z. Lebensm Unters Forsch.*1982; 175(5): 321-6.
11. Silano M, Vincentini O, De Vincenzi M. Toxic, immunostimulatory and antagonist gluten peptides in celiac disease. *Curr Med Chem.* 2009; 16:1489-98.
12. Maiuri L, Troncone R, Mayer M. In vitro activities of A-gliadin-related synthetic peptides: damaging effect on the atrophic coeliac mucosa and activation of mucosal immune response in the treated coeliac mucosa. *Scand J Gastroenterol.* 1996; 31:247-53.
13. Tatham AS, Marsh MN, Wieser H, Shewry PR. Conformational studies of peptides corresponding to the coeliac-activating regions of wheat alpha-gliadin. *Biochem J.* 1990; 270:313-8.
14. Cornell H, Wieser H, Belitz HD. Coeliac active peptides from gliadin: large-scale preparation and characterization. *Clin Chim Acta.* 1992, 213:37-50.

15. Wieser H. The precipitating factor in coeliac disease. *Baillieres Clin Gastroenterol.* 1995;9:191-207.
16. Shidrawi RG, Day P, Przemioslo R. In vitro toxicity of gluten peptides in coeliac disease assessed by organ culture. *Scand J Gastroenterol.* 1995; 30:758-63.
17. Weiser H., Springer G., Belitz H.D., Ashkenazi A., Idar D. Toxicity of different Wheat gliadins in coeliac disease *Z. Lebensm Unters Forsch.* 1982; 175(5):321-6.
18. Catassi C, Rossini M, Räscher IM, et al. Dose dependent effects of protracted ingestion of small amounts of gliadin in coeliac disease children: a clinical and jejunal morphometric study. *Gut* 1993; 34:1515-9.
19. Greco L, Romino R, Coto I, Di Cosmo N, Percopo S, Maglio M et al. The first large population based twin study of coeliac disease. *Gut.* 2002; 50:624-628.
20. Karinen H, Kärkkäinen P, Pihlajamäki J, HLA genotyping is useful in the evaluation of the risk for coeliac disease in the 1st-degree relatives of patients with coeliac disease. *Scand J Gastroenterol.* 2006 Nov;41(11):1299-304
21. Clot F, Babron MC. Genetic of celiac disease. *Mol Genet Metab.* 2000; 71 (1-2) :76-80.
22. Wolters VM, Wijmenga C. Genetic background of celiac disease and its clinical implications. *Am J Gastroenterol.* 2008; 103(1):190-5.
23. Megiorni F, Mora B, Bonamico M. HLA-DQ and susceptibility to celiac disease: evidence for gender differences and parent-of-origin effects. *Am J Gastroenterol.* 2008; 103(4):997-1003. Epub 2008 Jan 2.
24. Louka AS, Moodie SJ, Karell K, Bolognesi E, Ascher H, Greco L et al. A collaborative European search for non-DQA1*05-DQB1*02 celiac disease loci on HLA-DR3 haplotypes: analysis of transmission from homozygous parents. *Hum Immunol.* 2003; 64:350-358.
25. Holopainen P. et al. Candidate gene regions and genetic heterogeneity in gluten sensitivity. *Gut* 2001; 48: 696-701.
26. Sollid LM, Haraldsen G, Bakke O et al. Major histocompatibility complex class II-dependent antigen presentation by human intestinal endothelial cells. *Gastroenterology.* 1998; 114(4): 649-56.
27. Gianfrani C., Troncone R., Mugione P., Cosentini E., De Pascale M., Faruolo C., Senger S., Terrazzano G., Southwood S., Auricchio S., Sette A. Celiac disease association with CD8+ T cell responses: identification of a novel gliadin-derived HLA-A2-restricted epitope. *J. Immunol.* 2003; 170(5): 2719-26.

28. Mazzarella G, Stefanile R, Camarca A, et al. Gliadin activates HLA Class I-restricted CD8+ T-cells in coeliac intestinal mucosa and induces the enterocyte apoptosis. *Gastroenterology* 2008;134:1017-27.
29. Halstensen T.S., Brandtzaeg P. TCR gamma/delta+ and CD8+ TCR alpha/beta+ intraepithelial lymphocytes (IEL) express proliferation marker (Ki-67) in the coeliac lesion. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1995; 371B: 1333-8.
30. Howell MD, Austin RK, Kelleher D. An HLA-D region restriction fragment length polymorphism associated with celiac disease. *J Exp Med.* 1986 July 1; 164(1): 333–338.
31. Caffrey C, Hitman GA, Niven MJ. HLA-DP and coeliac disease: family and population studies. *Gut* 1990; 31:663-667.
32. Arentz-Hansen H, Korner R, Molberg O et al. The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *J Exp Med.* 2000 Feb 21;191(4):603-12.
33. Sollid LM, Molberg O, McAdam S, Lundin KE. Autoantibodies in coeliac disease: tissue transglutaminase--guilt by association? *Gut.* 1997 Dec;41(6):851-2.
34. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nature Medicine* 1997; 3:797 – 801.
35. Shan L, Molberg O, Parrot I, et al. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science* 2002;297:2275-9.
36. Gianfrani C, Troncone R, Mugione P. et al. Celiac disease association with CD8+ T cell responses: identification of a novel gliadin-derived HLA-A2-restricted epitope. *J.Immunol.* 2003 Mar. 1; 170(5): 2719-26.
37. Gianfrani C, Auricchio S, Troncone R. Adaptive and innate immune responses in celiac disease. *Immunol Lett.* 2005 Jul 15;99(2):141-5. Epub 2005 Apr 7.
38. Barone MV, Zanzi D, Maglio M, et al. Gliadin-mediated proliferation and innate immune activation in celiac disease are due to alterations in vesicular trafficking. *PLoS One.* 2011 Feb 25;6(2):e17039.
39. Maiuri L., Ciacci C., Auricchio S., Brown V., Quarantino S., Londei M. Interleukin 15 mediates epithelial changes in celiac disease. *Gastroenterology.* 2000.
40. Shan L, Qiao SW, Arentz-Hansen H, et al. Identification and analysis of multivalent proteolytically resistant peptides from gluten: implication for celiac sprue. *J Proteome Res* 2005;4:1732-41.

41. Vilasi S, Sirangelo I, Irace G, et al. Interaction of 'toxic' and 'immunogenic' A-gliadin peptides with a membrane-mimetic environment. *J Mol Recognit.* 2010 May-Jun;23(3):322-8.
42. Ellis H.J., et al. Investigation of the putative immunodominant T cell epitopes in coeliac disease. *Gut*, 2003. 52(2): p. 212-7.
43. Meresse B, Chen Z, Ciszewski C, et al. Coordinated induction by IL-15 of a TCR independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity* 2004;21:357-66.
44. Drago S, El Asmar R, Di Pierro M, Gliadin, zonulin and gut permeability: Effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines. *Scand J Gastroenterol.* 2006 Apr;41(4):408-19.
45. Carla Esposito, Ph.D., Francesco Paparo, Ivana Caputo, Ph.D., Raffaele Porta, Ph.D., Virginia M. Salvati, Ph.D., Giuseppe Mazzarella, Salvatore Auricchio, M.D., and Riccardo Troncone, M.D. Expression and Enzymatic Activity of Small Intestinal Tissue Transglutaminase in Celiac Disease *Am J Gastroenterol* 2003;98:1813–1820.
46. Nilsen EM, Jahnsen FL, Lundin KE, Johansen FE, Fausa O, Sollid LM, Jahnsen J, Scott H, Brandtzaeg P. Gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon gamma in patients with celiac disease. *Gastroenterology.* 1998 Sep;115(3):551-63
47. Londei, M., et al. Gliadin as a stimulator of innate responses in celiac disease. *Mol Immunol*, 2005. 42(8): p. 913-8.
48. Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, et al. Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in celiac disease. *Lancet* 2003;362:30-7.
49. Maiuri L., Ciacci C., Vacca L., Ricciardelli I., Auricchio S., Quarantino S., Londei M. IL-15 drives the specific migration of CD94+ and TCR-gamma/delta+ intraepithelial lymphocytes in organ cultures of treated celiac patients. *Am. J. Gastroenterol.* 2001 Jan; 96(1): 150-6.
50. K E Smedby, M Åkerman, H Hildebrand, et al. Malignant lymphomas in coeliac disease: evidence of increased risks for lymphoma types other than enteropathy-type T cell lymphoma *Gut.* 2005 January; 54(1): 54–59.
51. Troncone R, Gianfrani C, Mazzarella G, et al. The majority of gliadin-specific T cell clones from the coeliac small intestinal mucosa produce both γ -interferon and IL 4. *Dig Dis Sci* 1998;43:156-61.

52. Salvati V.M., MacDonald T.T., Mazzarella G., Lionetti P., Troncone R., Monteleone G. et al. Enhanced expression of interferon regulatory factor-1 in celiac disease mucosa. *Pediatr. Res*: 2003 Jun 4.
53. Mazzarella G., MacDonald T.T., Salvati V.M., Mulligan P., Pasquale L., Stefanile R. et al. Activation of signal transducer and activator of transcription 1 in celiac disease *Am. J. Path.* 2003; 162: 1845-1855.
54. Garrote JA, Go´mez E, Leo´n AJ, et al. Cytokine, chemokine and immune activation pathway profiles in celiac disease: an immune system activity screening by expression macroarrays. *Drug Target Insights* 2008;3:1–11.
55. Nilsen EM, Lundin KE, Krajci P, Scott H, Sollid LM, Brandtzaeg P. Gluten specific, HLA DQ restricted T cells from coeliac mucosa produce cytokines with Th1 or Th0 profile dominated by interferon gamma. *Gut* 1995; 37: 766-776.
56. Daniela De Nitto, Ivan Monteleone, Eleonora Franzè, Involvement of interleukin-15 and interleukin-21, two γ -chain-related cytokines, in celiac disease *World J Gastroenterol* 2009 October 7; 15(37): 4609-4614.
57. Przemioslo RT, Kontakou M, Nobili V, Ciclitira PJ: Raised pro-inflammatory cytokines interleukin-6 and tumour necrosis factor α in coeliac mucosa detected by immunohistochemistry. *Gut* 35: 1398-1403,1994.
58. Mention JJ, Ben Ahmed M, Bègue B, Barbe U, Verkarre V, Asnafi V, Colombel JF, Cugnenc PH, Ruemmele FM, McIntyre E, Brousse N, Cellier C, Cerf-Bensussan N. Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. *Gastroenterology* 2003; 125: 730-745.
59. Benahmed M, Meresse B, Arnulf B, Barbe U, Mention JJ, Verkarre V, Allez M, Cellier C, Hermine O, Cerf-Bensussan N. Inhibition of TGF-beta signaling by IL-15: a new role for IL-15 in the loss of immune homeostasis in celiac disease. *Gastroenterology* 2007; 132: 994-1008
60. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*. 1999; 285:727-729.
61. Salvati V.M., MacDonald T.T., Bajaj-Elliott M., Borrelli M., Staiano A., Auricchio S., Troncone R., Monteleone G. Interleukin 18 and associated markers of T helper cell type 1 activity in coeliac disease. *Gut*. 2002 Feb; 50(2): 186-90.
62. Fina D, Sarra M, Caruso R, Del Vecchio Blanco G, Pallone F, MacDonald TT, Monteleone G. Interleukin 21 contributes to the mucosal T helper cell type 1 response in coeliac disease. *Gut* 2008; 57: 887-892.

63. Peluso I, Fantini MC, Fina D, Caruso R, Boirivant M, MacDonald TT, Pallone F, Monteleone G. IL-21 counteracts the regulatory T cell-mediated suppression of human CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* 2007; 178: 732-739.
64. Strengell M, Matikainen S, Siren J, et al. IL-21 in synergy with IL-15 or IL-18 enhances IFN-gamma production in human NK and T cells. *J Immunol* 2003;170:5464–9.
65. Lahat N, Shapiro S, Karban A, Gerstein R, Kinary A, Lerner A: Cytokine profile in coeliac disease. *Scand J Immunol* 49: 441-446, 1999.
66. Pabst O, Mowat AM. Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunol*. 2012 May;5(3):232-9. doi: 10.1038/mi.2012.4. Epub 2012 Feb 8.
67. Kertulla TO, Collin P, Maki M, Hurme M: Normal T-Helper 1/T-Helper 2 balance of coeliac disease patients. *Scand J Immunol* 49: 197-202,1999.
68. Lan RY, Mackay IR, Gershwin ME J. Regulatory T cells in the prevention of mucosal inflammatory diseases: patrolling the border *Autoimmun*. 2007 Dec;29(4):272-80. Epub 2007 Sep 21.
69. Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings MK. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev*. 2001 Aug;182:68-79.
70. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003 Apr;4(4):330-6. Epub 2003 Mar 3.
71. Gianfrani C, Levings MK, Sartirana C, Mazzarella G, Barba G, Zanzi D, Camarca A, Iaquinto G, Giardullo N, Auricchio S, Troncone R, Roncarolo MG. Gliadin-specific type 1 regulatory T cells from the intestinal mucosa of treated celiac patients inhibit pathogenic T cells. *The Journal of Immunology* , 2006, 177: 4178-4186.
72. Salvati V M, Mazzarella G, Gianfrani C, Levings M K, Stefanile R, Iaquinto G et al. Recombinant human IL-10 suppresses gliadin-dependent T-cell activation in ex vivo cultured celiac intestinal mucosa. *Gut* 2005; 54:46–53.
73. Ludvig M Sollid and Chaitan Khosla Future therapeutic options for celiac disease *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology* (2005) 2, 140-147.
74. Forsberg G. et al. Paradoxical coexpression of proinflammatory and down-regulatory cytokines in intestinal T cells in childhood celiac disease. *Gastroenterology* 2002;123:667–678.
75. MB Sporn, AB Roberts, LM Wakefield and RK Assoian. Transforming growth factor-beta: biological function and chemical structure. *Science* 1 August 1986: Vol. 233 no. 4763 pp. 532-534.

76. Lionetti P, Pazzaglia A, Moriondo M, Azzari C, Resti M, Amorosi A, Vierucci A: Differing patterns of transforming growth factor- β expression in normal intestinal mucosa and in active celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 29: 308-313, 1999.
77. G.Mazzarella, VM Salvati, M.Borrelli, et al. Cytokines in celiac disease. *J Digest Protec* 2000; 1 (2) :49-56.
78. Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang Z, Goldstein SR, Weiss RA, Liotta LA: Laser capture microdissection. *Science* 1996;274:998–1001.
79. Bonner RF, Emmert-Buck M, Cole K, Pohida T, Chuaqui R, Goldstein S, Liotta LA: Laser capture microdissection: molecular analysis of tissue. *Science*. 1997;278:1481–1483.
80. Simone NL, Bonner RF, Gillespie JW, Emmert-Buck MR, Liotta LA: Laser- capture microdissection: Opening the microscopic frontier to molecular analysis. *Trends in Genetics* 1998;14:272–276.
81. Pasic R, Djulbegovic B, Wittliff JL: Influence of O.C.T. embedding compound on determinations of estrogen and progesterin receptors in breast cancer. *Clin Chem* 1989;35:2317–2319.
82. Murray GI, Curran S. Laser capture microdissection, *Methods in molecular biology, Methods and Protocols*, Totowa (New Jersey): Humana Press; 2005; 293: 4,6,12,17-8.
83. Kontakou M, Przemioslo RT, Sturgess RP, Limb GA, Ciclitira PJ: Expression of tumour necrosis factor- α , interleukin-6, and interleukin-2 mRNA in the jejunum of patients with coeliac disease. *Scand J Gastroenterol* 30: 456-463, 1995.
84. Beckett CG, Dell’Olio D, Kontakou M, Przemioslo RT, Rosen-Bronson S, Ciclitira PJ: Analysis of interleukin-4 and interleukin-10 and their association with the lymphocytic infiltrate in the small intestine of patients with coeliac disease. *Gut* 39: 818-823, 1996.
85. Francisco León and Garbiñe Roy. Isolation of human small bowel intraepithelial lymphocytes by Annexin V-coated magnetic beads. *Laboratory Investigation* (2004) 84, 804–809.
86. M Chiba, W Bartnik, S G ReMine, W R Thayer, R G Shorter. Human colonic intraepithelial and lamina propria lymphocytes: cytotoxicity in vitro and the potential effects of the isolation method on their functional properties. *Gut* 1981;22:177-186.
87. Salvati VM, Troncone R, Borrelli M, Staiano A, Mazzarella G, Rossi M, Auricchio S: mRNA transcripts for γ interferon, but also for IL10, are increased in the small intestinal mucosa of untreated coeliac patients. *Immunology Letters* 69: 104, 1999.
88. Yen TH, Wright NA. The gastrointestinal tract stem cell niche (2006) *Stem Cell Rev* (2) 3: 203-212.

PARTE II

STUDIO DEL RUOLO DI CEPPI AIEC NELL'EZIOPATOGENESI DEL MORBO DI CROHN

1. INTRODUZIONE

La malattia di Crohn (Crohn Disease, CD) è, insieme alla rettocolite ulcerosa, una delle forme più comuni di MICI (Malattie Infiammatorie Croniche Intestinali) o IBD (Inflammatory Bowel Disease), termini generici che descrivono condizioni in cui c'è una risposta immunitaria ed infiammatoria ricorrente e cronica a livello del tratto gastrointestinale⁽¹⁾. Nel 1932 fu descritta per la prima volta l'ileite segmentaria, ritenuta una malattia dell'ileo, dal dottor Burrill Bernard Crohn, che tenne una conferenza a New Orleans, insieme ai suoi collaboratori Leon Ginzburg, e Gordon Oppenheimer al congresso dell'*American Medical Association*. Tale malattia era localizzata nella parte finale dell'ileo, tanto da essere chiamata anche ileite terminale. In seguito alla descrizione di numerosi casi, divenne evidente che la localizzazione ileale è preponderante ma non esclusiva, pertanto la malattia fu ribattezzata in onore del più importante fra gli scopritori. La CD è un'inflammazione cronica che può colpire teoricamente tutto il canale alimentare, dalla bocca all'ano, ma che si localizza prevalentemente nell'ultima parte dell'intestino tenue chiamato ileo (ileite) e/o nel colon destro/cieco (ileocolite) oppure solo il colon in una sua qualsiasi parte (colite). I tratti intestinali colpiti si presentano infiammati, ulcerati (con perdita di tessuto) con lesioni che interessano

a tutto spessore la parete intestinale. La CD può anche colpire la zona perianale, con fistole e ascessi in corrispondenza dell'ano⁽²⁾.

L'eziologia delle IBD non è del tutto nota, tuttavia le attuali evidenze indicano che la patogenesi del danno tissutale sia correlata a una disregolazione, geneticamente determinata, della risposta immunitaria mucosale nei confronti degli antigeni presenti nel lume intestinale ed in particolare nei confronti dei comuni ed ubiquitari componenti dell'ecosistema locale, quali la flora batterica residente^(3,4).

La malattia di Crohn può colpire qualsiasi tratto del canale alimentare dalla bocca all'ano. Le lesioni si caratterizzano per la presenza di una flogosi cronica granulomatosa transmurale con carattere di segmentarietà ed hanno più frequentemente sede nell'ileo-terminale e nel colon. La malattia mostra una marcata eterogeneità clinica e anatomica i cui fattori principali sono la sede, l'estensione e il tipo prevalente della lesione anatomopatologica. Il decorso cronico, intermittente e caratterizzato da periodi di remissione e di riaccensione, è segnato dalla tendenza a recidivare dopo la rimozione chirurgica del tratto leso. Le riaccensioni cliniche possono o meno accompagnarsi a un'ulteriore estensione delle lesioni. La persistenza della flogosi indipendente dalla presenza di sintomi è alla base delle anche lunghe fasi subcliniche che possono precedere e seguire fasi di

attività clinica conclamata. La presentazione clinica delle malattie infiammatorie croniche intestinali è altamente variabile in relazione alla sede della malattia e al tipo di lesioni, al grado di compromissione sistemica, nonché alla presenza di manifestazioni extraintestinali.

1.1 EPIDEMIOLOGIA

L'incidenza e la prevalenza della malattia di Crohn è più elevata nei paesi industrializzati quali nord Europa e America settentrionale^(5,6). Predilige in particolar modo la popolazione caucasica con una più elevata prevalenza nella popolazione ebraica Ashkenazi⁽⁷⁾, mentre è rara nella popolazione nera e nei paesi in via di sviluppo⁽⁸⁾. L'incidenza tende ad aumentare e, nei paesi a maggiore prevalenza, è più che triplicata negli ultimi 25 anni (Fig. 1.1). In Italia si stima un'incidenza di 3,7-4,2/100.000/anno e una prevalenza di 50-54/100.000⁽²⁾. La diagnosi viene posta in oltre i due terzi dei pazienti prima dei 36 anni di età e nel 25% dei casi prima dei 20 anni di età, con una distribuzione bimodale delle diagnosi in relazione all'età caratterizzata da un primo picco, di entità maggiore, tra i 15 e i 40 anni, e un secondo picco tra i 50 e 60 anni. Il Multicenter European Collaborative Study sulle malattie infiammatorie intestinali (ECIBD)

riporta un'incidenza variabile da 3.9 a 7.0/ 100000 persone/anno e quantifica una più alta incidenza in Nord Europa con gradiente pari all'80%.

