

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI - FEDERICO II

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA



**CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN  
TERAPIE AVANZATE MEDICO-CHIRURGICHE**

**XXIX CICLO**

(Coordinatore: Prof. Giovanni Di Minno)

**Tesi di Dottorato di Ricerca**

**Valutazione della guarigione mucosale con CLE  
in pazienti con RCU in trattamento con mesalazina  
e criteri predittivi per la riacutizzazione della malattia**

Relatore

Dottorando

Chiar.mo

Prof. Giovanni D. De Palma

Dott. Francesco Maione

## **INDEX**

<b>INTRODUZIONE</b>	<b>2</b>
<b>La Retto-colite Ulcerosa: Epidemiologia, Diagnosi, Terapia</b>	<b>2</b>
<b>La Guarigione Mucosale</b>	<b>5</b>
<b>L'endomicroscopia Laser Confocale (CLE)</b>	<b>7</b>
<b>Scopo del progetto</b>	<b>12</b>
<b>MATERIALE E METODI</b>	<b>13</b>
<b>Pazienti</b>	<b>13</b>
<b>Endoscopia</b>	<b>13</b>
<b>Esame CLE</b>	<b>14</b>
<b>Istologia</b>	<b>15</b>
<b>Analisi Statistica</b>	<b>15</b>
<b>RISULTATI</b>	<b>16</b>
<b>DISCUSSIONE</b>	<b>18</b>
<b>CONCLUSIONI</b>	<b>21</b>
<b>PROSPETTIVE FUTURE</b>	<b>22</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>24</b>
<b>LEGENDA FIGURE</b>	<b>29</b>
<b>TABELLA 1</b>	<b>30</b>

## INTRODUZIONE

La Rettocolite Ulcerosa (RCU) è una malattia infiammatoria cronica recidivante dell'intestino crasso. Sebbene l'eziopatogenesi non sia nota, si ritiene che alterazioni del Sistema immunitario, genetiche e ambientali, siano coinvolte nelle fasi della malattia. Le ipotesi principali riguardano un'origine infettiva, l'allergia a componenti della dieta, la risposta immunitaria anomala ad antigeni batterici. Nella patogenesi della malattia, sono implicati meccanismi immunologici a livello della lamina propria che coinvolgono sia la risposta umorale sia quella cellulare.

Inoltre, la maggior possibilità di sviluppare la rettocolite ulcerosa in presenza di un parente già affetto da malattia infiammatoria intestinale, indica che un substrato genetico possa giocare un ruolo importante nello sviluppo della malattia.

La rettocolite ulcerosa è caratterizzata da lesioni ulcerative che coinvolgono la componente mucosale, senza interessare gli strati profondi della parete colica.

La localizzazione interessa tipicamente il retto con estensione variabile fino al cieco e in alcuni casi all'ileo terminale. La distribuzione della malattia nei Paesi Europei ha un'incidenza di 20-24 nuovi casi/100.000 persone/anno ed una prevalenza di 500 casi/100.000 persone.

L'estensione si può modificare nel corso della malattia passando da una proctite ad una pancolite o viceversa. I fattori che ne determinano l'andamento cronico sono sconosciuti.

In circa il 30% dei casi la malattia è confinata al retto (proctite), mentre nel 40-50% dei casi le lesioni si estendono sino al sigma (proctosigmoidite). Nel 30-40% la malattia si localizza sino al colon discendente (colite sinistra) e nel restante 15-30% sino al trasverso (colite estesa) o sino al cieco (pancolite).

I sintomi tipici sono la diarrea con muco e sangue rosso vivo nelle feci. Altri possono essere: il dolore addominale, che si risolve con la defecazione, il tenesmo rettale, l'urgenza alla defecazione e l'incontinenza.

L'esordio può essere subdolo, con possibili ritardi nella diagnosi, o acuto con anche necessità di ricovero ospedaliero per la presenza di sintomi sistemici come la febbre, la tachicardia, il dimagrimento e l'anemia severa.