L'elevata frequenza di concordanza per la malattia fra gemelli omozigoti indica l'importanza di fattori genetici nel determinare la distribuzione familiare. L'intervallo di tempo tra l'inizio di sintomi non caratteristici e la comparsa di uno o più segni certi della malattia è compreso di 0-4 anni. I principali sintomi che vengono via via a manifestarsi sono la diarrea cronica intermittente, i dolori addominali, la perdita di peso, le manifestazioni extraintestinali, l'anemia, la piroisi. Nessuno di tali sintomi singolarmente considerato è per sé patognomonic della malattia di Crohn. Ha valore discriminante per la diagnosi di malattia di Crohn la presenza contemporanea di più sintomi. La malattia di Crohn è caratterizzata da un processo infiammatorio cronico idiopatico che può essere di tipo ulcerativo, fistolizzante e stenosante. La malattia interessa generalmente l'ileo terminale e/o il cieco. E' segnalata una lieve predominanza nel sesso femminile (rapporto maschi/femmine = 0.8) suggerendo un ruolo dei fattori ormonali nell'espressione della malattia^(9,10,11).

La malattia di Crohn è più frequente nei soggetti affetti da malattie genetiche quali la sindrome di Turner^(12,13,14,15,16,17), la sindrome di Hermansky-Pudlak^(18,19,20,21) e la glicogenosi tipo IB^(22,23,24,25) o in

condizioni cliniche caratterizzate da immunodeficienza come l'ipogammaglobulinemia, l'angioedema ereditario ed il deficit della frazione C2 del complemento^(26,27).

La probabilità di quiescenza clinica dopo una fase di attività è elevata, ma altrettanto elevata è la probabilità che alla fase di remissione segua una nuova riaccensione. La letteratura riconosce un incremento nell'incidenza di malattia di Crohn nel corso degli ultimi due decenni, associato ad una riduzione dell'età di diagnosi, tali affermazioni debbono tenere conto dell'evoluzione tecnologica e della codificazione di criteri diagnostici sempre più accurati^(28,29,30,31,32,33).



Fig 1.1 - Diffusione della malattia nel mondo.

1.2 EZIOLOGIA

L' eziologia delle IBD non è ancora del tutto chiara, sicuramente la CD è una patologia multifattoriale in cui concorrono fattori genetici e fattori ambientali, quali abitudini alimentari, stile di vita, fumo, che influenzano notevolmente l'eziopatogenesi della malattia. Dati epidemiologici indicano il ruolo dei fattori genetici nella patogenesi della malattia di Crohn, fra cui l'aggregazione familiare ed etnica: i parenti di primo grado dei pazienti affetti presentano un rischio di sviluppare IBD da 4 a 20 volte più elevato della popolazione di controllo^(34,35). I familiari di primo grado (figli, fratelli e genitori) dei soggetti affetti presentano il rischio più elevato, soprattutto i fratelli; i parenti di primo grado di un individuo affetto da colite ulcerosa o da malattia di Crohn hanno un rischio aumentato di 10-15 volte di sviluppare la stessa patologia, e nella stessa famiglia possono verificarsi i due tipi di malattia. I dati derivanti dagli studi condotti su gemelli confermano l'ipotesi di una componente genetica di queste patologie. Esiste un significativo incremento nel grado di concordanza tra gemelli monozigoti, rispetto a quelli dizigoti, inoltre, non sono mai stati segnalati casi di coppie di gemelli monozigoti con un soggetto affetto da colite ulcerosa e l'altro da malattia di Crohn, a conferma dell'ipotesi di una base genetica distinta per i due fenotipi di IBD.

L'evidenza di una concordanza tra gemelli monozigoti e dizigoti rispettivamente del 37% e del 7% corrisponde a una penetranza ridotta del genotipo e dimostra l'importanza dei fattori ambientali nello sviluppo della malattia^(36,37). Gli studi molecolari di linkage hanno identificato 7 loci di suscettibilità (IBD1-7)^(38,39,40) e 2 incerti (Tabella 1.1): il primo gene associato alla malattia di Crohn, NOD2/CARD15 (Fig.1.2), è localizzato nella regione pericentromerica 16q12 (IBD1).

Locus	Cromosoma	Geni
IBD1	16p12-q13	Nod2/CARD 15, IL-4R, CD11B
IBD2	12p13.2-q24.1	STAT6, Vitamin D receptor (VDR), MMP18, β 7 integrina, γ interferon
IBD3	6p	Major histocompatibility complex (MHC): classe I, II e III, TNF
IBD4	14q11-12	T Lymphocyte receptor (TLR), Leukotriene B4 receptor
IBD5	5q31-33	Organic Cations Transporter (OCTN), Drosophila long disc homologue gene 5 (DLG5), Multidrug resistant gene (MDR1), IL-6
IBD6	19p13	Tromboxane A2, Leukotriene B4, ICAM-1, C3
IBD7	1p36	Transforming Growth factor beta(TGFbeta), TNF α -receptor
IBD8	16p12	Sconosciuto
IBD9	3p26	CCR5, CCR9, IL-12

Tabella 1.1 - Loci associati alle IBD.

Il gene NOD2 codifica per una proteina associata congenitamente al sistema immunitario; è riscontrabile nei monociti che riconoscono normalmente i batteri, venendo poi attivati al fine di distruggerli. Le mutazioni di NOD2 osservate nei soggetti affetti da morbo di Crohn

provocano un'alterazione dell'attivazione monocitaria, rendendo molto più difficile da parte della proteina NOD2 il “riconoscimento” e la risposta al lipopolisaccaride batterico (LPS), componente della parete cellulare batterica rilevabile in molte specie di microrganismi.

La proteina codificata da CARD15 è un recettore intracellulare in grado di identificare i peptidoglicani di batteri Gram positivi e Gram negativi (dominio LRR leucine-rich repeat region): essa attiva il fattore nucleare kB (NFkB) che è la molecola chiave nell'innescò della risposta immune. La mutazione del gene Leu1007fsinsC, codifica per una proteina tronca con conseguente iporeattività nei confronti dei lipopolisaccaridi batterici. Sono state ad oggi riconosciute altre due mutazioni: Arg702Trp (triptofano al posto di arginina in posizione 702) e Gly908Arg (arginina al posto di glicina in posizione 908). Il rischio relativo di sviluppare malattia di Crohn associato ad una delle mutazioni di CARD15 è compreso tra 1.5 e 3^(41,42,43,44,45).

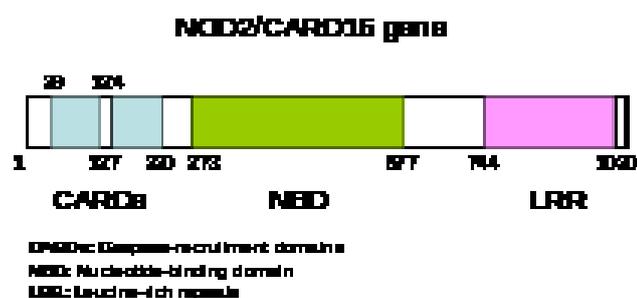


Fig.1.2 - Gene NOD2/CARD15

Fra i fattori ambientali, l'abitudine al fumo di sigaretta è indicato quale elemento maggiormente associato allo sviluppo della malattia di Crohn, conferendo un rischio relativo compreso tra 2 e 5⁽³⁶⁾.

Studi clinici hanno dimostrato che il consumo di tabacco determina un decorso più aggressivo della malattia e ne favorisce la localizzazione ileale^(46,47). I pazienti fumatori presentano maggiore necessità di terapia immunosoppressiva, hanno una più alta percentuale di riacutizzazione clinica, di intervento chirurgico e di recidiva post-chirurgica. Per la sua prevalenza nelle zone ad alta industrializzazione, si crede che la dieta possa essere una delle concause della malattia.

Una correlazione positiva è stata trovata tra l'incidenza della malattia e un apporto maggiore di proteine animali, proteine del latte e un rapporto maggiore di omega-6 e acidi grassi polinsaturi omega-3⁽⁵²⁾. È stata invece trovata una correlazione negativa dell'incidenza della malattia nell'aumento del consumo di proteine vegetali e nessuna correlazione con le proteine di pesce⁽⁵²⁾.

Anche l'assunzione di contraccettivi orali è stato indicato quale fattore di rischio di sviluppo di malattia di Crohn e di decorso clinico più severo⁽⁴⁸⁾ specialmente se associato al fumo.

Una possibile spiegazione del legame tra contraccezione orale e malattia di Crohn è stata proposta da Wakefield, che ha ipotizzato alla

base delle manifestazioni cliniche della malattia la trombosi microvascolare e l'ischemia intestinale. Pertanto gli estrogeni, con la loro attività protrombotica, potrebbero esercitare un ruolo nello sviluppo e nel mantenimento della malattia di Crohn stessa, in particolar modo nel caso di pazienti con localizzazione colica^(49,50).

Vari studi hanno dato a tutt'oggi risultati non conclusivi.

La storia di pregressa appendicectomia è frequente nei pazienti con malattia di Crohn. Diversi studi suggeriscono che l'appendicectomia sia associata ad un rischio futuro di malattia di Crohn, inoltre l'intervento di appendicectomia precedente la diagnosi di malattia di Crohn può predire un andamento clinico peggiore e un più alto rischio di interventi di resezione intestinale in questi pazienti⁽⁵¹⁾.

1.3 QUADRO CLINICO

Manifestazioni intestinali

Nel 10% circa dei casi la malattia può esordire in modo improvviso, simulando un'appendicite acuta. La comparsa di fistola perianale o di manifestazioni extraintestinali può precedere anche di anni l'esordio dei sintomi intestinali. Nella maggior parte dei pazienti, tuttavia, si osserva un "periodo prodromico", caratterizzato da sintomi caratteristici ma non specifici, quali ricorrenti episodi di dolore

addominale, calo ponderale, diarrea con e senza sangue. Il periodo di latenza medio tra esordio dei sintomi e diagnosi è compreso tra 0-4 anni. La malattia si localizza prevalentemente nell'ultima parte dell'intestino tenue chiamato ileo (ileite) e/o nel colon destro/cieco (ileocolite) oppure solo il colon in una sua qualsiasi parte (colite) (Fig. 1.4).

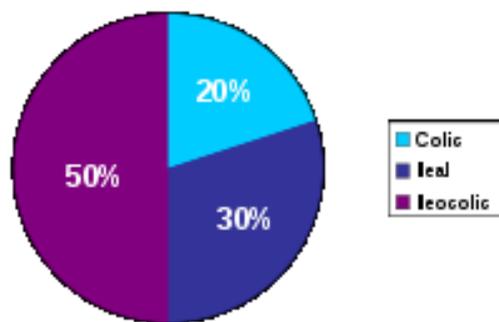


Fig. 1.4 - Percentuali delle diverse forme cliniche.

I tratti intestinali colpiti si presentano infiammati, ulcerati (con perdita di tessuto) con lesioni che interessano a tutto spessore la parete intestinale (Fig. 1.5).



Fig. 1.5 - Lesioni ulcerative in paziente con malattia in fase attiva.

La topografia delle lesioni, l'intensità dell'infiammazione e la coesistenza di complicanze sia locali che extraintestinali, influenzano il quadro clinico della malattia di Crohn. Le principali manifestazioni cliniche sono rappresentate da febbre, dolore addominale, diarrea, astenia e calo ponderale^(37,41,42,43).

Il dolore addominale si presenta con una frequenza compresa tra il 70 ed il 90%: può limitarsi a borborigmi o esprimersi in modo crampiforme, localizzandosi più frequentemente alla zona periombelicale o al quadrante inferiore destro; nelle fasi più avanzate assume spesso carattere di continuità, in relazione allo sviluppo di complicanze (ascessi o fistole).

La diarrea insorge progressivamente e viene riferita dalla maggior parte dei pazienti, in genere senza sangue macroscopicamente visibile: le feci si presentano di consistenza poltacea o liquide, con aumento del numero delle evacuazioni, che possono verificarsi anche durante la notte, e/o aumento del volume fecale. Se il retto non è interessato dalla malattia non è presente tenesmo. La febbre suggerisce la presenza di una flogosi attiva con lesioni ulcerative, fistole o ascessi.

Il calo ponderale è di circa il 10-20% del peso abituale e riconosce diversi meccanismi di insorgenza: in parte è legato all'anoressia dovuta al dolore addominale, in parte è riferibile al vomito e soprattutto al malassorbimento di nutrienti.

Nelle forme coliche è presente diarrea di tipo acquoso associata ad emissione di sangue e dolore prevalentemente pre-evacuativo; possono insorgere complicanze anorettali quali fistole, ragadi e ascessi rettali.

In caso di localizzazione ileale sono spesso riferite febbre, anoressia, nausea e vomito; la diarrea può non essere presente e, se lo è, si presenta con feci semiformate ed untuose, senza sangue né muco. L'esame obiettivo può mettere in evidenza una dolorabilità in fossa iliaca destra, associata al reperto di una "massa" dovuto alla presenza di anse intestinali distese e reciprocamente adese.

La definizione ed il monitoraggio dell'attività clinica nei pazienti con malattia di Crohn risulta fondamentale nella scelta della terapia, per valutare la risposta al trattamento, nel follow-up e nella valutazione dei risultati dei trial clinici.

Il primo indice di attività applicato in clinica è stato il CDAI (Crohn's Disease Activity Index) 60, ideato nel 1976 per il National Cooperative Crohn's Disease Study e successivamente utilizzato per la valutazione standardizzata dei pazienti coinvolti in trial controllati.

Il valore del CDAI è determinato da 8 variabili⁽⁴⁵⁾: il numero di evacuazioni con feci liquide o semiliquide, il dolore addominale, la sensazione soggettiva di benessere, la presenza di sintomi extraintestinali, l'assunzione di farmaci antidiarroici, l'individuazione

di masse addominali, l'ematocrito ed il peso corporeo. Tramite la valutazione di questi parametri è possibile definire quattro classi di pazienti: CDAI<150, descrittivo di una malattia in fase di remissione, CDAI 150-219 associato ad un'attività di grado lieve, CDAI 220-450 in caso di attività di grado moderato e CDAI>450 in presenza di attività di grado severo^(46,47).

Il CDAI presenta però alcune lacune, come la mancata valutazione degli indici di infiammazione, la presenza di variabili difficilmente oggettivabili (ad es. la sensazione soggettiva di benessere) e la necessità di registrare alcuni parametri per sette giorni.

Un altro sistema di score fondato esclusivamente sulla valutazione di parametri clinici è l'indice di Harvey-Bradshaw (HBI o Simple Index) che è quello di più facile.

Manifestazioni extraintestinali

Le manifestazioni extraintestinali sono comuni nei soggetti affetti da CD, verificandosi in una percentuale compresa tra il 21 e il 36%. È stata descritta un'ampia varietà di disturbi, relativi praticamente a ogni apparato⁽⁵³⁾. Un punto importante, discutendo di tali manifestazioni, è se esse rappresentino un aspetto della stessa patogenesi di fondo o piuttosto dei processi patologici nettamente distinti; in quest'ultimo caso, tali manifestazioni possono essere coincidenti con la patologia intestinale, oppure conseguenza di essa o del suo trattamento.

Le manifestazioni extraintestinali sono grossolanamente classificabili in tre gruppi: il primo comprende le alterazioni riguardanti la cute (Fig. 1.6), gli occhi, le articolazioni e la bocca⁽⁵⁵⁾. Tali manifestazioni riguardano generalmente soggetti affetti da patologia colica, e l'attività di tali disturbi segue di pari passo quella della patologia intestinale sottostante.



Fig. 1.6 - Eritema nodoso in paziente affetto da CD.

Il secondo gruppo comprende le manifestazioni secondarie alle complicanze o all'estensione diretta della patologia intestinale; fanno parte di questo gruppo la litiasi renale, l'uropatia ostruttiva, il malassorbimento e la litiasi biliare. Il terzo gruppo comprende quei disturbi non chiaramente categorizzabili nei due precedenti; tra tali manifestazioni extraintestinali aspecifiche vi sono l'osteoporosi, le epatopatie e l'amiloidosi. Appartengono verosimilmente a questo

gruppo anche le complicanze relative ai sistemi vascolare, ematologico, polmonare, cardiaco e neurologico.

I disturbi muscolo-scheletrici comprendono le più comuni manifestazioni extraintestinali osservabili nei soggetti affetti da una IBD^(48,53,54). Tali anomalie sono grossolanamente classificabili in disturbi reumatologici e disturbi del metabolismo osseo⁽⁵⁴⁾.

L'anemia microcitica sideropenica rappresenta un sintomo frequente, ad origine multifattoriale, che in alcuni pazienti costituisce la sola espressione di attività clinica. L'anemia sideropenica è comunemente causata dal sanguinamento cronico intestinale, in caso di processi erosivi della mucosa, o dal malassorbimento parietale del ferro dovuto all'infiammazione. Un'anemia macrocitica può essere legata al deficit di vitamina B12 e di folati.

Una percentuale di pazienti compresa tra il 40 e il 50% presenta osteopenia⁽⁵⁴⁾, e può essere affetto da osteoporosi, forse in relazione al malassorbimento di calcio e di vitamina D che si verifica nel Crohn a livello del tenue; potrebbero inoltre contribuire a realizzare tale effetto la riduzione dell'assorbimento calcico dovuta a deficit della lattasi e le stenosi intestinali.

Complicanze

Il rischio di sviluppare una complicanza, locale o sistemica, aumenta progressivamente con la durata della malattia, passando dal 19% del primo anno al 60% nell'ottavo anno.

L'occlusione intestinale si manifesta nel 20-30% dei pazienti con malattia di Crohn, più frequentemente in caso di localizzazione ileale delle lesioni⁽⁵⁶⁾. L'iniziale riduzione del diametro luminale è dovuta alla flogosi acuta e all'edema del segmento interessato, spesso rappresentato dall'ileo terminale: con il progredire della malattia si assiste all'evoluzione fibrotica dell'infiammazione, con conseguente formazione di tratti stabilmente stenotici. Le stenosi rappresentano un'indicazione all'intervento chirurgico quando sono causa di ripetuti episodi subocclusivi.

Lo sviluppo di fistole è più frequente nelle localizzazioni ileo-coliche: i tramiti fistolosi possono aprirsi tra segmenti intestinali adiacenti (es. ileo-ileali o ileo-cecali) o nello spazio retroperitoneale, presentarsi con orifizio cutaneo o essere complicate da ascessi soprattutto nella zona perianale⁽⁵⁷⁾.

L'estensione transmurale del processo infiammatorio, con conseguente ispessimento della parete intestinale, rende la perforazione intestinale una complicanza rara.

Viene frequentemente riscontrato un deficit di vitamina B12 e sali biliari, con conseguente carenza di vitamine liposolubili ed aumento della litogenicità della bile.

L'amiloidosi secondaria sistemica è una grave e rara complicanza di una malattia infiammatoria intestinale presente da lunga data, che si verifica nei soggetti affetti da malattia di Crohn in una percentuale dello 0,9⁽⁵⁸⁾. L'amiloidosi di questi soggetti colpisce frequentemente i reni, manifestandosi con una proteinuria, seguita da una sindrome nefrosica e dall'insufficienza renale conseguente. soggetti affetti da una IBD, e soprattutto quelli con una malattia di Crohn, possono presentare complicanze genito-urinarie. L'ostruzione ureterale, solitamente a destra, si verifica prevalentemente nei pazienti con malattia di Crohn dell'ileo terminale, ma è possibile anche l'ostruzione dell'uretere sinistro, soprattutto nelle forme di malattia di Crohn a localizzazione digiunale. In questi soggetti può verificarsi la formazione di fistole tra l'intestino e il tratto genito-urinario a diversi livelli, tra i quali la vescica (fistola colovesicale o enterovesicale), l'uretra e la vagina.

L'anemia, nei soggetti affetti da una IBD, ha un'eziopatogenesi multifattoriale, potendo derivare ad esempio dalle perdite ematiche a livello del tratto gastrointestinale; la flogosi o una resezione ileale possono determinare il malassorbimento di vitamina B12, nei soggetti

affetti da malattia di Crohn, mentre l'assorbimento del ferro può risultare alterato in quelli con uno stato di flogosi duodenale, e quello dei folati nella flogosi digiunale⁽⁵⁹⁾.

Esistono evidenze indicanti un qualche grado di compromissione della fertilità nelle donne affette da malattia di Crohn⁽⁶⁰⁾. La ragione esatta di ciò può dipendere dalla gravità della patologia, dal fatto di evitare gravidanze su indicazione da parte dei Sanitari, dalla presenza di dispareunia (specialmente in presenza di malattia severa a livello perineale), da alterazioni ovulatorie o dalla presenza di ostruzioni tubariche come conseguenza di complicanze settiche pelviche dovute alla malattia di Crohn stessa⁽⁶¹⁾. Anche la fertilità maschile può risultare compromessa dall'assunzione di sulfasalazina^(62,63) (in grado di provocare dismorfismi a livello spermatico, riduzione della conta spermaticitaria totale e della motilità), ma tale effetto collaterale (probabilmente dovuto al dominio sulfopiridinico della molecola) è reversibile, con risoluzione completa alla sospensione del trattamento.

La malattia di Crohn aumenta anche il rischio di cancro nella zona di infiammazione^(64,65). Per esempio, gli individui con malattia di Crohn che coinvolge il piccolo intestino sono a maggior rischio per cancro intestinale^(64,66). Allo stesso modo, le persone con colite di Crohn hanno un rischio relativo di 5.6 di sviluppare il cancro del colon⁽⁶⁵⁾.

Screening per il cancro del colon con colonscopia sono consigliati per chi ha avuto la colite di Crohn per almeno otto anni.

1.4 DIAGNOSI

La diagnosi di malattia di Crohn è basata sulla combinazione di reperti clinici, laboratoristici, radiologici, endoscopici ed anatomopatologici, singolarmente non sufficienti per una certa identificazione della malattia⁽⁶⁷⁾.