La RCU ha nella maggioranza dei casi un andamento cronico intermittente con fasi di riacutizzazione della malattia seguite a fasi di remissione (spontanea o indotta farmacologicamente), mentre nel 20% circa dei casi, ha un decorso di tipo cronico continuo.

La diagnosi si basa sul quadro clinico, sul quadro endoscopico e sull'esame istologico dei prelievi biotici eseguiti durante la colonscopia.

Dal punto di vista dell'attività clinica la malattia può essere distinta in quattro diverse forme: malattia in remissione e malattia in fase di attività clinica lieve, moderata e severa. Quando la malattia è in remissione vi è assenza di sintomi e gli esami ematochimici sono nella norma. La RCU si presenta in forma lieve nel 60% circa dei pazienti: il numero delle scariche diarroiche è inferiore a 4 nelle 24 ore, il sanguinamento è lieve, incostante o assente e non vi sono sintomi sistemici. La forma moderata si accompagna a 5-6 scariche diarroiche nelle 24 ore con sanguinamento costante e sintomi sistemici di accompagnamento di lieve entità. La forma severa, che insorge improvvisamente o come progressione di un quadro precedente meno acuto, è caratterizzata da più di 6 scariche al dì, sanguinamento evidente e costante, incremento degli indici di flogosi, segni e sintomi di interessamento sistemico (astenia, febbre, tachicardia).

L'aspetto endoscopico è caratteristico. I segni più precoci di RCU sono la perdita del disegno vascolare sottomucoso con edema ed iperemia della mucosa. Per determinare l'estensione della malattia è necessaria l'esecuzione di una pancolonscopia.

Nell'infiammazione di grado moderato la mucosa diviene granulata, si osserva friabilità con la comparsa di piccole emorragie puntiformi (petecchie). Infine, nella forma severa, la malattia si associa al sanguinamento ed alla presenza di ulcere.

L'esame istologico va sempre eseguito. Può esistere una discrepanza tra l'aspetto macroscopico e quello istologico. L'infiammazione è prevalentemente confinata alla mucosa: è presente un infiltrato infiammatorio di leucociti neutrofili, linfociti, plasmacellule e macrofagi che si localizzano nelle cripte, dando origine a criptite e infine ad ascessi criptici con distorsione della loro architettura; aumentando l'infiammazione le cellule epiteliali si appiattiscono e vanno incontro all'ulcerazione.

Nei pazienti con RCU possono essere presenti manifestazioni extraintestinali: artropatia periferica, eritema nodoso, episclerite, afte orali, statosi epatica, sacroileite, spondilite anchilosante, colangite sclerosante.

La complicanza più seria della rettocolite ulcerosa è il megacolon tossico, urgenza chirurgica, dovuto ad una dilatazione acuta del colon (diametro trasverso > di 6 cm e perdita delle haustrazioni all’RX addome diretto) durante un attacco severo di colite ulcerosa.

Il rischio di cancro del colon è un’altra seria complicanza della malattia; la maggior parte degli studi concorda sull’incremento del rischio dopo 10 anni di attività di RCU totale o estesa, Il rischio di cancro nei pazienti con proctite ulcerosa (localizzazione di malattia sono nel retto) non è invece aumentato.

I pazienti con colite ulcerosa estesa, che dura da più di 10 anni, dovrebbero iniziare una sorveglianza endoscopica con colonscopia standard più cromoendoscopia e campionamento biptico random di tutti i segmenti colici, con ulteriori biopsie nelle eventuali aree sospette. Se non risulta displasia la colonscopia andrebbe ripetuta ogni 1-3 anni. In caso di riscontro di displasia severa all’esame istologico, vi è indicazione all’esecuzione di colectomia profilattica.

L’ obiettivo terapeutico è quello di ridurre i sintomi e di indurre la remissione; e successivamente mantenere la remissione a lungo termine.