L'aumento degli indici di flogosi, quali la velocità di eritrosedimentazione (VES), la proteina C reattiva (PCR), l' α 1-glicoproteina acida ed il fibrinogeno, la leucocitosi neutrofila e l'anemia sideropenia rappresentano la prima conferma del sospetto clinico di malattia di Crohn. Gli anticorpi diretti contro il lievito *Saccharomyces Cerevisiae* (ASCA) si sono dimostrati negli ultimi anni un marcatore immunologico dotato di buona specificità (90%) e sensibilità (53-69%)^(68,69).

La diagnosi di natura è affidata all'esame endoscopico del tratto digestivo inferiore ed all'esame istologico: la colonscopia totale con ileoscopia retrograda rappresenta in quest'ambito la metodica chiave, permettendo una visualizzazione diretta delle lesioni ed il prelievo di campioni biotici. I caratteri endoscopici distintivi di malattia di

Crohn sono rappresentati dalla distribuzione segmentaria delle lesioni che raramente interessano il retto, dalla fragilità della mucosa, dalla presenza di profonde ulcerazioni estese alla sottomucosa, dalle ulcere aftoidi e dal comune riscontro di stenosi o fistole (Fig. 1.7).



Fig. 1.7 - Immagini endoscopiche di colite di Crohn, con ulcerazioni essudative (sinistra), perdita diffusa di architettura della mucosa, friabilità della mucosa nel sigma e essudato sulla parete (destra).

L'utilizzo di punteggi endoscopici in corso di malattia infiammatoria intestinale riconosce tre principali applicazioni: la diagnosi differenziale, la valutazione dell'attività infiammatoria e la formulazione di indici prognostici sull'andamento della malattia⁽⁷⁰⁾. La biopsia endoscopica e la successiva analisi istologica del campione possono confermare la diagnosi (Fig. 1.8).



Fig. 1.8 - Biopsia endoscopica: si nota infiammazione granulomatosa del colon.

L'esame radiologico seriato dell'intestino tenue permette di documentare la discontinuità e la molteplicità delle lesioni che, nelle fasi iniziali di malattia sono rappresentate da una fine granulosità del lume intestinale e dall'ispessimento delle valvole conniventi, che appaiono distorte. Il quadro radiologico meglio si definisce con la comparsa di ulcere lineari, come immagini di "plus", delimitate da aree di mucosa edematosa che conferiscono il tipico aspetto ad "acciottolato". Altro reperto caratteristico è la presenza di stenosi dell'ultima ansa ileale, caratterizzata dal segno "della cordicella"⁽⁷¹⁾.

L'uso complementare di altre metodiche, quali la tomografia computerizzata (TC), lo studio ecografico delle anse intestinali, la risonanza magnetica (RM), la videocapsula endoscopica (VCE), la scintigrafia con leucociti marcati e la push endoscopia (o enteroscopia), è pressoché indispensabile in relazione all'eterogeneità anatomica e clinica della malattia di Crohn^(72,73).

1.5 TERAPIA MEDICA

La terapia delle IBD è di tipo palliativo, non curativo, e come obiettivi principali si pone:

1. l'induzione della remissione;
2. il mantenimento di tale fase;
3. attenuare o rendere minima la sintomatologia intestinale;
4. attenuare o rendere minima la sintomatologia extraintestinale;
5. fornire un trattamento che comporti il minimo grado di tossicità possibile;
6. migliorare la qualità della vita;
7. mantenere uno stato nutrizionale adeguato.

La valutazione dell'efficacia della terapia medica, in questi soggetti, si basa su criteri soggettivi e oggettivi.

La terapia convenzionale si avvale di farmaci dotati di attività anti-infiammatoria (corticosteroidi, sulfasalazina, mesalazina), di farmaci immunosoppressivi (azatioprina, 6-mercaptopurina, metotrexate, ciclosporina) e di antibiotici (metronidazolo, ciprofloxacina)⁽⁷⁴⁾.

I corticosteroidi hanno a lungo rappresentato il caposaldo della terapia sia nella malattia di Crohn, sia nella colite ulcerosa, soprattutto nelle forme di malattia da moderata a severa, e compresi i casi con necessità di ricovero ospedaliero.

Il 15% dei soggetti trattati, però, presenta generalmente intolleranza alla terapia; gli effetti collaterali possono essere di tipo idiosincratice o dose-dipendenti. Tra i primi vi sono la comparsa di rash cutanei, ipertermia, pancreatiti, artralgie, mialgie, nausea ed epatiti, mentre i secondi comprendono leucopenia, anemia e piastrinopenia^(75,76).

L'esistenza di sottogruppi di pazienti con malattia refrattaria a terapia convenzionale o steroide-dipendenza e l'insorgenza di effetti avversi hanno portato alla ricerca di strategie terapeutiche alternative.

La sperimentazione ha evidenziato che un eccesso di pro-citochine infiammatorie ed una concomitante deficienza di molecole regolatorie (comparato con gli individui sani) sono necessarie per mantenere, amplificare e perpetuare l'infiammazione cronica caratteristica delle malattie infiammatorie croniche intestinali IBD. Tale presupposto e il ruolo svolto dalla risposta immunitaria dell'ospite ha reso necessario lo sviluppo di nuovi farmaci, le anti-citochine, in grado di modulare selettivamente il rilascio o l'attività dei mediatori solubili immunoregolatori, sono nate le terapie biologiche^(81,82,83). Queste comprendono:

1- composti biologici estratti o modificati, come i vaccini (microrganismi vivi, attenuati o uccisi), gli emoderivati e gli estratti ormonali;

2- peptidi o proteine ricombinanti, come il GM-CSF e l'ormone della crescita;

3- anticorpi monoclonali e proteine di fusione;

4- oligonucleotidi antisense o acidi nucleici;

5- terapia genica.

In particolare, attualmente le molecole che hanno trovato una larga applicazione clinica sono quelle che antagonizzano l'azione del TNF- α ^(79,80,84,85)

Tra questi quelli attualmente utilizzati comprendono: l'Infliximab⁽⁸¹⁾, il Certolizumab⁽⁸⁶⁾ e l'Adalimumab⁽⁸⁷⁾.

Trattamento chirurgico

La malattia di Crohn può essere anche trattata con la chirurgia, quando si verifica un blocco parziale o totale dell'intestino^(90,92). La chirurgia può essere utilizzata anche per risolvere complicazioni come: ostruzioni, fistole e/o ascessi o se la malattia non risponde al trattamento farmacologico. Dopo il primo intervento di resezione, la malattia tende a ricomparire in altri luoghi⁽⁹¹⁾. Dopo una resezione, il tessuto cicatriziale si accumula e può causare stenosi che si ha quando l'intestino diventa troppo stretto per permettere agli escrementi di passare con facilità, portando ad un blocco. Ciò può spesso rendere necessario un altro intervento analogo entro cinque anni⁽⁹¹⁾. Per i pazienti con ostruzione causata da stenosi, ci sono due opzioni di

trattamento: la *strictureplasty* e la resezione di parte di intestino⁽⁸⁸⁾. In questi casi, i tassi di re-intervento sono stati del 31% e 27%, rispettivamente, ad indicare che la *strictureplasty* è un trattamento sicuro ed efficace per pazienti selezionati che presentano interessamento duodenale⁽⁸⁸⁾.

La sindrome da intestino corto può essere causata dalla rimozione chirurgica del piccolo intestino. Di solito si sviluppa nei pazienti che hanno avuto la metà o più del loro intestino tenue rimosso⁽⁹³⁾. La diarrea è il sintomo principale di tale condizione, tuttavia altri sintomi possono includere crampi, gonfiore e bruciore di stomaco. Questa sindrome viene trattata con cambiamenti nella dieta, supplementi di alimentazione per via endovenosa (vitamine e minerali) e tramite il trattamento farmacologico. Un'altra complicanza dopo un intervento chirurgico in cui l'ileo terminale viene rimosso è lo sviluppo di una eccessiva diarrea acquosa. Ciò è dovuto alla incapacità dell'ileo di riassorbire acidi biliari.

In alcuni casi di sindrome di intestino corto, può essere valutata la chirurgia di trapianto intestinale, anche se il numero dei centri che offrono questa procedura è piuttosto piccolo e essa comporta un elevato rischio a causa della possibilità di infezione e rigetto⁽⁹³⁾.

Medicina alternativa

Spesso i malati affetti da malattia di Crohn si sottopongono a terapie complementari o alternative⁽⁹⁴⁻¹⁰⁰⁾; gli approcci seguiti comprendono le diete, l'uso di probiotici, l'olio di pesce (omega-3) e altri integratori a base di erbe (fitoterapia) e nutrizionali.

Il beneficio di questi trattamenti è incerto; anche se importanti metanalisi hanno mostrato un ruolo preventivo la ricomparsa della recidiva con l'uso dei probiotici⁽⁹⁴⁾, degli omega-3^(96,97,98,99) e della terapia complementare^(95,100).

1.6 RUOLO DELLE DISBIOSI NEL MORBO DI CROHN

Di recente è emerso che nei pazienti affetti da IBD è presente una disbiosi, ovvero un'alterazione della normale composizione della flora intestinale, di conseguenza, il paziente perde la sua tolleranza intestinale ai batteri endogeni e si determina un continuo stimolo del suo sistema di difesa quindi attivazione sproporzionata come entità e protratta nel tempo del sistema immunitario e presenza di uno stato infiammatorio cronico a livello del tratto gastroenterico^(101,102,104).

Il microbiota intestinale è costituito da una flora residente, caratterizzata da almeno 150 specie microbiche diverse, soggetta a turnover periodico, sulla cui composizione giocano un ruolo importante fattori genetici ed ambientali, poi c'è la flora transiente, costituita da microrganismi, patogeni e non, introdotti con l'aria, l'acqua ed il cibo. Normalmente c'è un equilibrio tra batteri simbiotici e patogeni opportunisti, che fanno anch'essi parte della flora intestinale (Fig. 1.9).

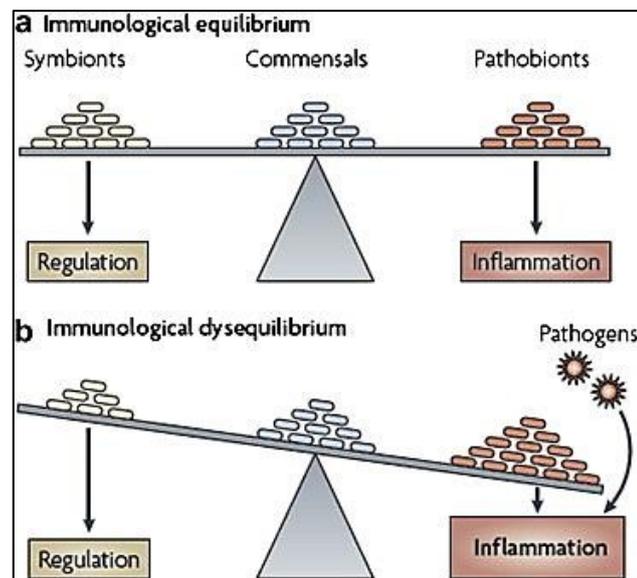


Fig. 1.9 - Equilibrio immunologico tra simbiotici e patogeni opportunisti.

In presenza di una disbiosi, questo equilibrio si altera e i patogeni opportunisti possono prendere il sopravvento, viene meno l'omeostasi immune mucosale e si instaura uno stato infiammatorio che può cronicizzare (Fig. 1.10).

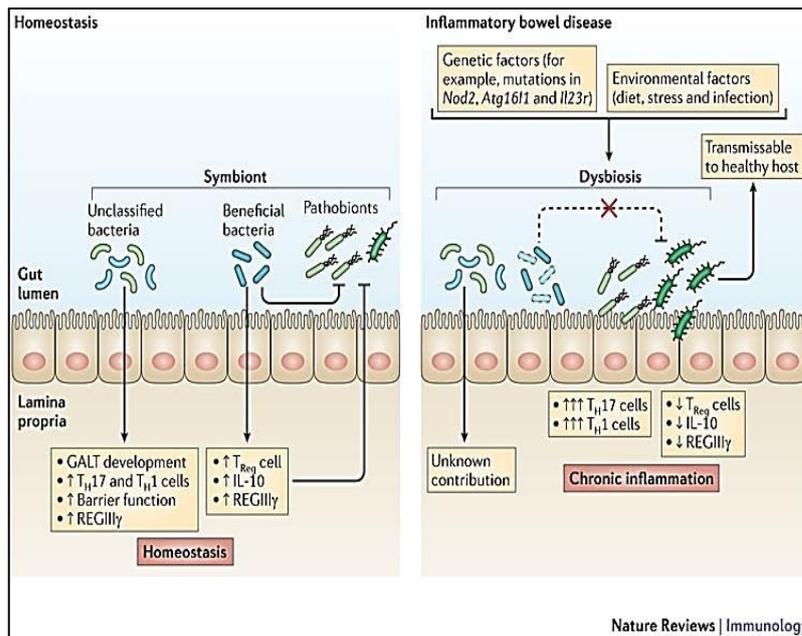


Fig. 1.10 - Disregolazione dell'omeostasi immune mucosale conseguente alla disbiosi nelle IBD.

In particolare, a livello delle lesioni intestinali dei pazienti affetti da MC, si è visto che c'è un' aumentata presenza di particolari ceppi di *Escherichia Coli* AIEC (*Adesive Invasive Escherichia Coli*), considerati patogeni opportunisti^(103,105,106).

1.7 ESCHERICHIA COLI AIEC E CROHN

L' idea che un batterio possa essere l'agente eziologico della malattia di Crohn ha preso piede da qualche anno, soprattutto in seguito alla scoperta che l' *Helicobacter Pylori* è l'agente eziologico dell' ulcera gastrica^(109,110); in effetti le ulcerazioni e i danni mucosali tipici della

CD, sono quasi sovrapponibili a quelli indotti dall' *H. pylori* a livello gastrico. Recenti studi hanno messo in evidenza che la causa principale di tutti i casi di cancro e di alcune patologie in cui è presente una forte infiammazione ed ulcerazione del tessuto, sono gli agenti infettivi^(107,108); tumori del fegato, ad esempio, sono fortemente associati con l'infezione da virus dell'epatite B/C; l'ulcera gastrica ed il cancro dello stomaco e del tessuto linfoide associato alla mucosa (MALT) sono associati all' infezione da *Helicobacter Pylori*^(109,110); tumori del tessuto linfoide possono essere causati dal virus Epstein-Barr; tumori alla cervice e all'utero sono associati con alcuni ceppi del papilloma virus umano; alcuni tumori ovarici ritrovano i loro agenti eziologici nel virus della gonorrea, della clamidia, o papilloma⁽¹¹¹⁾. In virtù di ciò, diversi studi hanno affrontato l' ipotesi che batteri virulenti possano contribuire alla patogenesi della malattia di Crohn. Recentemente si è ipotizzato che ceppi di *Escherichia Coli*, batterio predominante nella flora intestinale umana, possano essere coinvolti nella patogenesi del CD^(112,113,114,115). Dati recenti hanno rivelato, infatti, un' elevata prevalenza di ceppi invasivi nella mucosa ileale di pazienti con malattia di Crohn. Questi ceppi sono risultati essere invasivi ed aderiscono fortemente alle cellule epiteliali intestinali, pertanto è stato creato un nuovo gruppo di *E. Coli* enteropatogeni: Adherent Invasive *Escherichia Coli* o AIEC⁽¹¹³⁾. La colonizzazione

anomala della mucosa intestinale è probabilmente dovuta a caratteristiche tipiche dei pazienti con CD, tra queste potrebbe esserci l'aumentata espressione di CEACAM6 da parte delle cellule epiteliali di tali soggetti, un recettore che è risultato essere overespresso nei pazienti positivi agli AIEC^(116,117) e che riconosce uno dei fattori di virulenza principali di questi ceppi patogeni, il pilus di tipo 1.

Escherichia Coli è un batterio Gram negativo, asporigeno, flagellato, aerobio/anaerobio facoltativo, normale componente del microbiota intestinale (Fig. 1.11). Esistono ben 171 sierotipi patogeni intestinali, suddivisi in gruppi sulla base del meccanismo con cui esplicano la loro virulenza, pertanto distinguiamo: E. Coli EnteroInvasivi (EIEC), EnteroTossigeni (ETEC), EnteroPatogeni (EPEC), EnteroEmorragici (EHEC), EnteroAggregativi (EAggEC), ed Aderenti - Invasivi (AIEC)⁽¹¹³⁾. Quest'ultimo gruppo è considerato patogeno opportunista; in particolare, a questo gruppo appartengono il sierotipo O83:H1 e il ceppo LF82, che sembrano essere maggiormente coinvolti nella CD e sono stati isolati dalle lesioni intestinali, precoci e croniche, dei pazienti affetti da morbo di Crohn con frequenza statisticamente significativa^(128,129,130).

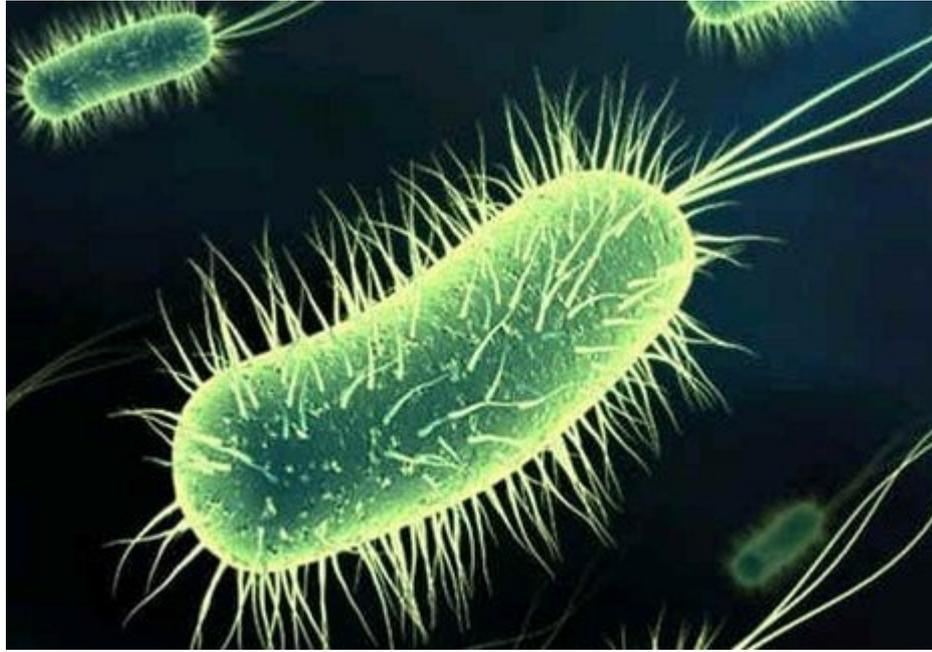


Fig. 1.11 - Immagine da microscopio a scansione di E.Coli

Il meccanismo d'azione di tali batteri sembra essere il seguente (Fig. 1.12): essendo ceppi adesivi – invasivi, il primo step è l'adesione del batterio alla cellula ospite, in particolare alle cellule M, agli enterociti, ai fagociti professionisti. In seguito all'adesione, il batterio viene fagocitato dall'ospite e permane vitale all'interno dei lisosomi di tali cellule, dove stimola la produzione e la secrezione di citochine proinfiammatorie quali TNF-alfa, IL-17, IFN-gamma, IL-12, IL-8, che determinano lo stato infiammatorio cronico con conseguente aumento della permeabilità intestinale e danno alla mucosa⁽¹³¹⁾.

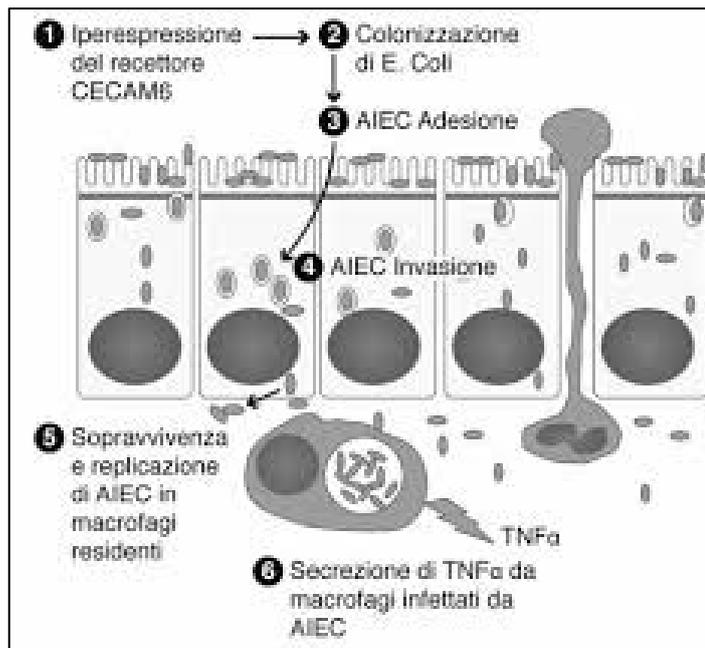


Fig. 1.12 - Meccanismo d' azione AIEC.

La capacità del batterio di aderire ed invadere la mucosa intestinale e di permanere vitale all'interno della cellula ospite, dipende da fattori di virulenza legati al batterio stesso, in particolare la presenza di un pilus di tipo 1⁽¹²²⁾, assente nei ceppi di E. Coli non patogeni, ma anche di fattori legati all'ospite. In particolare due molecole della cellula ospite sono da considerarsi i “cavalli di Troia” che il batterio sfrutta per esplicare la sua azione patogena: 1) CEACAM 6 (CarcinoEmbryonic Antigen – related Cellular Adhesion Molecule 6)⁽¹²⁷⁾, una molecola di adesione intercellulare, presente su granulociti, macrofagi e cellule epiteliali (Fig. 1.13). Essa funge da recettore per il pilus di tipo 1 dei ceppi AIEC di E. Coli, permettendo così al batterio di aderire alla cellula ospite; in effetti tale proteina risulta essere overespressa a livello delle lesioni ileali dei pazienti affetti da CD.

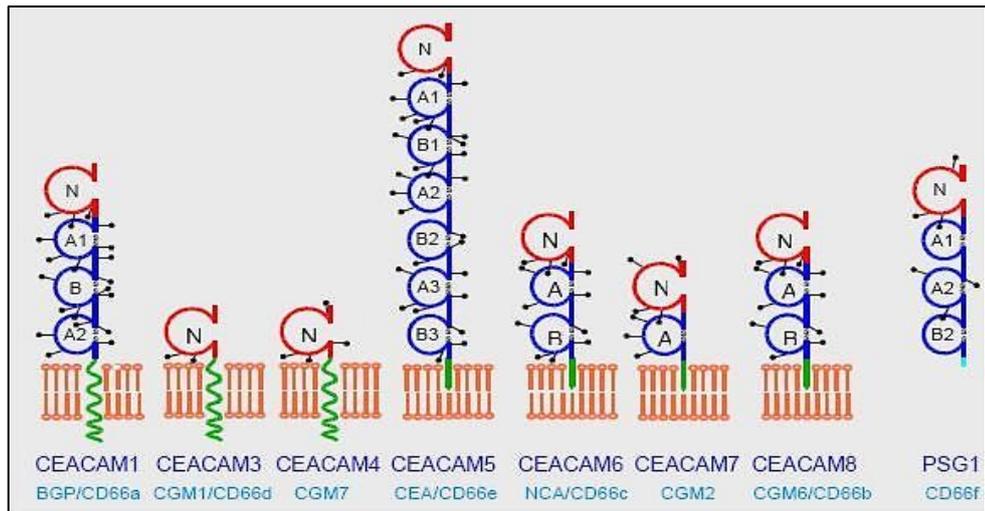


Fig. 1.13 - Famiglia delle molecole di adesione CEACAM.

2) LAMP 1 (Lysosome Associated Membrane Protein 1) che è una glicoproteina altamente presente sulla membrana dei lisosomi (Fig. 1.14), anch'essa riconosce il pilus di tipo 1 degli E. Coli patogeni, pertanto potrebbe essere responsabile della detenzione e della sopravvivenza del batterio nei lisosomi dell'ospite^(132,133). Anche tale molecola risulta overespressa, in particolare in macrofagi e granulociti, a livello delle lesioni ileali dei malati di Crohn⁽¹³³⁾.

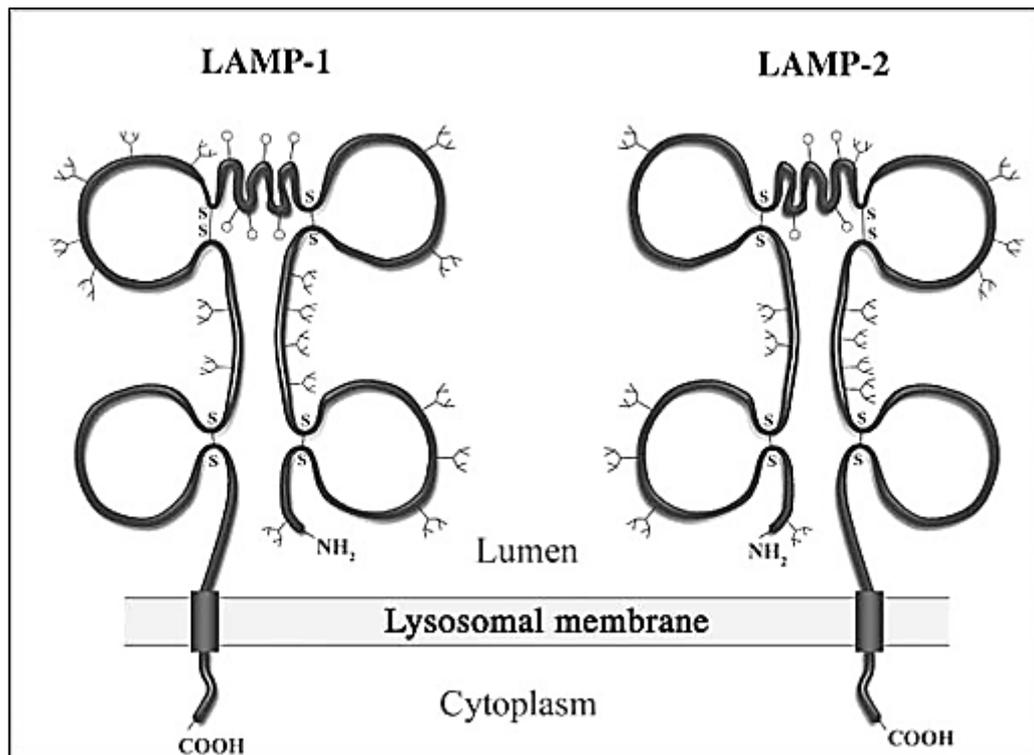


Fig. 1.14 - LAMP1 sulla membrana lisosomale di macrofagi.

La scoperta di queste molecole ed il fatto che per le IBD non ci siano ancora cure definitive, hanno aperto la strada a diversi studi atti a determinare l'eventuale agente eziologico e le nuove possibili strategie terapeutiche.

Il modello di cultura organo da noi utilizzato può rappresentare un valido strumento per studiare i meccanismi molecolari che legano questi batteri alla risposta infiammatoria cronica che si innesca e persiste nelle IBD^(118,119,120).

1.8 SCOPO PARTE 2

Proprio in virtù di quanto appena detto, nella seconda fase del mio percorso di dottorato, lo scopo del lavoro è stato quello di chiarire il ruolo dei ceppi AIEC nell'eziopatogenesi del morbo di Crohn; in effetti fino ad oggi, nessuno ha ancora chiarito se lo stato infiammatorio cronico, caratteristico della MC, nei soggetti geneticamente predisposti si instaura in seguito alla colonizzazione della mucosa intestinale da parte di questi batteri, oppure se è proprio questa infiammazione persistente che favorisce, l'invasione della mucosa da parte dei patogeni.

Pertanto si sono studiati i meccanismi molecolari che sono attivati e/o modificati nell'intestino, dopo l'infezione con due ceppi AIEC, LF82 e O83: H1, in un sistema di coltura d'organo, che permette di riprodurre condizioni sperimentali in vitro il più possibile vicine alle condizioni presenti in vivo, e in un modello in vitro con cellule Caco2. Chiaramente a queste due tecniche sperimentali si sono associate metodiche per le analisi molecolari, in particolare immunoistochimica, immunofluorescenza e qPCR.

2. MATERIALI E METODI

2.1 PAZIENTI

Presso l' A.O. San G. Moscati di Avellino e la Clinica S. Rita di Atripalda, sono stati reclutati 12 pazienti con CD quiescente (8 maschi e 4 femmine, età media 33 anni, range 21-71). Tutti i casi sono stati diagnosticati in base ai criteri stabiliti nel 1971 dalla Società Europea di Gastroenterologia Pediatrica e Nutrizione (ESPGAN). Nessuno dei pazienti inseriti nello studio era mai stato trattato con ciclosporina o anti-TNF α . Inoltre sono stati reclutati 5 controlli (3 maschi e 2 femmine, età media 35 anni, range 24-64), la cui diagnosi finale era diversa da CD (3 erano affetti da costipazione, 2 da dolori addominali ricorrenti). Lo studio ha ricevuto l'approvazione da parte del comitato etico della Campania Nord (registro CECN / 234), in conformità alle disposizioni della Dichiarazione di Helsinki. Il consenso informato è stato ottenuto per ogni soggetto partecipante.

2.2 COLTURE BATTERICHE

Ceppi di E. coli O83: H1, LF82 (fornito dal Dipartimento di Microbiologia e Immunologia, Università del Texas Medical Branch, 301 Università Blvd., Galveston, Texas 77.555-1070, USA) sono state

isolati da biopsie di ileo e colon ascendente e discendente di pazienti con malattia di Crohn, effettuate presso l'ospedale tedesco di Charité dal Dr. Alexander Swidsinski. I ceppi LF82 e O83: H1 sopravvivono e replicano nel citoplasma della cellula ospite dopo la lisi del vacuolo endocitico. Il processo invasivo di LF82 ed O83: H1 è unico, in quanto non possiedono nessuno dei fattori genetici di invasività descritti per i ceppi di E. Coli enteroinvasivi, enteropatogeni ed enterotossigeni e per Shigella. I fattori di virulenza che conferiscono ai nostri ceppi la loro capacità invasiva sono: il pilus di tipo 1 che permette l'adesione alla membrana dell'ospite, i flagelli che conferiscono motilità al batterio e regolano l'espressione del pilus, vescicole derivanti dalla membrana esterna che forniscono effettori batterici alle cellule ospiti e la proteina della membrana esterna OmpC, che regola l'espressione della maggior parte dei fattori di virulenza. I ceppi non patogeni di E. coli sono stati forniti dal laboratorio della Dott.ssa Sorrentino (ISA-CNR di Avellino). Tutti gli organismi sono stati inoculati in 10 ml di brodo Lauria-Bertani e incubati overnight a 37 ° C in un incubatore dotato di agitatore. Le colture sono state, poi, centrifugate a 10000 rpm per 10 minuti e lavate due volte con tampone salino sterile (PBS). I pellet batterici sono stati risospesi in 10 ml di PBS, e i batteri sono stati contati utilizzando una camera di conteggio Petroff Hausser (Hausser Scientific, Horsham,

PA) per determinare il numero di unità formanti colonie (CFU); per ulteriore conferma le CFU sono state piastrate utilizzando diluizioni seriali dell' ordine di 10. Infine si sono ottenute concentrazioni batteriche di 10^8 CFU/mL tramite diluizioni standard, le quali sono state utilizzate negli esperimenti di coltura cellulare e d' organo.

2.3 COLTURA D' ORGANO

Da ogni paziente sono stati raccolti 5 campioni biotici di tessuto sano (colon) e 2 biopsie di tessuto infiammato, tramite colonoscopia. Le biopsie raccolte, sono state trasportate in laboratorio all'interno di provette contenenti soluzione fisiologica e antibiotici (streptamicina e penicillina 1%), poste in un contenitore termico con ghiaccio secco. Subito dopo l'asportazione, ciascun campione è stato lavato in 0,15 mol /L di NaCl, le biopsie di tessuto infiammato e una biopsia di tessuto sano sono state orientate e poste in OCT (Tissue Tek, Miles Laboratories, Elkhart, Indiana, USA), ed infine congelate in azoto liquido e conservate a -70° C fino al momento del criosezionamento. Le restanti biopsie sono state collocate su una maglia di acciaio inossidabile posizionata sopra il pozzetto centrale di una piastra di coltura d'organo (Falcon) con la superficie mucosale del campione rivolta verso l'alto. Il pozzetto centrale della piastra è stato, poi, riempito con il mezzo di coltura (Dulbecco's modified Eagle's

medium o DMEM, integrato con F12) in modo che esso raggiungesse solo la superficie di taglio del campione biotico, senza sommergerlo. I punti di coltura allestiti sono stati 4: 1) N, coltura con il solo mezzo, senza batteri; 2) NP, coltura con la sospensione di E. Coli non patogeno; 3) LF82, coltura con la sospensione di E. Coli AIEC, ceppo LF82; 4) O83:H1, coltura con la sospensione di E. Coli AIEC, sierotipo O83:H1. La sospensione batterica, ad una concentrazione di 10^8 CFU/ml, veniva posta sulla superficie apicale della mucosa intestinale. Dopo una prima incubazione di tre ore, in una camera anaerobica a 37° C, le biopsie, lavate con tampone PBS, venivano ulteriormente incubate nella cameretta a 37° C, con Ossigeno (95%) e CO_2 (5%) per altre 5 ore con la presenza di solo terreno di coltura contenente antibiotici (DMEM/F12 + Gentamicina 10mg / mL, Streptamicina 10 mg / mL e Penicillina 10000 unità / mL), senza l'aggiunta della sospensione batterica.

A 8 ore si sono stoppate le colture e le biopsie sono state congelate, mediante l'ausilio dell'OCT, in azoto liquido, dove vengono conservate fino al momento del taglio al criostato e delle successive analisi.

Le biopsie congelate sono state tagliate al criostato (CM1950, Leica Biosystem) in modo da ottenere sezioni di tessuto dello spessore di 6

µm che sono state raccolte su appositi vetrini amilosati ed utilizzate per le analisi di immunoistochimica ed immunofluorescenza.

2.4 IMMUNOISTOCHIMICA

Le criosezioni sono state asciugate a temperatura ambiente per 24 ore e successivamente fissate in acetone per 10 minuti a 4°C. Dopodichè si è proceduto all' immunoistochimica per valutare i livelli di espressione di due marcatori classici di attivazione immunologica: HLA-DR(antigene di istocompatibilità di classe II) e ICAM1 (molecola di adesione endoteliale). Per inibire la perossidasi endogena, le sezioni sono state dapprima incubate con H₂O₂ al 30% e NaN₃ al 4% (Sigma-Aldrich) per 10 minuti, poi con Normal Rabbit Serum (Vector Lab) per 30 minuti per saturare i siti aspecifici, dopodichè sono state incubate individualmente con mouse anti-HLA-DR (BD Biosciences, 1:10) e mouse anti-ICAM1 (BD Biosciences, 1:10), e poi colorate seguendo il metodo PAP (perossidasi antiperossidasi)⁽¹³⁴⁾. Le sezioni sono state infine contrastate con colorante nucleare, ematossilina di Mayer (Bio - Ottica, Milano), montate con Aquamount ed analizzate al microscopio ottico (Zeiss Primotech).

2.5 IMMUNOFLUORESCENZA

Le criosezioni, asciugate e fissate in acetone, sono state sottoposte ad immunofluorescenza per rilevare i segnali di due marcatori specifici, CEACAM6 e LAMP1, indicatori, rispettivamente, dell' invasione e della sopravvivenza del batterio nella cellula ospite. Dopo la fissazione in acetone, le sezioni sono state incubate prima in PBS 1% BSA (Sigma) per 30 minuti e poi singolarmente con anticorpi monoclonali murini anti-CEACAM6 (Santa Cruz, 1: 500) e anti-LAMP1, (eBioscience, 1: 200) per un' ora, a ciò è seguita un' incubazione di 45 minuti al buio, con goat-anti mouse FITC (Molecular Probes 1: 500). Infine sono stati contrastati i nuclei con Topro-3 (Molecular Probes, 1: 500) per 30 minuti. Le sezioni sono state montate in PBS : glicerolo (1: 1) ed analizzate al microscopio confocale Leica SP (Leica Microsystem Milano Italia).

2.6 ANALISI IMMUNOMORFOMETRICA

Il numero di cellule mononucleate della lamina propria (LPMNC) esprimenti LAMP1 e HLA-DR è stato valutato all'interno di una superficie totale di 1 mm² di lamina propria. L' intensità del segnale emesso dalle cellule epiteliali esprimenti CEACAM6 e LAMP1, nonché l'espressione di ICAM1 sui vasi sanguigni è stata valutata in

termini di intensità di colorazione utilizzando una scala arbitraria con valore di 1= segnale assente, 2=segnale debole, 3=segnale moderato, 4=segnale forte, come precedentemente riportato^(134,135). Le conte sono stati effettuate in modo indipendente in cieco da due osservatori.

2.7 COLTURA CELLULARE

Per il modello in vitro sono state utilizzate cellule Caco-2 (cellule di adenocarcinoma del colon umano), acquistate da ATCC (Rockville, MD, USA). Le cellule sono state coltivate in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplementato con siero fetale bovino al 10% (FBS, Sigma Aldrich), 1% di penicillina / streptomina, 1% L-glutamina, all'interno di fiasche T-75, a 37 ° C in aria umidificata contenente il 5% di CO₂. Una volta che le cellule hanno raggiunto una confluenza di circa il 90%, sono state separate utilizzando una soluzione allo 0,25% di tripsina (per digerire la matrice extracellulare), contenente 1,0 mM di EDTA (agente chelante il calcio, da cui dipende l'adesione cellula - cellula). Dalla sospensione cellulare ottenuta si è ottenuta una coltura primaria di cellule che sono state seminate in piastre da 6 pozzetti per i successivi esperimenti. Il mezzo è stato cambiato ogni giorno.

2.8 SAGGI DI INVASIONE

Il monostrato di cellule Caco-2 è stato seminato in piastre di coltura a 6 pozzetti con 4×10^5 cellule / pozzetto. I ceppi di E. Coli (LF82, O83: H1 e non patogeno) sono stati coltivati durante la notte in brodo LB a 37 ° C e sono stati letti allo spettrofotometro per determinare la concentrazione (1 OD corrispondeva a 1×10^9 batteri). Ogni monostrato è stato infettato con 2 ml di mezzo di coltura cellulare senza antibiotici e contenente 10 batteri / cellula. Dopo un periodo di incubazione di 3 ore a 37 ° C con 5% CO₂, i monostrati di cellule infette sono stati lavati tre volte con PBS. Per il saggio di invasione, è stato aggiunto terreno fresco addizionato con 100 mg/ml di gentamicina, necessaria per uccidere i batteri extracellulari. Dopo incubazione per un'altra ora, le cellule sono state lavate tre volte con PBS, e sono stati aggiunti 2 ml di terreno di coltura fresco (DMEM) con antibiotici (streptamicina/penicillina 1 %), lasciando le cellule per altre 24 ore. Trascorso questo tempo le cellule sono state preparate per la lettura al FACS. Ciascun punto è stato fatto in duplicato.

2.9 CITOMETRIA A FLUSSO PER IL RILEVAMENTO DEL CICLO CELLULARE

Ventiquattro ore dopo il trattamento, le cellule infettate, sono state sottoposte a lieve tripsinizzazione, lavate in PBS e fissate in etanolo al 70% a 4 ° C. Le cellule sono state raccolte e risospese in 500 ml di un tampone ipotonico (0,1% TritonX 100, 0,1% sodio citrato, 50 mg / ml di ioduro di propidio, e 100 mg / ml RNasi). Quindi sono state analizzate usando il citometro di flusso Becton Dickinson FACSCalibur™ (BD Biosciences) e sono state calcolate le percentuali popolazioni cellulari nelle fasi G1, S, G2 / M, e sub-G1 (cellule apoptotiche). Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato.

Valutazione ciclo cellulare mediante DAPI staining

Le cellule sono state poste su vetrini a una densità di 5×10^5 cellule per pozzetto, in terreno DMEM e infettate. Al momento dell'esperimento, il vecchio mezzo è stato rimosso e le cellule sono state lavate in PBS e fissate con paraformaldeide al 4% per 8 minuti a 4 ° C e lavate tre volte in PBS 1%. Le cellule sono state, poi, incubate con 0,1% Triton X-100 per 10 minuti e con DAPI (Sigma, 1: 1000 in tampone bloccante) per 15 minuti e montate con glicerolo al 50%. I segnali sono stati visualizzati alla lunghezza d'onda di 350 / 460nm

(eccitazione / emissione) utilizzando un microscopio a fluorescenza (modello IX71, Olympus, Giappone).

2.10 RT-PCR

Tramite qPCR, si è andati a valutare i livelli di espressione di tre delle principali citochine pro-infiammatorie coinvolte nel Crohn: IFN-gamma, TNF-alfa e IL-8, e di due geni coinvolti rispettivamente nei meccanismi di riparo del DNA e nella regolazione dell' espressione genica: MGMT (O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase) e DNMT1 (DNA-methyltransferase 1). A tal scopo, le linee Caco2 infettate sono state lavate in PBS 1X e lisate in piastra in 3 ml di soluzione di guanidinio tiocianato 4M (GTC), sodio citrato 25 mM PH 7, sodio sarcosil 0.5% completata con β -mercaptoetanololo 100 mM, dopodichè si è proceduto all'estrazione dell' RNA totale mediante kit riportato di seguito. Le biopsie congelate di tutti i pazienti, sia quelle che sono state poste in coltura che quelle basali (tessuto sano e infiammato non posto in coltura ma congelato immediatamente dopo l'arrivo in laboratorio), sono state tagliate al criostato. Da ogni biopsia si sono ottenute 10 sezioni che sono state raccolte in un'ependorf contenente 30 μ l di buffer di lisi (Life Technologies, Italia) e 0,5 μ l di inibitore delle RNasi (40 U/ μ l, BioLabs inc.). Le eppendorf contenenti le sezioni biotiche sono state poi incubate a 42°C per 30' e

poi centrifugate a 3000 rpm per 2', dopodichè si è proceduto all'estrazione dell'RNA totale mediante un kit che sfrutta microcolonne di resina, PicoPure RNA Isolation Kit (Life Technologies, Italia), seguendo le indicazioni fornite dalla casa e specificate a pag. 49-50. La quantificazione del materiale estratto è stata effettuata al NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific) e sono stati ottenuti risultati quasi sovrapponibili da ogni campione; la quantità di RNA estratto è pari a circa 20 ng/µl in tutti i campioni. Il protocollo di retrotrascrizione, opportunamente ottimizzato, è basato sui protocolli di Foley *et al.* (1993) e Leonard *et al.* (1993). Il cDNA è stato ottenuto dalla retrotrascrizione di 10 µl di RNA in un volume finale di 20 µl, tramite il SuperScript® VILO cDNA Synthesis Kit (Life Technologies, Italia), utilizzando Random Primers (Tabella 2.1).