I farmaci che hanno dimostrato efficacia nella colite ulcerosa sono la mesalazina, il cortisone e gli immunosoppressori; i biologici come gli anti-TNF.

I farmaci che abbiamo a disposizione possono essere utilizzati da soli o in combinazione, con diverse modalità di somministrazione a seconda del grado di severità della malattia e della sua localizzazione: terapia topica nella localizzazione distale (proctite e proctosigmoidite), terapia sistemica nelle forme estese.

Il trattamento chirurgico della colite ulcerosa è limitato ai casi con complicanze, o refrattari alla terapia medica, e consiste, indipendentemente dall’estensione di malattia, in una procto-colectomia totale.

Le condizioni che spesso richiedono un intervento chirurgico in urgenza sono la rettocolite riacutizzata non sensibile a trattamento medico, la rettocolite acuta fulminante e il megacolon tossico, condizione estrema nella quale si assiste ad una importante distensione del colon che può esitare in perforazione. In assenza di

miglioramento dopo 72 ore di trattamento medico intensivo è indicato procedere ad intervento d'urgenza pena il rischio della vita del paziente; l'intervento scelto dalla maggior parte dei chirurghi è la colectomia subtotale con ileostomia temporanea. Dopo adeguato miglioramento delle condizioni generali del paziente (2-6 mesi circa) si può procedere all'intervento ricostruttivo con rimozione del retto lasciato in sede e confezionamento del serbatoio ileo anale. Il trattamento chirurgico dei pazienti con rettocolite ulcerosa è affidato a chirurghi specialisti che hanno completato un training specifico in chirurgia colo-rettale.

### **LA GUARIGIONE MUCOSALE (mucosal healing)**

Uno dei temi più discussi degli ultimi tempi nella ricerca clinica sulle IBD: la guarigione "mucosale" (o endoscopica o mucosal healing), quale punto fondamentale nella valutazione di efficacia della terapia.

L'endoscopia svolge un ruolo chiave nella valutazione dell'attività di malattia nella Colite Ulcerosa ed è essenziale nel valutare la risposta terapeutica e la sorveglianza per cancro<sup>(1)</sup>.

L'attività di malattia è una variabile per la cui definizione non esistono gold-standard. L'aspetto endoscopico della mucosa del tratto gastro-intestinale, per quanto importante da esaminare e di immediata valutazione, non offre possibilità di definire opportunamente l'attività di malattia: questo perché l'intensità della flogosi è soggetta ad interpretazione soggettiva e, inoltre, la guarigione clinica non sempre correla con la guarigione mucosale<sup>4</sup>.

Ogni indice utilizzato deve essere valido, riproducibile, accurato e funzionale.

Molte classificazioni endoscopiche sono state proposte per la valutazione dell'attività di malattia, ma nessuna universalmente accettata e validata. Questo problema è dovuto a due ragioni: la difficoltà di standardizzazione e di riproducibilità di questi score, sia tra un operatore e un altro, che nella valutazione dello stesso operatore in tempi diversi; nonché, la frequente discordanza tra indici endoscopici e istologici<sup>2,3</sup>.

Per quanto riguarda la Rettocolite Ulcerosa, nonostante la remissione endoscopica appaia più frequentemente concomitante alla remissione clinica rispetto a quanto si

osserva per la Malattia di Crohn, nessun indice endoscopico è stato formalmente introdotto e valutato<sup>3-5</sup>.

Alcuni studi hanno analizzato la guarigione mucosale nella colite ulcerosa. Sia con trattamento con infliximab (IFX) utilizzando la colectomia come indicatore del decorso clinico dei pazienti trattati.<sup>42</sup>; sia utilizzando la remissione a 3 mesi con infliximab<sup>43</sup> o terapia steroidea<sup>44</sup>.

Va rilevato come ancora manchi un trial clinico randomizzato che stratifichi la strategia terapeutica in base a parametri endoscopici.