Componenti della reazione	Volume per reazione
Reaction Mix 5X	4 µl
SuperScript VILO 10X	2 µl
H2O DEPC	4 µl
RNA Template	10 µl
Volume totale	20 µl

Tabella 2.1 - Reazione di retrotrascrizione

La reazione è stata condotta a:

- 25°C per 10'
- 42°C per 90'

- 85°C per 5' (step necessario per inattivare la SuperScript)
- e quindi raffreddamento a 4°C

Il cDNA è stato diluito 1:10 in TE (Tris EDTA) ed ogni campione così ottenuto è stato suddiviso in diverse aliquote in modo da evitare stress termici. I campioni sono stati conservati a -20°C e scongelati all'occorrenza.

Per l'analisi in Real Time-PCR (qPCR) si è scelta la chimica SYBR® Green, per la sua maggiore flessibilità operativa, utilizzando la Master Mix PowerSYBR Green PCR (LIFE TECHNOLOGIES, ITALIA) e come normalizzatore del segnale, il sistema ROX. La reazione di amplificazione è avvenuta in piastre da 96 pozzetti (Applied Biosystems, Italia) ed è stata allestita in un volume finale di 35 µl, con 10 µM primer, *forward e reverse* trascritto-specifici, e 2 µl di cDNA (Tabella 2.2).

Componenti della reazione	Volume per reazione
Master Mix PowerSYBR Green PCR 2X	17,5 µl
Primer Forward	0,7 µl
Primer Reverse	0,7 µl
H ₂ O DEPC	14,1 µl
CDNA	2 µl
Volume finale	35 µl

Tabella 2.2 - Reazione di RT-PCR.

L'amplificazione/acquisizione è stata eseguita su un termociclatore ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) equipaggiato con software versione 1.2.3. I cicli di amplificazione ottimizzati sono riportati di seguito, stabilendo la Temperatura di Melting (T_m) sulla base dei primer utilizzati.

CICLI OTTIMIZZATI:

a) CICLO A TRE STEP UTILIZZATO PER LA GAPDH

	Fase	Temperatura	Tempo
45 X {	Attivazione TaqGold®	95°C	10'
	Denaturazione	95°C	30''
	Annealing	55°C	30''
	Estensione	72°C	45''

b) CICLO A DUE STEP UTILIZZATO PER TUTTE LE CITOCHINE IN ANALISI E PER I TRASCritti DI MGMT E DNMT1

	Fase	Temperatura	Tempo
45 X {	Attivazione TaqGold®	95°C	10'
	Denaturazione	95°C	15''
	Estensione	60°C	1'

In entrambi i casi all'amplificazione è seguito un ciclo di dissociazione per la valutazione della specificità dei prodotti di amplificazione. Tutte le fasi sono state condotte in condizioni di sterilità. Tutti i punti sperimentali sono stati eseguiti in triplicato e diluizioni seriali di cDNA contenenti quantità note di ogni trascritto sono state usate in ogni qPCR per generare una curva standard.

I prodotti di amplificazione sono stati separati e successivamente controllati mediante elettroforesi su gel d' agarosio al 2%. La corsa elettroforetica è stata effettuata a 90 V in tampone TBE 1X (Tris-HCl 0,45 M, acido borico 0,45 M, EDTA 2,5 mM) utilizzando un marcatore di peso molecolare (GeneRuler™ 50). Le bande corrispondenti ai prodotti di amplificazione sono state visualizzate mediante colorazione con bromuro di etidio (0,5 µg/ml, BioRad) e successivamente digitalizzate e acquisite attraverso lo strumento GelDoc 2000 (BIORAD).

L'espressione genica è stata normalizzata rispetto al trascritto della Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*, gene housekeeping). Esperimenti preliminari hanno confermato che le reazioni di amplificazione erano completamente dipendenti dalla retrotrascrizione e che i prodotti di reazione si accumulavano linearmente rispetto al cDNA introdotto e al numero di cicli operato (dati non riportati). I dati di espressione sono stati analizzati con il

software Data Assist (versione 3) (Applied Biosystems, Italia). I valori di espressione dei diversi trascritti sono stati calcolati con il metodo del $\Delta\Delta CT$ (Livak e Schmittgen, 2001).

I primers utilizzati nelle reazioni di amplificazione sono stati disegnati utilizzando il software ABI Prism Primer Express (versione 2.0), (Applied Biosystems, Life Technologies, Italia) e le sequenze sono riportate nella tabella 2.3.

Gene	Oligonucleotide sequences (5'→3')	
	<i>forward primer</i>	<i>reverse primer</i>
<i>IFN-γ</i>	GTTTTGGGTCTCTTGGCTGT TA	AAAAGAGTTCATTATCCGCT ACATC
<i>TNF-α</i>	CCCCAGGGACCTCTCTCTAA TC	GGTTTGCTACAACATGGGCTA CA
<i>IL-8</i>	CAGCTCTGTGTGAAGGTGCA GTT	GGGTGGAAAGGTTTGGAGTA TGTC
<i>DNMT 1</i>	ACCAAGCAGGCATCTCTGAC	ACCAGCTTCAGCAGGATGTT
<i>MGMT</i>	GGCACCGCTGTATTAAAGGA	ATAGAGCAAGGGCAGCGTTA
<i>GAPD H</i>	ATGACATCAAGAAGGTGGTG	CATACCAGGAAATGAGCTTG

Tabella 2.3 - Sequenze primers per RT - PCR.

2.11 ANALISI STATISTICHE

I dati sono stati organizzati in Excel (Microsoft) per le successive analisi statistiche, che sono state eseguite in GraphPad Prism (GraphPad Software, CA, USA). I risultati sono stati presentati come espressione media \pm l'errore standard (SEM). Le differenze tra i gruppi sono state comparate utilizzando il test *t* di Student e i test di

analisi della varianza ad una via (ANOVA). E' stato accettato come statisticamente significativo un valore $p < 0.05$.

3. RISULTATI

3.1 AUMENTATA ESPRESSIONE DI CEACAM6, LAMP1, HLA-DR E ICAM1 IN PRESENZA DEI CEPPI AIEC

Sulla base di precedenti studi che hanno dimostrato che ceppi di *E. coli* AIEC sono in grado di aderire alle cellule intestinali⁽¹¹³⁻¹¹⁸⁾, abbiamo focalizzato la nostra attenzione su due ceppi AIEC altamente invasivi: LF82 e O83: H1. Come primo passo, utilizzando un modello di coltura d'organo su biopsie di colon derivate da pazienti affetti da CD abbiamo deciso di studiare gli effetti di tali batteri sull'espressione di due molecole presenti rispettivamente sulla superficie delle cellule epiteliali e sulla membrana lisosomale: CEACAM 6 (Carcinoembrionario - related Cellular Adhesion Molecule 6), una molecola di adesione intercellulare, e LAMP 1 (lisosoma Associated membrane Protein 1), una glicoproteina altamente presente sulla membrana dei lisosomi, le quali sono in grado di riconoscere il pilus di tipo 1 dei batteri AIEC, pertanto risultano importanti per l'adesione, l'invasione e la sopravvivenza del batterio stesso^(127,128,129,130). Inoltre, abbiamo valutato l'espressione di due markers generici di infiammazione ed attivazione immunologica: HLA-DR (molecola facente parte del MHC di classe II, espressa dai linfociti) e ICAM 1 (o CD54, molecola di adesione intercellulare espressa dalle cellule endoteliali e dalle cellule immunitarie). A questo scopo, abbiamo coltivato le biopsie di colon in quattro diverse condizioni: 1) coltivate con il solo mezzo, senza batteri; 2) coltivate con un ceppo non patogeno di *E. Coli*; 3) coltivate con il ceppo AIEC LF82; 4) coltivate con il sierotipo O83: H1. L'intensità del segnale di entrambi i

marcatori, CEACAM6 e LAMP 1, è risultata significativamente aumentata ($p < 0,05$) nelle biopsie infettate con i due ceppi patogeni (LF82 e O83: H1) rispetto alle biopsie infettate con ceppo non patogeno (NP) (Fig. 3.1A-C). Il CEACAM6 è stato osservato sulla superficie dell'epitelio (Fig. 3.2) mentre LAMP1 è espressa all' interno delle cellule epiteliali nonché nelle cellule mononucleate della lamina propria (LPMNCs) (Fig. 3.3).

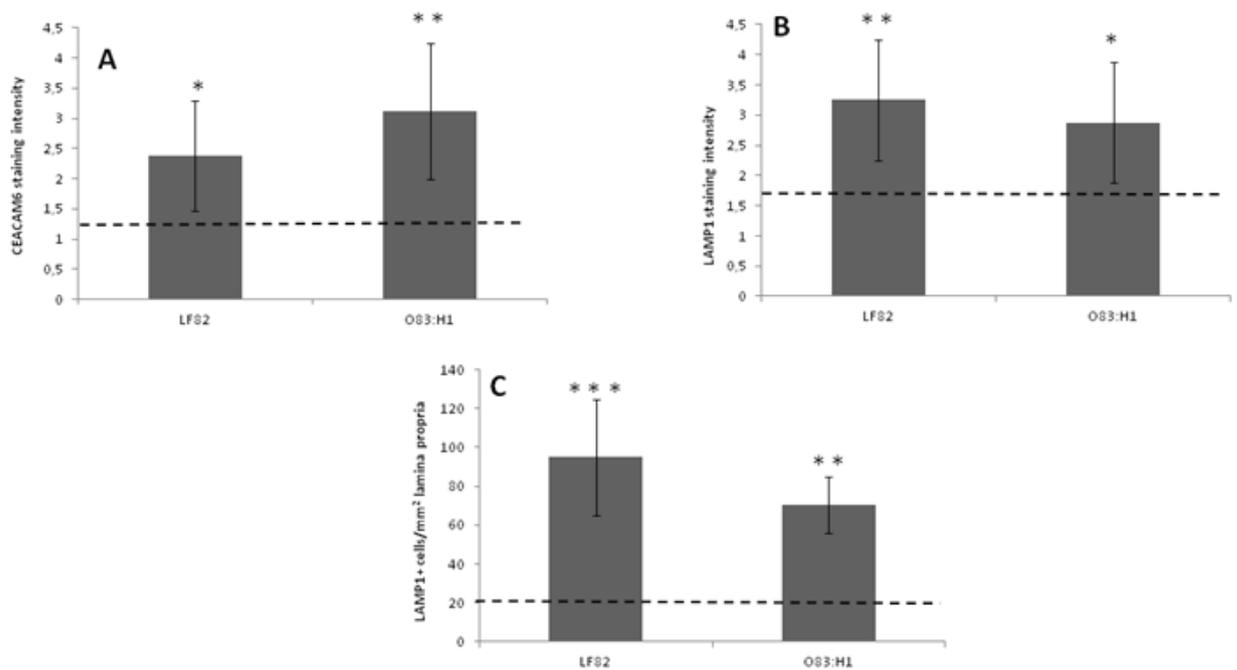


Fig. 3.1 - (A) Diagramma di intensità del segnale del CEACAM6 (FITC) sulla superficie epiteliale; (B) Diagramma dell' intensità del segnale del LAMP1(FITC) nelle cellule epiteliali e nella lamina propria (C). Le linee tratteggiate indicano il segnale medio riscontrato nelle biopsie coltivate con il ceppo non patogeno. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0,001$.

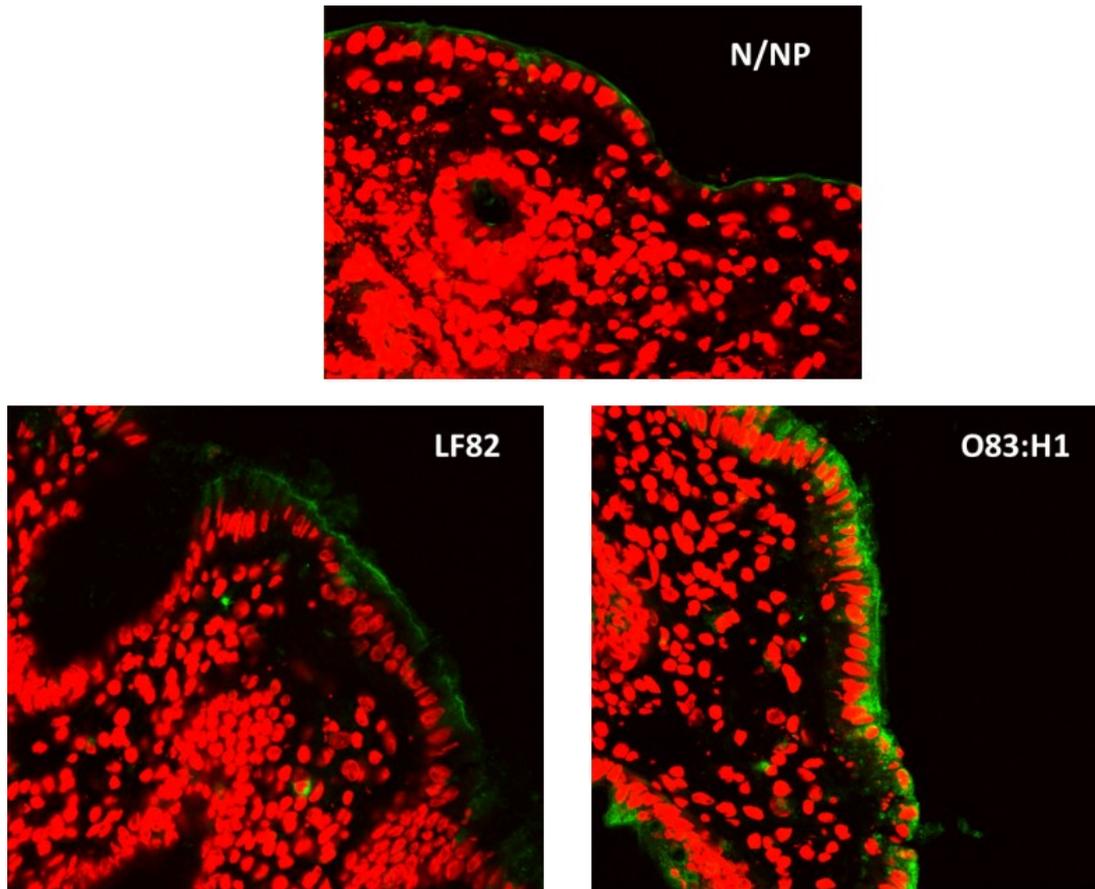


Fig. 3.2 - Espressione del CEACAM6 nella mucosa del colon di pazienti con CD, coltivata in vitro con solo mezzo (N), con E. Coli non patogeno (NP) o con i ceppi AIEC, LF82 o O83:H1.

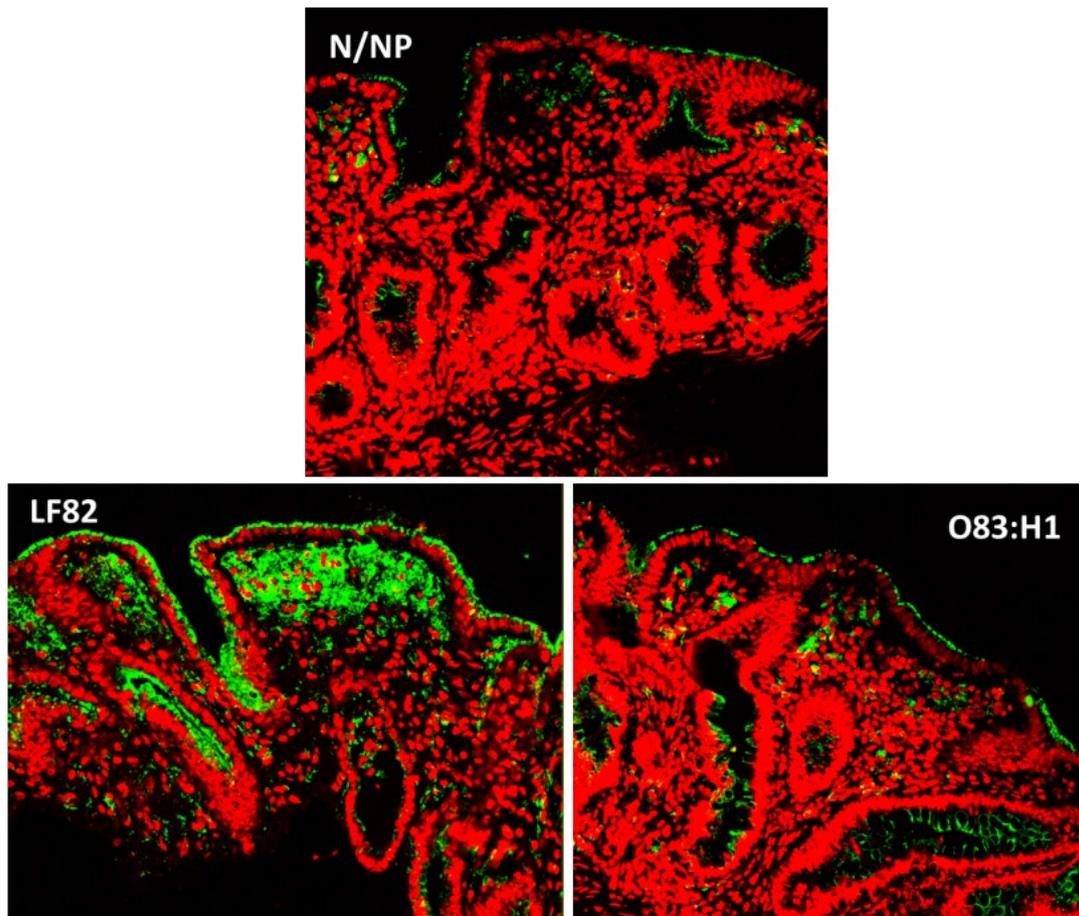


Fig. 3.3 - Espressione del LAMP1 nella mucosa del colon di pazienti con CD, coltivata in vitro con solo mezzo (N), con E. Coli non patogeno (NP) o con i ceppi AIEC, LF82 o O83:H1.

Tuttavia, confrontando i due ceppi patogeni uno con l'altro, è evidente che O83: H1 induce un maggiore aumento dell' espressione di CEACAM6, rispetto a LF82 (Fig. 3.1A, 3.2), d'altro canto LF82 induce un aumento di espressione di LAMP1 maggiore rispetto a O83: H1 (Fig. 3.1B-C e 3.3). Inoltre, nelle biopsie coltivate con LF82 o O83:H1 abbiamo osservato un aumento statisticamente significativo ($p < 0,05$) sia dei livelli di ICAM1 sui vasi sanguigni che di HLA-DR sulle cellule mononucleate della lamina propria (Fig. 3.4A-B) rispetto a quelle coltivate con ceppo non patogeno (NP). Anche in questo caso, confrontando i due ceppi patogeni tra loro, è evidente che O83: H1

induce un aumento dell' intensità del segnale maggiore, sia per ICAM1 che per HLA-DR, rispetto a LF82 (Fig.3.4, 3.5 e 3.6).

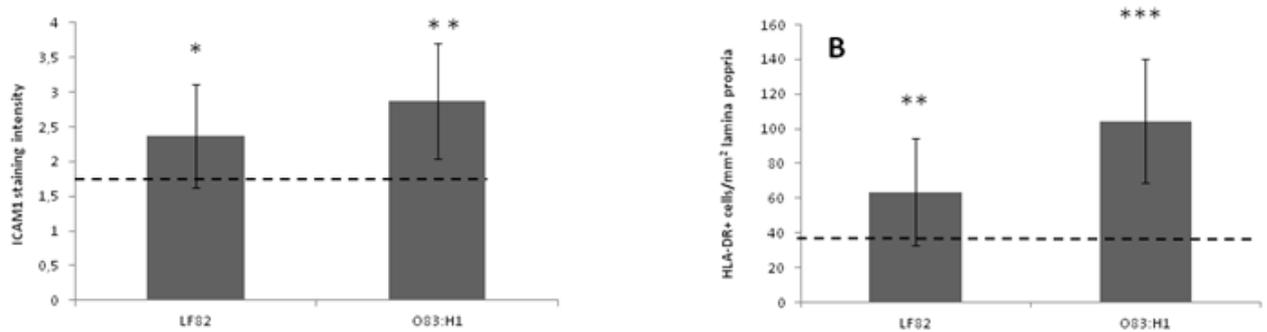


Fig. 3.4 - (A) Diagramma dell'intensità del segnale di ICAM1; (B) Diagramma dell'intensità del segnale di HLA-DR. Le linee tratteggiate indicano l'intensità media del segnale nelle biopsie coltivate con il ceppo non patogeno. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0,001$.

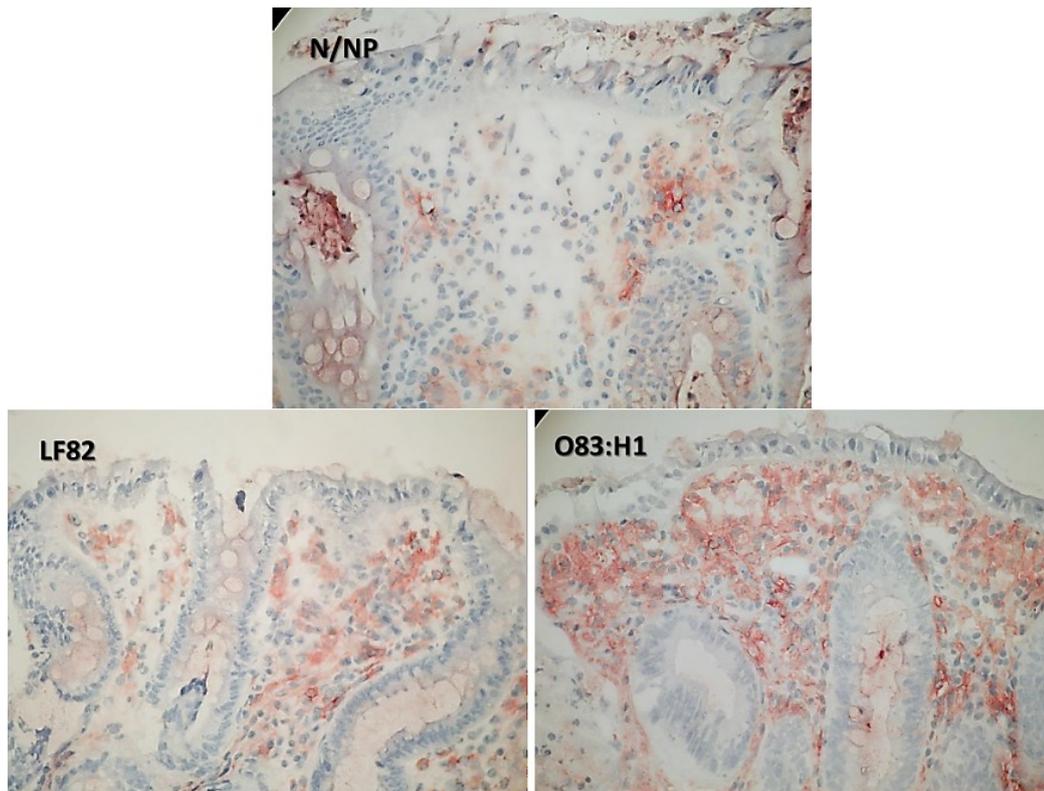


Fig. 3.5 - Segnale HLA-DR espresso sulle cellule mononucleate della lamina propria della mucosa del colon di pazienti con CD, coltivata in vitro con solo mezzo (N), con E. Coli non patogeno (NP) o con i ceppi AIEC, LF82 o O83:H1.

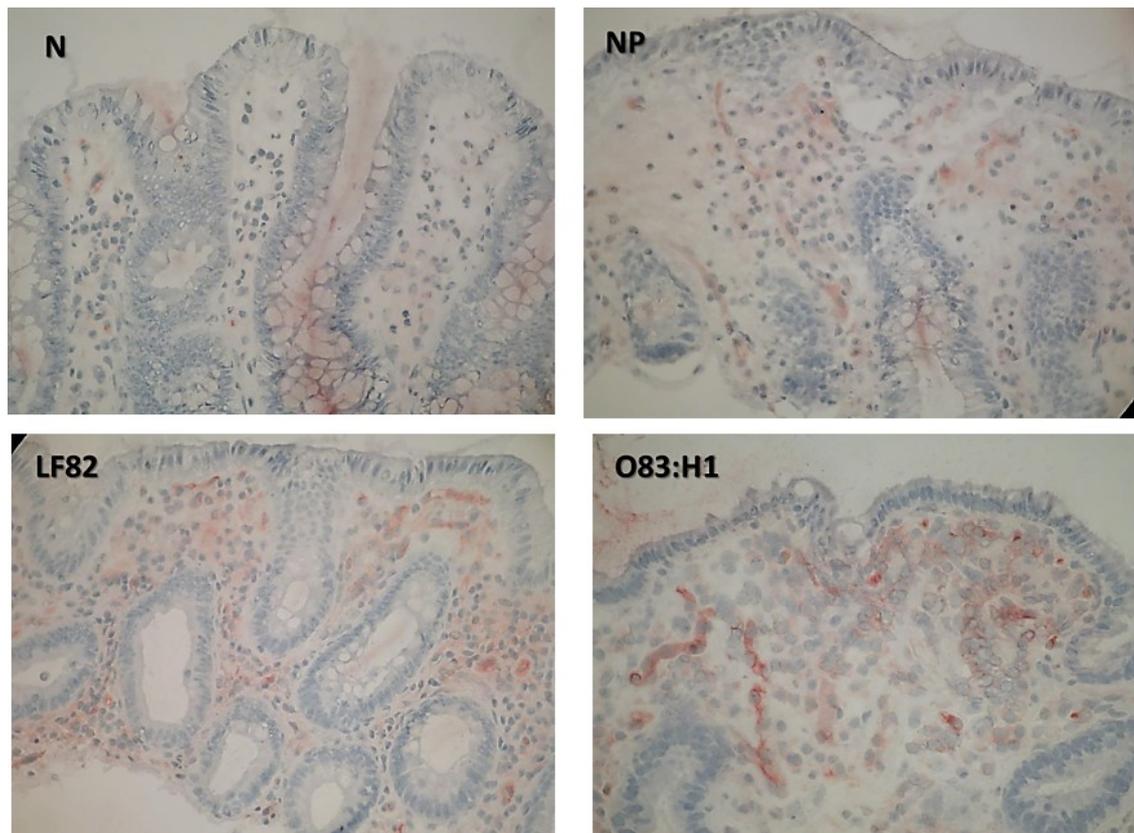


Fig. 3.6 - Segnale dell' ICAM1 sulla superficie endoteliale nella mucosa del colon di pazienti con CD, coltivata in vitro con solo mezzo (N), con E. Coli non patogeno (NP) o con i ceppi AIEC, LF82 o O83:H1.

3.2 LIVELLI DI ESPRESSIONE DI TNF- α , IFN- γ E IL-8

Sulla base dei risultati ottenuti, abbiamo valutato, mediante RT-PCR, i livelli di espressione delle tre citochine maggiormente coinvolte nella patogenesi del Crohn: TNF- α , IFN- γ , IL-8, in tutti i campioni biotipici prelevati da ciascun paziente (tessuto infiammato non coltivato, tessuto coltivato col solo mezzo, tessuto coltivato con E.Coli non patogeno e tessuti coltivati con i ceppi AIEC). Dalla RT-PCR è emerso che le tre citochine vengono indotte in seguito all' infezione

con i ceppi AIEC come si evince dal grafico (Fig. 3.7), in particolar modo, le citochine risultano più espresse nei tessuti coltivati in presenza del sierotipo O83:H1, rispetto a quelli coltivati in presenza del ceppo LF82.

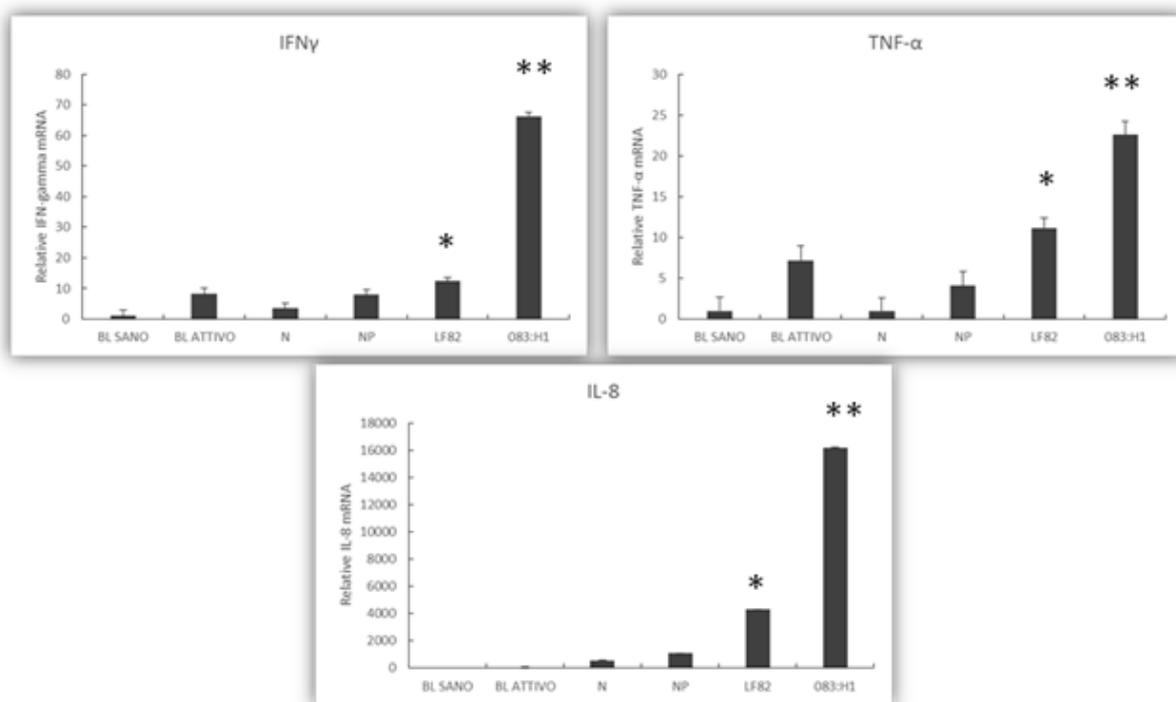


Fig. 3.7 - Livelli di espressione di TNF- α , IFN- γ , IL-8. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (biopsie infettate con i ceppi patogeni vs biopsie infettate col ceppo non patogeno).

3.3 BLOCCO IN FASE S DELLE CELLULE

Caco2 INFETTATE DAI CEPPI AIEC

Come seconda fase, è stata studiata la capacità e di questi due ceppi di invadere le cellule Caco2 in coltura ed influenzare la progressione del ciclo cellulare. Le cellule, dopo l' infezione con i ceppi batterici (patogeni e non patogeno), sono state analizzate mediante FACS. I dati emersi dall' analisi al FACS hanno evidenziato che i due ceppi erano in grado, con una leggera differenza tra i due, di aumentare la

percentuale di cellule in fase S; invece i ceppi non patogeni non erano in grado di influenzare la distribuzione delle cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare(Fig. 3.8).

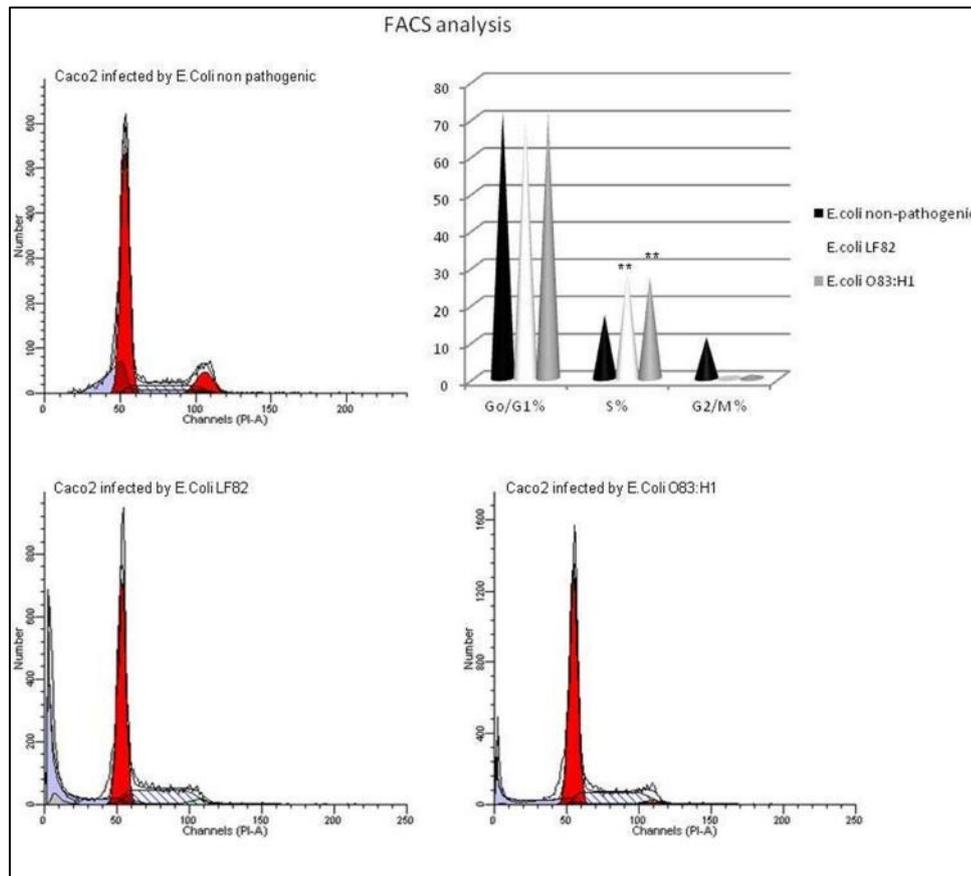


Fig. 3.8 - Analisi al FACS degli effetti sulla progressione del ciclo cellulare dell' infezione con i ceppi AIEC in cellule Caco2. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

3.4 L' INFEZIONE CON CEPPI AIEC INDUCE GRAVI DANNI AL DNA DELLE CELLULE INFETTATE

Per valutare se il blocco in fase S era dovuto a danni al DNA è stata effettuata una colorazione DAPI dei nuclei. Come mostrato in figura 3.9A abbiamo osservato in cellule di controllo che i nuclei delle cellule ciclanti erano perfettamente intatti e la presenza di cellule in mitosi con cromatina ispessita. Nelle cellule trattate con un ceppo non patogeno di *E. coli* (Fig. 3.9B) abbiamo osservato nuclei meno intatti, senza, però, evidenziare danni importanti. Invece, danni evidenti sono stati riscontrati nei nuclei delle cellule infettate con i due ceppi di *E. coli* patogeni; tali danni sono più evidenti in cellule trattate con O83:H1 (Fig. 3.9C-D.), in esse il DNA appare più frammentato e addensato rispetto alle cellule trattate con l'LF82.

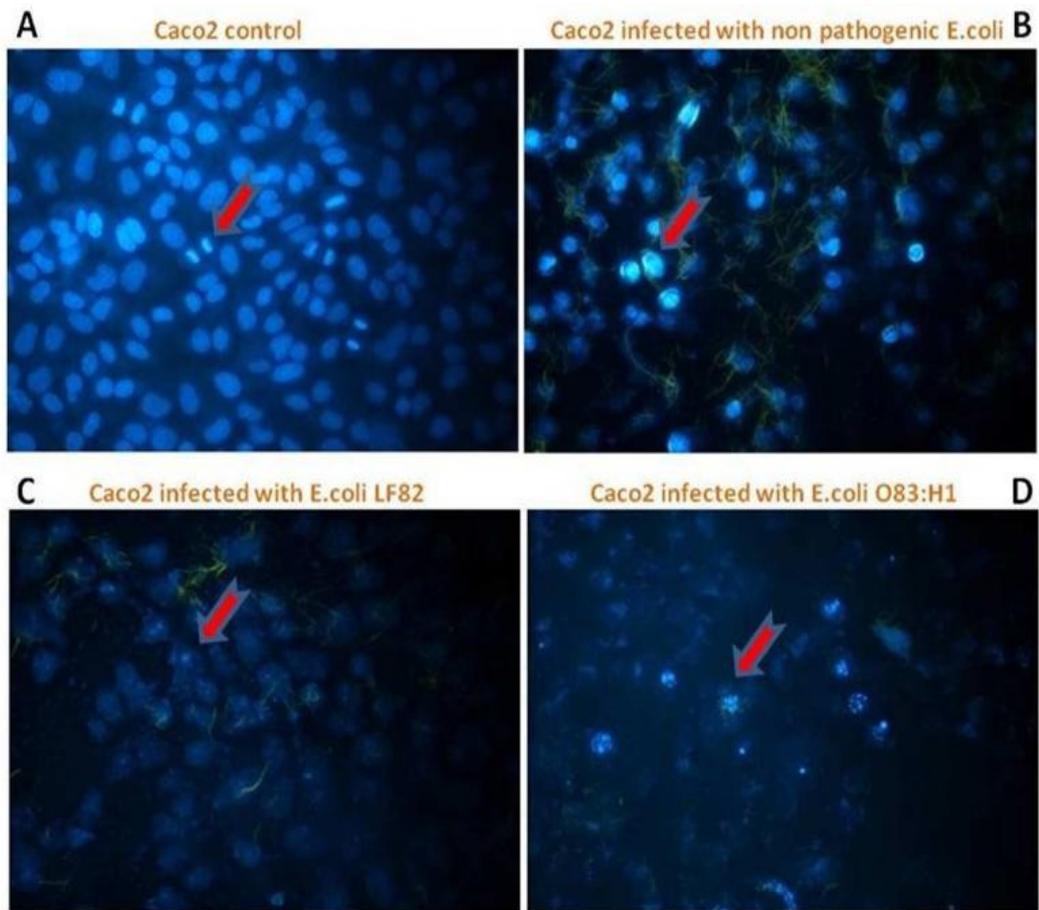


Fig. 3.9 - DAPI staining: (A) Le cellule controllo mostrano nuclei intatti, mentre (B) cellule infettate con E. Coli non patogeno, mostrano nuclei meno intatti ma senza danni importanti. Invece si notano evidenti danni ai nuclei delle cellule infettate con LF82 e O83:H1(C-D).

3.5 LIVELLI DI ESPRESSIONE DEI GENI MGMT E DNMT1

Sulla base dei dati ottenuti, abbiamo deciso di valutare i livelli di espressione di due geni: MGMT (O^6 -metilguanina-DNA-metiltransferasi), un gene coinvolto nella riparazione di danni al DNA, e DNMT1 (de novo metiltransferasi), un gene coinvolto nella

metilazione del DNA. Dalla RT-PCR, utilizzando come controllo le cellule infettate con il ceppo non patogeno di E. Coli, abbiamo osservato un aumento dei livelli trascrizionali del gene MGMT nelle cellule infettate con i ceppi patogeni, specialmente nelle cellule trattate con O83: H1, nelle quali i livelli di trascritto sono quasi raddoppiati il rispetto al controllo. Invece abbiamo osservato una diminuzione dei livelli trascrizionali di DNMT1 (Fig. 3.10).

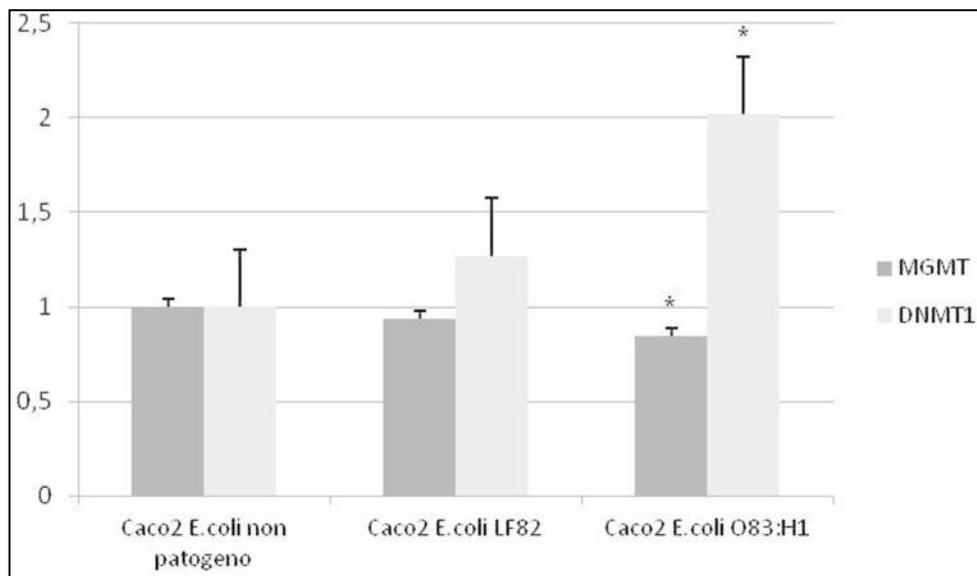


Fig. 3.10 - Livelli di espressione di MGMT e DNMT1. *p < 0.05, **p < 0.001 (cellule infettate con i patogeni vs controllo, ovvero cellule infettate con ceppo non patogeno).

4. DISCUSSIONE

In pazienti affetti da CD vi è una maggiore presenza di E. coli, in particolare, negli ultimi anni, l'attenzione è stata focalizzata su un particolare gruppo di E. coli, isolati da lesioni ileali e coliche di pazienti affetti da Crohn, che mostrano proprietà di adesione alle cellule della mucosa intestinale molto maggiori rispetto ad altri ceppi fino ad oggi conosciuti^(113,114,115). Questo gruppo è stato definito AIEC, Escherichia Coli aderenti-invasivi; questi ceppi, infatti, hanno la capacità di aderire alle cellule epiteliali intestinali ma anche di attraversare la barriera epiteliale, raggiungere la lamina propria e qui invadere i macrofagi e le cellule dendritiche, sopravvivendo e replicando all'interno di tali cellule ed inducendo la produzione ed il rilascio di citochine infiammatorie, in particolare TNF- α , una citochina chiave nella patogenesi delle IBD^(136,137). Il modello ex vivo della coltura d'organo intestinale, da noi utilizzato, si è rivelato uno strumento prezioso per studiare la risposta immunitaria della mucosa che si innesca nelle prime fasi di interazioni tra i batteri patogeni e l'intestino umano^(138,139).

In tale modello abbiamo coltivato biopsie di colon da pazienti con CD in remissione e valutato gli eventi molecolari associati alla risposta immunitaria ed infiammatoria innescati in seguito all'infezione con i ceppi AIEC. Dall'analisi dei dati ottenuti, sia dall'immunofluorescenza che dall'immunoistochimica, si può dedurre che nei tessuti coltivati in presenza dei ceppi patogeni di E. Coli, il segnale dei marcatori presi in esame è più forte rispetto a quello che si rileva nei tessuti coltivati in presenza del ceppo controllo (E. Coli non patogeno). In particolare, tali batteri inducono nei tessuti l'espressione di CEACAM6 e di LAMP1, utili al batterio stesso per invadere la

mucosa intestinale, raggiungere la lamina propria e sopravvivere nei lisosomi delle cellule macrofagiche. Questo è un dato importante, in quanto si chiarisce per la prima volta che questi ceppi sono in grado di up-regolare l'espressione di tali molecole nei tessuti. Se tale induzione avviene direttamente oppure indirettamente, come conseguenza dell'aumento di citochine infiammatorie, è attualmente oggetto di studio. L'infezione dei tessuti con i ceppi AIEC, inoltre, fa aumentare il segnale di due markers infiammatori, HLA-DR e ICAM1. L'aumentata espressione di ICAM1 sulle cellule endoteliali dei vasi sanguigni all'interno della lamina propria, permette l'adesione delle cellule T, dei macrofagi e dei neutrofilii circolanti, in tal modo queste cellule migrano e si accumulano nella lamina propria ed innescano/rafforzano la risposta infiammatoria^(140,141,142,143). L'aumentata espressione di HLA-DR nella lamina propria di biopsie infettate con i ceppi AIEC, conferma che questi ceppi inducono il reclutamento di cellule immunitarie, macrofagi e linfociti, nel sito di infezione, una situazione che porta ad alterazioni dell'omeostasi immune mucosale, con conseguente infiammazione cronica e danno tissutale. I macrofagi sono la prima linea di difesa contro ospiti indesiderati; questi sono in grado di fagocitare gli agenti patogeni in fagosomi che rapidamente evolvono in fagolisosomi, in grado di digerire il contenuto al loro interno, creando un ambiente fortemente acido e ricco di enzimi litici⁽¹⁴⁴⁾. Durante il processo di fagocitosi e la maturazione degli endosomi, la distribuzione recettoriale sulla superficie di questi organuli cambia rapidamente; in una fase iniziale vi è l'espressione dei recettori della transferrina (TFR), subito sostituiti sugli endosomi precoci da altre proteine (EEA1 e la GTPasi Rab5), sostituite, a loro volta, da proteine che caratterizzano gli endosomi maturi (GTPasi Rab7 e LAMPs), fino alla formazione di fagolisosomi

caratterizzati dalla presenza di numerose Rabs, LAMPs e catepsina D. L' infezione di E. coli AIEC induce una rapida maturazione degli endosomi, che perdono i recettori endosomali precoci (EEA1), ed esprimono precocemente LAMP1, marker degli endosomi maturi⁽¹⁴⁵⁾. Questa glicoproteina viene indotta nelle biopsie infettate con i ceppi AIEC, ma non in quelle coltivate in presenza del ceppo non patogeno; essa è in grado di riconoscere il philius di tipo 1 degli AIEC, pertanto potrebbe essere responsabile, in qualche modo, della detenzione e della sopravvivenza del batterio nei lisosomi dei macrofagi.

Inoltre, confrontando i segnali ottenuti dalle sezioni di tessuto coltivate con il sierotipo O83:H1 con quelli ottenuti dalle sezioni di tessuto coltivato con il ceppo LF82, si nota che essi sono più forti nelle prime per quanto concerne il CEACAM6, l' HLA-DR e l' ICAM1, mentre sono più forti nelle seconde per quanto riguarda il LAMP1. Tali dati suggeriscono che il sierotipo O83:H1 è più patogeno, in quanto, a parità di concentrazione e condizioni sperimentali, induce maggiormente lo stato infiammatorio, mentre il ceppo LF82 è più invasivo ma meno patogeno, in quanto, induce maggiormente il LAMP1, segno che il batterio ha invaso le cellule e permane al loro interno arrecando meno danni (l' attivazione immunologica è di entità inferiore) rispetto al sierotipo O83:H1. A suffragio di tale ipotesi si aggiungono i dati ottenuti dalla qPCR che evidenziano un aumento, statisticamente significativo, dei trascritti di tre delle principali citochine pro-infiammatorie coinvolte nella malattia di Crohn, TNF-alfa, IFN-gamma e IL-8, indotte in presenza dei due ceppi patogeni, LF82 e O83:H1, rispetto al controllo non patogeno. In particolare, confrontando i livelli di trascritti nei tessuti coltivati in presenza di LF82 con quelli dei tessuti coltivati in presenza del sierotipo O83:H1, si evince che quest' ultimo determina un

aumento nettamente superiore dei livelli di espressione di tutte e tre le citochine in esame, rispetto al ceppo LF82, confermando l'ipotesi di una maggiore patogenicità di O83:H1.

Questi dati chiariscono per la prima volta un ruolo diverso dei due ceppi AIEC nell'eziopatogenesi del morbo di Crohn.

Mediante il modello in vitro della coltura cellulare, abbiamo, inoltre, valutato gli effetti sul ciclo cellulare che si hanno in seguito all'infezione con i ceppi AIEC. Dall'analisi dei dati è emerso che in presenza dei ceppi AIEC, aumenta la percentuale di cellule Caco2 bloccate in fase S. La fase S corrisponde al momento in cui il DNA si replica, ed un blocco in questa fase risulta essere, in molti casi, fatale. Questi risultati fanno supporre la presenza di danni al DNA indotti dall'infezione con i ceppi patogeni. Questa ipotesi è stata confermata mediante colorazione DAPI eseguita sulle cellule. Le cellule infettate con i sierotipi patogeni mostrano ammassi sui nuclei, chiari segni di danni al DNA, e confrontando i due sierotipi, il fenomeno sembra essere più evidente in presenza del sierotipo O83:H1 rispetto al ceppo LF82. Per ulteriore conferma di danni a carico del DNA, utilizzando la Real-Time PCR, abbiamo valutato i livelli di espressione di geni coinvolti nella riparazione del danno al DNA (MGMT) e di geni coinvolti nella metilazione del DNA (DNMT1) sia nelle cellule coltivate con i due ceppi AIEC, che in quelle coltivate con il ceppo non patogeno. Dall'analisi dei dati è emerso che l'espressione del gene MGMT, si abbassa, in modo statisticamente significativo, nelle cellule trattate con i due ceppi patogeni rispetto a quelle trattate col ceppo non patogeno. In particolare, il ceppo O83: H1 determinava un decremento maggiore del gene MGMT rispetto al ceppo LF82. Al contrario, i livelli di espressione del gene DNMT1 aumentano nelle cellule infettate con gli AIEC rispetto a quelle infettate con il ceppo non

patogeno, ed il ceppo O83:H1 induceva un livello di espressione maggiore rispetto al ceppo LF82. Questi risultati suggeriscono che l'infezione con i ceppi AIEC, induce un aumento dei livelli di metilazione del DNA (silenziamiento genico) ed un blocco nei sistemi di riparazione del DNA. Entrambi questi fenomeni portano alla morte cellulare per apoptosi.

5. CONCLUSIONI

In conclusione, i nostri dati suggeriscono che i ceppi AIEC, LF82 e O83:H1, sono in grado di aumentare nei pazienti con CD, l'espressione di CEACAM6 sulla superficie epiteliale e quella di LAMP1, HLA-DR ed ICAM1 nella lamina propria. L'aumentata espressione di tali marcatori, favorisce la sopravvivenza e la colonizzazione dei due ceppi a livello della mucosa intestinali, attivando un'attivazione immunologica ed una forte risposta infiammatoria, come dimostrato dai dati ottenuti riguardo all'induzione delle citochine pro-infiammatorie, IFN- γ , TNF- α e IL-8. Inoltre entrambi i ceppi influenzano la distribuzione del ciclo cellulare in vitro e l'espressione dei livelli trascrizionali dei geni MGMT e DNMT1, inducendo danni al DNA ed apoptosi delle cellule. Considerando l'insieme dei nostri dati possiamo affermare che entrambi i ceppi presi in esame, O83:H1 ed LF82, si candidano ad essere possibili agenti eziologici della malattia di Crohn.

6. PROSPETTIVE FUTURE

In virtù dei risultati ottenuti, possiamo ipotizzare che i ceppi O83:H1 ed LF82 giochino un ruolo fondamentale nell' eziopatogenesi della CD e si candidano ad essere il possibile agente eziologico della malattia. Pertanto gli aims futuri di questo progetto prevedranno la sperimentazione di nuove possibili strategie terapeutiche, mirate ad impedire a tali ceppi la colonizzazione della mucosa intestinale ed a bloccare quindi il processo infiammatorio.

Nella prima parte si procederà a testare l'effetto di una triplice miscela di antibiotici (ciprofloxacina + tetraciclina + trimetoprim) selezionati per la loro capacità di uccidere il 99% degli AIEC, intra ed extracellulari, in vitro (Campbell et al., 2008). In questa fase verranno effettuati prima dei test di sensibilità in vitro con l'utilizzo delle cellule Caco2 e poi si passerà all'allestimento delle colture d'organo.

Anche in questa fase i markers che verranno analizzati saranno: CEACAM 6 e LAMP 1 (mediante IF), HLA-DR e ICAM 1 (mediante IHC) e TNF-alfa, IL-8 e IFN-gamma (mediante qPCR); in più verrà valutato lo stress ossidativo (valutando i livelli di ROS) e la presenza degli AIEC all'interno dei lisosomi delle cellule, in presenza o assenza del trattamento antibiotico.

In contemporanea si andrà a testare l'effetto di alcuni ceppi probiotici selezionati, sulla capacità degli AIEC di aderire ed invadere la mucosa.

Chiaramente se la sperimentazione andrà a buon fine, sia per quanto concerne la parte riguardante la miscela antibiotica sia per la parte riguardante i probiotici, si potrebbe pensare ad eventuali trials in vivo.

7. BIBLIOGRAFIA PARTE II

1. Gasche C, Sholmerich J (2000) A simple classification of Crohn's disease: report of the working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis* 6(1):8-15.
2. Baumgart DC, Sandborn WJ, *Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies.*, in *The Lancet*, vol. 369, n° 9573, 12 maggio 2007, pp. 1641-57, DOI:10.1016/S0140-6736(07)60751-X, PMID 17499606.
3. Fiocchi C Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998; 115: 182-205.
4. Strober W, Fuss I J *Ann Rev Immun* 2002; 20: 495-549.
5. Loftus EV, Silverstein MD, Sandborn WJ, et al. Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota, 1940-1993: incidence, prevalence and survival. *Gastroenterology* 1998; 114 (6): 1161-1168
6. Hayward PA, Satsangi J, Jewell DP Inflammatory bowel disease and the X chromosome. *QJM* 1996; 89: 713-8
7. Knudtzon J, Svane S Turner's syndrome associated with chronic inflammatory bowel disease. A case report and review of the literature. *Acta Med Scand* 1988; 223: 375-8
8. Kohler JA, Grant DB Crohn's disease in Turner's syndrome. *Br Med J* 1981; 282: 950
9. Arulanantham K, Kramer MS, Grybosky JD The association of inflammatory bowel disease and X chromosomal abnormality. *Pediatrics* 1980; 66: 63-7
10. Weinrieb IJ, Fineman RM, Spiro HM Turner syndrome and inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 1976; 294: 1221-2
11. Mahadeo R, Markowitz J, Fisher S, Daum F Hermansky-Pudlak syndrome with granulomatous colitis in children. *J Pediatr* 1991; 118: 904-6
12. Sherman A, Genuth L, Hazzi CG, Balthazar EJ, Schinella RA Perirectal abscess in the Hermansky-Pudlak syndrome. *Am J Gastroenterol* 1989; 84: 552-6
13. Schinella RA, Greco MA, Cobert BL, Denmark LW, Cox RP Hermansky-Pudlak syndrome with granulomatous colitis. *Ann Intern Med* 1980; 92: 20-3
14. Sandberg-Gertzen H, Eid R, Jarnerot G Hermansky-Pudlak syndrome with colitis and pulmonary fibrosis. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34: 1055-6
15. Melis D, Parenti G, Della Casa R, Cucchiara S, Andria G Crohn's-like ileocolitis in patients affected by glycogen storage disease Ib: two years' follow-up of patients with a wide spectrum of gastrointestinal signs. *Acta Paediatr* 2003;92: 1415-21
16. Couper R, Kapelushnik J, Griffiths AM Neutrophil dysfunction in glycogen storage disease Ib: association with Crohn's disease-like colitis. *Gastroenterology* 1991; 100 (2): 549-54
17. Wendel U, Bremer HJ, Willberg B Inflammatory bowel disease in glycogen storage disease type Ib. *J Pediatr* 1987; 110: 166
18. Roe TF, Thomas DW, Gilsanz V, Isaacs H Jr, Atkinson JB Inflammatory bowel disease in glycogen storage disease type Ib. *J Pediatr* 1986; 109: 55-9
19. Freeman HJ Hereditary angioneurotic edema and familial Crohn's disease. *Can J Gastroenterol* 2000; 14:337-9
20. Farkas H, Gyeney L, Nemesanszky E, Kaldi G, Kukan F, Masszi I, Soos J, Bely M, Farkas E, Fust G, Varga L Coincidence of hereditary angioedema (HAE) with Crohn's disease. *Immunol Invest* 1999; 28: 43-53
21. Golden W, Orchard T, Wordsworth P Enteropathic arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 2003; 29: 513-30
22. De Keyser F, Elewaut D, De Vos M, De Vlam K, Cuvelier C, Mielants H, Veys EM Bowel inflammation and the spondyloarthropathies. *Rheum Dis Clin North Am* 1998; 24: 785-81377

23. Orchard T, Jewell DP Review article: pathophysiology of the intestinal mucosa in inflammatory bowel disease and arthritis: similarities and dissimilarities in clinical findings *Aliment Pharmacol Ther* 1997; 11 Suppl 3:10-5; 15-6
24. Bjorkengren AG, Resnick D, Sartoris DJ Enteropathic arthropathies. *Radiol Clin North Am* 1987; 25: 189-98
25. Finch W Arthritis and the gut. *Postgrad Med* 1989; 86: 229-30
26. Gladman D Gastrointestinal-related arthritis and psoriatic arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 1991; 3: 575-80
27. Gravallesse EM, Kantrowitz FG Arthritic manifestations of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 1988; 83: 703-9
28. Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH Incidence and prevalence of Crohn's disease in the County of Copenhagen, 1962-87: a sixfold increase in incidence. *Scand J Gastroenterol* 1992; 27 (7): 609-614.
29. Trallori G, Palli D, Saieva C A population-based study of inflammatory bowel disease in Florence over 15 years (1978-92). *Scand J Gastroenterol* 1996; 31 (9): 892-899.
30. Fonager K, Sorensen HT, Olsen J Change in incidence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Denmark. A study based on the National Registry of Patients, 1981-1992 *Int J Epidemiol* 1997; 26: 1003-1008.
31. Bjornsson S, Johannsson JH, Oddsson E Inflammatory bowel disease in Iceland, 1980-89. A retrospective nationwide epidemiologic study. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33 (1): 71-77.
32. Carter MJ, Lobo AJ, Travis SP (2004) British Society of Gastroenterology for management of inflammatory bowel disease in adult. *Gut* 53 (Suppl 5): 1-16.
33. Brocklehurst JC (1985) Colonic disease in the elderly. *Clin Gastroenterol* 14(4):725-747.
34. Farmer RG, Michener WM (1980) Studies of family history among patients with inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol* 9:271.277.
35. Yang h, McElree C (1993) Familial empirical risks for inflammatory bowel disease: difference between Jews and non-Jews. *Gut* 34:517-524.
36. Tysk C, Linderg E (1988) Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins: a study of heritability and influence of smoking. *Gut* 29:990-996.
37. Mekhjian HS, Switz DM, Melnyk CS, Rankin GB, Brooks RK Clinical features and natural history of Crohn's disease. *Gastroenterology* 1979; 77:898-90679
38. Braat H, Peppelenbosch MP, Hommes DW, *Immunology of Crohn's disease*, in *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1072, agosto 2006, pp. 135-54, DOI:10.1196/annals.1326.039, PMID 17057196.
39. Henckaerts L, Figueroa C, Vermeire S, Sans M, *The role of genetics in inflammatory bowel disease*, in *Curr Drug Targets*, vol. 9, n° 5, maggio 2008, pp. 361-8, DOI:10.2174/138945008784221161, PMID 18473763.
40. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, *et al.*, *A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease*, in *Nature*, vol. 411, n° 6837, 2001, pp. 603-6, DOI:10.1038/35079114, PMID 11385577.
41. Farmer RG, Hawk WA, Turnbull RB Jr. Clinical patterns in Crohn's disease: a statistical study of 615 cases. *Gastroenterology* 1975; 68: 627-35
42. Myren J, Bouchier I, Watkinson G, Softley A, Clamp SE, DeDombal FT The OMGE multinational inflammatory bowel disease survey 1976-1982. A further report on 2657 cases. *Scand J Gastroenterol* 1984; 19: 1-27
43. Both H, Torpedersen K, Kreiner S, Hendriksen C, Binder V Clinical appearance at diagnosis of ulcerative colitis and Crohn's disease in a regional patient group. *Scand J Gastroenterol* 1983; 18: 987-991
44. Best WR, Bectel JM, Singleton JW, Kern F Jr. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 1976; 70: 439-444

45. Best WR, Beckett JM, Singleton JW Rederived values of the eight coefficients of the Crohn's Disease Activity Index (CDAI). *Gastroenterology* 1979; 77: 843-846
46. Harvey RF, Bradshaw JM A simple index of Crohn's disease activity. *Lancet* 1980; 1: 514
47. Best William R. Predicting the Crohn's Disease Activity Index From The Harvey Bradshaw Index. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 4:12
48. Orchard TR, Wordsworth BP, Jewell DP Peripheral arthropathies in inflammatory bowel disease: their articular distribution and natural history. *Gut* 1998; 42: 387-91
49. Fedorak RN (2004) Is it time to re-classify Crohn's Disease? *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 18 (Suppl):99-106.
50. MacDonald TT, Pender SLF Lamina propria T cells. *Chem Immunol* 1998; 71: 324-330
51. Boirivant M, Pica R, DeMaria R, et al. Stimulated human lamina propria T cells manifest enhanced FAS-mediated apoptosis. *J Clin Invest* 1996; 98: 2616-2622
52. R Shoda, K Matsueda, S Yamato and N Umeda, 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, in *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 64, n° 5, The American Society for Clinical Nutrition, 1996, pp. 741-745, PMID 8615358.
53. Silvio Danese, Stefano Semeraro, Alfredo Papa, Italia Roberto, Franco Scaldaferrì, Giuseppe Fedeli, Giovanni Gasbarrini, Antonio Gasbarrini, *Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease*, in *World Journal of Gastroenterology*, vol. 11, n° 46, 2005, pp. 7227-36, PMID 16437620. URL consultato il 7 novembre 2009.
54. Michael Bernstein, Sue Irwin and Gordon R. Greenberg, *Maintenance infliximab treatment is associated with improved bone mineral density in Crohn's disease*, in *The American Journal of Gastroenterology*, vol. 100, n° 9, 2005, pp. 2031-5., DOI:10.1111/j.1572-0241.2005.50219.x, PMID 16128948.
55. Zadik Y, Drucker S, Pallmon S, *Migratory stomatitis (ectopic geographic tongue) on the floor of the mouth*, in *J Am Acad Dermatol*, vol. 65, n° 2, agosto 2011, pp. 459-60, PMID 21763590.
56. Zissin R¹, Hertz M, Paran H, Bernheim J, Shapiro-Feinberg M, Gayer G. Small bowel obstruction secondary to Crohn disease: CT findings. *Abdom Imaging*. 2004 May-Jun;29(3):320-5.
57. Singh B, McC Mortensen N J, Jewell D P, George B. Perianal Crohn's disease. *Br J Surg*. 2004;91:801-814.
58. Basturk T, Ozagari A, Ozturk T, Kusaslan R, Unsal A. J Ren Care. Crohn's disease and secondary amyloidosis: early complication? A case report and review of the literature. 2009 Sep;35(3):147-50. doi: 10.1111/j.1755-6686.2009.00106.x.
59. Gasché C, Reinisch W, Lochs H, Parsaei B, Bakos S, Wyatt J, Fueger GF, Gangl A Anemia in Crohn's disease. Importance of inadequate erythropoietin production and iron deficiency. *Dig Dis Sci*. 1994 Sep;39(9):1930-4.
60. Hudson M, Flett G, Sinclair T S. *et al* Fertility and pregnancy in inflammatory bowel disease. *Int J Gynaecol Obstet* 1997;58:229-237.237
61. Mayberry J F, Weterman I T. European survey of fertility and pregnancy in women with Crohn's disease: a case control study by European collaborative group. *Gut* 1986;27:821-825.825
62. Burnell D, Mayberry J, Calcraft B J. *et al* Male fertility in Crohn's disease. *Postgrad Med J* 1986;62:269-272.272
63. Narendranathan M, Sandler R S, Suchindran C M. *et al* Male infertility in inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol* 1989;14:403-406.406

64. ^ Ekbom A, Helmick C, Zack M, Adami H, *Increased risk of large-bowel cancer in Crohn's disease with colonic involvement*, in *Lancet*, vol. 336, n° 8711, 1990, pp. 357–9, DOI:10.1016/0140-6736(90)91889-I, PMID 1975343.
65. ^ Collins P, Mpofo C, Watson A, Rhodes J, *Strategies for detecting colon cancer and/or dysplasia in patients with inflammatory bowel disease*, in Alastair J Watson (a cura di), *Cochrane Database Syst Rev*, n° 2, 2006, pp. CD000279, DOI:10.1002/14651858.CD000279.pub3, PMID 16625534.
66. Maykel J A, Hagerman G, Mellgren A F, et al. Crohn's colitis: the incidence of dysplasia and adenocarcinoma in surgical patients. *Dis Colon Rectum*. 2006;49(7):950–957.
67. Wilkins T, Jarvis K, Patel J. Diagnosis and management of Crohn's disease. *Am Fam Physician*. 2011 Dec 15;84(12):1365-75.
68. L J WALKER, M C ALDHOUS, H E DRUMMOND, B R K SMITH, E R NIMMO, I D R ARNOTT, and J SATSANGI Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies (ASCA) in Crohn's disease are associated with disease severity but not NOD2/CARD15 mutations *Clin Exp Immunol*. 2004 Mar; 135(3): 490–496. doi: 10.1111/j.1365-2249.2003.02392.x PMID: PMC1808965
69. Lecis P, Germanà B, Papa N, Bertiato G, Doglioni C, Galliani E, Biedo FC. p-ANCA and ASCA antibodies in the differential diagnosis between ulcerative rectocolitis and Crohn's disease. *Recenti Prog Med*. 2002 May;93(5):308-13.
70. Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *Lancet*. 2012 Nov 3;380(9853):1590-605. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60026-9. Epub 2012 Aug 20.
71. P.M. Dixon, M.E. Roulston and D.J. Nolan, *The small bowel enema: a ten year review*, in *Clinical Radiology*, vol. 47, n° 1, 1993, pp. 46–8, DOI:10.1016/S0009-9260(05)81213-9, PMID 8428417.
72. Stuart L. Triester, Jonathan A. Leighton, Grigoris I. Leontiadis, Suryakanth R. Gurudu, David E. Fleischer, Amy K. Hara, Russell I. Heigh, Arthur D. Shiff, and Virender K. Sharma, *A meta-analysis of the yield of capsule endoscopy compared to other diagnostic modalities in patients with non-stricturing small bowel Crohn's disease*, in *The American Journal of Gastroenterology*, vol. 101, n° 5, 2006, pp. 954–64, DOI:10.1111/j.1572-0241.2006.00506.x, PMID 16696781.
73. Amy K. Hara, Jonathan A. Leighton, Russell I. Heigh, Virender K. Sharma, Alvin C. Silva, Giovanni De Petris, Joseph G. Hentz and David E. Fleischer, *Crohn disease of the small bowel: preliminary comparison among CT enterography, capsule endoscopy, small-bowel follow-through, and ileoscopy*, in *Radiology*, vol. 238, n° 1, gennaio 2006, pp. 128–34, DOI:10.1148/radiol.2381050296, PMID 16373764
74. Srinivasan R, Lichtenstein GR. Recent developments in the pharmacological treatment of Crohn's disease. *Expert Opin Investig Drugs*. 2004 Apr;13(4):373-91.
75. Krupoves A, Mack DR, Seidman EG, Deslandres C, Bucionis V, Amre DK Immediate and long-term outcomes of corticosteroid therapy in pediatric Crohn's disease patients. *Inflamm Bowel Dis*. 2011 Apr;17(4):954-62. doi: 10.1002/ibd.21415.
76. Rutgeerts PJ et al Conventional treatment of Crohn's disease: objectives and outcomes. *Inflamm Bowel Dis*. 2001 May;7 Suppl 1:S2-8.
77. P L Travis, E F Stange, M Le'mann, T O`resland, Y Chowers, A Forbes, G D'Haens, G Kitis, A Cortot, C Prantera, P Marteau, J-F Colombel, P Gionchetti, Y Bouhnik, E Tiret, J Kroesen, M Starlinger, N J Mortensen, for the European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO) *European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management*. *Gut* 2006 55: i16-i35
78. B Hanauer, Brian G Feagan, Gary R Lichtenstein, Lloyd F Mayer, S Schreiber, Jean Frederic Colombel, Daniel Rachmilewitz, Douglas C Wolf, Allan Olson, Weihang Bao, Paul

Rutgeerts, and the ACCENT I Study Group *Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. The Lancet* Vol 359 • May 4, 2002

79. Ibáñez-Samaniego L, Díaz-Fontenla F, Miranda-Bautista José, Acosta C, Barceló I, Flores V, Echenagusía M, Camúñez F, Díaz-Redondo A, Marín-Jiménez I, Menchén L. Safety and Efficacy of Anti-TNF α Treatment in Crohn's Disease Patients with Abdominal Abscesses. *Hepatogastroenterology*. 2015 May;62(139):647-52.
80. Ginard D, Khorrami S, Pérez-Carazo L, Tavío-Hernández E, López-Sanromán A, García-Alvarado M, Muñoz F, Ibáñez-Samaniego L, Marín-Jiménez I, Guevara J, Casellas F. Efficacy and effectiveness of biologic therapy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol*. 2016 Mar 18. pii: S0210-5705(16)00090-X. doi: 10.1016/j.gastrohep.2016.02.000
81. Sandborn WJ, Faubion WA Biologics in inflammatory bowel disease: how much progress have we made? *Gut* 2004; 53: 1366-1373
82. Lim WC, Hanauer SB Emerging biologic therapies in inflammatory bowel disease. *Reviews in gastroenterological disorders* 2004; 4 (2): 66-85
83. Sands Bruce E. Inflammatory bowel disease: past, present and future. *J of Gastroenterology* 2007; 42: 16-25
84. Sandborn WJ, Hanauer SB Antitumor necrosis factor therapy for inflammatory bowel disease: a review of agents, pharmacology, clinical results and safety. *Inflam Bowel Dis* 1999; 5: 119-33
85. Scallon BJ, Moore MA, Trinh H, Knight DM, Ghayeb J Chimeric anti TNF α and immune effector functions. *Cytokine* 1995; 7: 251-59.
86. Sandborn William J., Faegan B.G., Stoinov S., Pieter J., Honiball, Rutgeerts P., Mason D., Bloomfield R., Schreiber S. Certolizumab Pegol for the Treatment of Crohn's Disease. *N Engl J Med* 2007; 357: 228-38.
87. Hanauer S.B., Sandborn W.J., Rutgeerts P., Fedorak R.N., Lukas M., Macintosh D., Panaccione R., Wolf D., Pollack P. Human Anti-Tumor Necrosis Factor Monoclonal Antibody (Adalimumab) in Crohn's Disease: the CLASSIC-I Trial. *Gastroenterology* 2006; 130: 323-333.
88. Tichansky D, Cagir B, Yoo E, Marcus SM, Fry RD. Strictureplasty for Crohn's disease: meta-analysis. *Dis Colon Rectum*. 2000 Jul;43(7):911-9
89. Ozuner G, Fazio VW, Lavery IC, Milsom JW, Strong SA, *Reoperative rates for Crohn's disease following strictureplasty. Long-term analysis*, in *Dis. Colon Rectum*, vol. 39, n° 11, 1996, pp. 1199–203, DOI:10.1007/BF02055108, PMID 8918424.
90. Prakash K, Varma D, Mahadevan P, Narayanan RG, Philip M. Surgical treatment for small bowel Crohn's disease: an experience of 28 cases. *Indian J Gastroenterol*. 2008 Jan-Feb;27(1):12-5.
91. Onali S, Calabrese E, Petruzzello C, Lolli E, Ascolani M, Ruffa A, Sica G, Rossi A, Chiamonte C, Pallone F, Biancone L Post-operative recurrence of Crohn's disease: A prospective study at 5 years. *Dig Liver Dis*. 2016 Jan 29. pii: S1590-8658(16)00004-9. doi: 10.1016/j.dld.2016.01.009.
92. Funayama Y, Suzuki H, Takahashi K, Haneda S, Watanabe K, Ikezawa F, Unno M. Surgical management of intestinal Crohn's disease *Nihon Geka Gakkai Zasshi*. 2015 Mar;116(2):94-8
93. Thompson JS¹, Iyer KR, DiBaise JK, Young RL, Brown CR, Langnas A Short bowel syndrome and Crohn's disease. *NJ Gastrointest Surg*. 2003 Dec;7(8):1069-72.
94. R. Rahimi, S. Nikfar, F. Rahimi, B. Elahi, S. Derakhshani, M. Vafaie, M. Abdollahi, *A meta-analysis on the efficacy of probiotics for maintenance of remission and prevention of clinical and endoscopic relapse in Crohn's disease.*, in *Dig Dis Sci*, vol. 53, n° 9, settembre 2008, pp. 2524-31, DOI:10.1007/s10620-007-0171-0, PMID 18270836.

95. S. Joos, *Review on efficacy and health services research studies of complementary and alternative medicine in inflammatory bowel disease.*, in *Chin J Integr Med*, vol. 17, n° 6, giugno 2011, pp. 403-9, DOI:10.1007/s11655-011-0758-3, PMID 21660673.
96. D. Turner, PS. Shah; AH. Steinhart; S. Zlotkin; AM. Griffiths, *Maintenance of remission in inflammatory bowel disease using omega-3 fatty acids (fish oil): a systematic review and meta-analyses.*, in *Inflamm Bowel Dis*, vol. 17, n° 1, gennaio 2011, pp. 336-45, DOI:10.1002/ibd.21374, PMID 20564531.
97. D. Turner, SH. Zlotkin; PS. Shah; AM. Griffiths, *Omega 3 fatty acids (fish oil) for maintenance of remission in Crohn's disease.*, in *Cochrane Database Syst Rev*, n° 1, 2009, pp. CD006320, DOI:10.1002/14651858.CD006320.pub3, PMID 19160277.
98. D. Turner, SH. Zlotkin; PS. Shah; AM. Griffiths, *Omega 3 fatty acids (fish oil) for maintenance of remission in Crohn's disease.*, in *Cochrane Database Syst Rev*, n° 2, 2007, pp. CD006320, DOI:10.1002/14651858.CD006320.pub2, PMID 17443620.
99. CH. MacLean, WA. Mojica; SJ. Newberry; J. Pencharz; RH. Garland; W. Tu; LG. Hilton; IM. Gralnek; S. Rhodes; P. Khanna; SC. Morton, *Systematic review of the effects of n-3 fatty acids in inflammatory bowel disease.*, in *Am J Clin Nutr*, vol. 82, n° 3, settembre 2005, pp. 611-9, PMID 16155275.
100. H. Matthes, *[Complementary therapies]*., in *Z Gastroenterol*, vol. 41, n° 1, gennaio 2003, pp. 52-3, DOI:10.1055/s-2003-36669, PMID 12541175.
101. Øyri SF, Müzes G, Sipos F. Dysbiotic gut microbiome: A key element of Crohn's disease. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2015 Dec;43:36-49. doi: 10.1016/j.cimid.2015.10.005. Epub 2015 Oct 25. Review.
102. Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2008;134:577–594.
103. Negroni A¹, Costanzo M, Vitali R, Superti F, Bertuccini L, Tinari A, Minelli F, Di Nardo G, Nuti F, Pierdomenico M, Cucchiara S, Stronati L. Characterization of adherent-invasive Escherichia coli isolated from pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2012 May;18(5):913-24. doi: 10.1002/ibd.21899. Epub 2011 Oct 12
104. Willing B, Halfvarson J, Dicksved J, Rosenquist M, Järnerot G, Engstrand L, Tysk C, Jansson JK. Twin studies reveal specific imbalances in the mucosa-associated microbiota of patients with ileal Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15:653–660.
105. Martinez-Medina M, Aldeguer X, Lopez-Siles M, González-Huix F, López-Oliu C, Dahbi G, Blanco JE, Blanco J, Garcia-Gil LJ, Darfeuille-Michaud A. Molecular diversity of Escherichia coli in the human gut: new ecological evidence supporting the role of adherent-invasive E. coli (AIEC) in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15:872–882.
106. Sasaki M, Sitaraman SV, Babbitt BA, Gerner-Smidt P, Ribot EM, Garrett N, Alpern JA, Akyildiz A, Theiss AL, Nusrat A, et al. Invasive Escherichia coli are a feature of Crohn's disease. *Lab Invest*. 2007;87:1042–1054.
107. Kuper H, Adami HO, Trichopoulos D. Infections as a major preventable cause of human cancer. *J Intern Med*. 2000; 248(3): 171–183.
108. De Luca A, Baldi A, Russo P et al. Co-expression of Helicobacter pylori's proteins CagA and HspB induces cell proliferation in AGS gastric epithelial cells, independently from the bacterial infection. *Cancer Res*. 2003; 63(19): 6350–6356.
109. Manente L, Perna A, Buommino E et al. The Helicobacter pylori's protein Vac A has direct effects on the regulation of cell cycle and apoptosis in gastric epithelial cells. *J Cell Physiol*. 2008; 214(3): 582-587.
110. De Luca A, De Falco M, Manente L et al. Helicobacter pylori heat shock protein B (HspB) localizes in vivo in the gastric mucosa and malt lymphoma. *J Cell Physiol*. 2008; 216(1): 78-82.
111. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nat*. 2002; 420(6917): 860–867.

112. Tabaqchali S, O'Donoghue DP, Bettelheim KA. Escherichia coli antibodies in patients with inflammatory bowel disease. *Gut*. 1978; 19(2): 108-113.
113. Boudeau J, Glasser AL, Masseret E et al. Invasive ability of an Escherichia coli strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect Immun*. 1999; 67(9): 4499-4509.
114. Darfeuille-Michaud A. Adherent-invasive Escherichia coli: a putative new E. coli pathotype associated with Crohn's disease. *Int J Med Microbiol*. 2002 Sep; 292(3-4):185-93.
115. Martinez-Medina M, Aldeguer X, Lopez-Siles M et al. Molecular diversity of Escherichia coli in the human gut: new ecological evidence supporting the role of adherent-invasive E. coli (AIEC) in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2009 Jun; 15(6):872-82.
116. Barnich N, Derfeuille-Michaud A. World J. Role of bacteria in the etiopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol*. 2007; 13 (42): 5571-5576.
117. Carvalho FA, Barnich N, Sivignon A et al. Crohn's disease adherent-invasive Escherichia coli colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. *J Exp Med*. 2009 Sep 28; 206(10):2179-89.
118. Schroeder-Braunstein J, Gras J, Brors B et al. Initiation of an Inflammatory Response in Resident Intestinal Lamina Propria Cells -Use of a Human Organ Culture Model. *PLoS ONE* 2014; 9(5).
119. Edwards LA, Lucas M, Edwards EA et al. Aberrant response to commensal Bacteroides thetaiotaomicron in Crohn's disease: an ex vivo human organ culture study. *Inflamm Bowel Dis*. 2011 May; 17(5):1201-8.
120. Tsilingiri K, Barbosa T, Penna G et al. Probiotic and postbiotic activity in health and disease: comparison on a novel polarised ex-vivo organ culture model. *Gut*. 2012; 61(7):1007-15.
121. Mazzarella G, Paparo F, Maglio M et al. Organ culture of rectal mucosa: in vitro challenge with gluten in coeliac disease. Marsh MN ed. *Methods in Molecular Medicine: Coeliac Disease*. Totowa (NJ). *Humana Press Inc*. 2000; 41:163-173.
122. Giaffer MH, Holdsworth CD, Duerden BI. Virulence properties of Escherichia coli strains isolated from patients with inflammatory bowel disease. *Gut*. 1992;33:646-650.
123. Kleessen B, Kroesen AJ, Buhr HJ, Blaut M. Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls. *Scand J Gastroenterol*. 2002;37:1034-1041.
124. Sepehri S, Khafipour E, Bernstein CN, Coombes BK, Pilar AV, Karmali M, Ziebell K, Krause DO. Characterization of Escherichia coli isolated from gut biopsies of newly diagnosed patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17:1451-1463
125. Elliott TR, Hudspith BN, Wu G, Cooley M, Parkes G, Quiñones B, Randall L, Mandrell RE, Fagerquist CK, Brostoff J, et al. Quantification and characterization of mucosa-associated and intracellular Escherichia coli in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19:2326-2338.
126. Elliott TR, Hudspith BN, Wu G, Cooley M, Parkes G, Quiñones B, Randall L, Mandrell RE, Fagerquist CK, Brostoff J, et al. Quantification and characterization of mucosa-associated and intracellular Escherichia coli in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19:2326-2338.
127. Barnich N, Carvalho FA, Glasser AL, Darcha C, Jantschkeff P, Allez M, Peeters H, Bommelaer G, Desreumaux P, Colombel JF, et al. CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive E. coli, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J Clin Invest*. 2007;117:1566-1574.
128. Miquel S, Claret L, Bonnet R, Dorboz I, Barnich N, Darfeuille-Michaud A. Role of decreased levels of Fis histone-like protein in Crohn's disease-associated adherent invasive

- Escherichia coli LF82 bacteria interacting with intestinal epithelial cells. *J Bacteriol.* 2010;192:1832–1843.
129. Bringer MA, Barnich N, Glasser AL, Bardot O, Darfeuille-Michaud A. HtrA stress protein is involved in intramacrophagic replication of adherent and invasive Escherichia coli strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. *Infect Immun.* 2005;73:712–721.
 130. Carvalho FA, Barnich N, Sauvanet P, Darcha C, Gelot A, Darfeuille-Michaud A. Crohn's disease-associated Escherichia coli LF82 aggravates colitis in injured mouse colon via signaling by flagellin. *Inflamm Bowel Dis.* 2008;14:1051–1060.
 131. Bringer MA, Billard E, Glasser AL, Colombel JF, Darfeuille-Michaud A. Replication of Crohn's disease-associated AIEC within macrophages is dependent on TNF- α secretion. *Lab Invest.* 2012 Mar;92(3):411-9. doi: 10.1038/labinvest.2011.156. Epub 2011 Oct 31.
 132. Bringer MA¹, Glasser AL, Tung CH, Méresse S, Darfeuille-Michaud A. The Crohn's disease-associated adherent-invasive Escherichia coli strain LF82 replicates in mature phagolysosomes within J774 macrophages. *Cell Microbiol.* 2006 Mar;8(3):471-84.
 133. Eytan Wine, Juan C Ossa, Scott D Gray-Owen and Philip M Sherman Email author Adherent-invasive *Escherichia coli*, strain LF82 disrupts apical junctional complexes in polarized epithelia *BMC Microbiology* 2009,9:180 DOI: 10.1186/1471-2180-9-180
 134. Troncone R, Mazzarella G, Leone N et al. "Gliadin Activates Mucosal Cell-Mediated Immunity In *In Vitro* Cultured Rectal Mucosa from Coeliac Patients and a Subset of Their Siblings". *Gut.* 1998; 43: 484-489.
 135. Gianfrani C, Maglio M, Rotondi Aufiero V et al. Immunogenicity of Monococcum wheat in Celiac Patients. *Am J Clin Nutr.* 2012 Dec; 96(6):1339-45.
 136. Negroni A, Costanzo M, Vitali R et al. Characterization of adherent-invasive Escherichia coli isolated from pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2012 May;18(5):913-24.
 137. Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, et al. Presence of adherent Escherichia coli strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterol.* 1998; 115(6):1405-13.
 138. Edwards LA, Lucas M, Edwards EA et al. Aberrant response to commensal Bacteroides thetaiotaomicron in Crohn's disease: an ex vivo human organ culture study. *Inflamm Bowel Dis.* 2011 May; 17(5):1201-8.
 139. Tsilingiri K, Barbosa T, Penna G et al. Probiotic and postbiotic activity in health and disease: comparison on a novel polarised ex-vivo organ culture model. *Gut.* 2012; 61(7):1007-15.
 140. Day DW, Mandal BK, and Morson BC. The rectal biopsy appearances in Salmonella colitis. *Histopathol.* 1978; 2(2): 117-131.
 141. Takeuchi A, Formal SB, and Sprinz H. Experimental acute colitis in the rhesus monkey following peroral infection with Shigella flexneri. *Am J Pathol.* 1968; 52(3):503-529.
 142. Kaiserlian D, Rigal D, Abello J et al. Expression, function and regulation of the intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on human intestinal epithelial cell lines. *Eur J Immunol.* 1991; 21: 2415-2421.
 143. Kvale D, and Brandtzæg P. Constitutive and cytokine induced expression of HLA molecules, secretory component, and intercellular adhesion molecule-1 is modulated by butyrate in the colonic epithelial cell line HT-29. *Gut.* 1995; 36: 737-742.
 144. Becker T, Volchuk A and Rothman JE. Differential use of endoplasmic reticulum membranes for phagocytosis in J774 macrophages. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2005; 102: 4022- 4026.
 145. Bringer MA, Glasser AL, Tung CH et al. The Crohn's disease-associated adherent-invasive Escherichia coli strain LF82 replicates in mature phagolysosomes within J774 macrophages. *Cell Microbiol.* 2006 Tues; 8 (3): 471-84

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio la mia adorata famiglia e mio marito Michele per avermi sempre supportato e sopportato, senza di loro non ce l' avrei fatta.

Ringrazio il dottor Mazzarella per avermi concesso la possibilità di lavorare, serenamente ed autonomamente, nel suo laboratorio.

Ringrazio i dottori e i collaboratori dell' Ospedale Moscati e della clinica Santa Rita, per il contributo tecnico datomi in questi tre anni, in particolar modo ringrazio il prof. Iaquinto per aver creduto in me e nel mio progetto.

Ringrazio, infine, la mia infaticabile e insostituibile collega ed amica Vera Rotondi Aufiero per il supporto tecnico e morale donatomi in questi anni.

GRAZIE