Tali dati confermano pertanto quanto già noto dalla letteratura, più o meno recente, riguardante la capacità di vari farmaci convenzionali (mesalazina, steroidi, azatioprina e infliximab) di indurre, in una percentuale variabile di pazienti, un miglioramento endoscopico. È da notare come la valutazione endoscopica della guarigione mucosale dopo terapia, non sia avvenuta ad un timing omogeneo prefissato; l'indicazione all'esame è eterogenea, dalla rivalutazione di malattia clinicamente attiva a quella in fase quiescente: non viene del resto fatto alcun cenno alla correlazione con i dati clinici. Anche la definizione di guarigione mucosale rimane (come in altri studi) discutibile, prevedendo non solo un Mayo subscore 0, ma anche subscore 1 (che include alterazioni, seppur minime, quali l'edema e l'iperemia).

A complicare ulteriormente la situazione, altri articoli spostano l'attenzione verso un livello ancor più profondo di analisi del problema: la guarigione non solo endoscopica ma anche istologica indotta dai trattamenti e il suo relativo impatto prognostico.

Alcuni autori analizzano la correlazione tra indici endoscopici e istologici nella valutazione dell'attività di colite ulcerosa utilizzando il subscore Mayo, riportando una buona correlazione nelle fasi estreme di malattia (quiescente o severa), mentre maggior dispersione è stata notata nelle forme lievi, dove l'istologia tendeva a rilevare forme più severe di quanto l'endoscopia non mostrasse<sup>34</sup>.

Altri correlano i parametri istologici (indice di Geboes) con quelli di remissione clinica di malattia, endoscopici (Mayo subscore) e biochimici, per predire il rischio di recidiva clinica in pazienti con colite ulcerosa in fase di remissione anche endoscopica (Mayo subscore 0). Nonostante il loro mucosal healing, il 40% dei pazienti aveva segni istologici di attività significativa<sup>35,36</sup>.

## **L'ENDO-MICROSCOPIA LASER CONFOCALE (CLE)**

Vista questa discordanza tra quadro endoscopico e istologico, nasce la necessità di mettere a punto nuove metodiche che consentano una valutazione mucosale più accurata. Una tecnologia nuova per l'analisi in vivo della mucosa gastrointestinale e la relativa micro vascolarizzazione, è quella dell'endomicroscopia laser confocale (CLE).

Questo endomicroscopio nasce dall'associazione di un microscopio confocale miniaturizzato, all'estremità di un endoscopio classico, permettendo così di effettuare l'analisi classica e quella a livello microscopico della mucosa simultaneamente.

L'endomicroscopia confocale laser offre, in corso di endoscopia, immagini microscopiche della mucosa, con una magnificazione di circa 1000x e una risoluzione tale da consentire l'identificazione delle microstrutture cellulari e subcellulari (cripte ghiandolari, villi, vascolarizzazione)<sup>20,40,41</sup>.

Questa tecnica, pertanto, consente una valutazione istologica del tessuto in-vivo e in tempo reale (biopsie virtuali) ed è utile nella diagnosi precoce di lesioni tumorali o displastiche<sup>5</sup>.

La microscopia confocale è stata utilizzata nella scienza biologica dal 1961 quando fu introdotto il concetto di sezionare otticamente un pezzo bioptico.

I primi microscopi confocali erano di notevole ingombro, costruiti per laboratori di ricerca e assolutamente inadatti per poter condurre esplorazioni degli organi interni. I microscopi confocali laser di utilizzo clinico si basano sullo stesso principio dei loro omologhi di laboratorio, ma per la loro realizzazione sono stati seguiti principi costruttivi notevolmente diversi dai primi.

Delaney ed altri (1994,1995) hanno sviluppato un apparato CLE con una singola fibra ottica, utilizzata alternativamente per l'illuminazione e per l'acquisizione. L'output della fibra in fase di acquisizione è ottenuto in modo sincrono da un computer per la ricostruzione dell'immagine, accorgimento che facilita la miniaturizzazione dell'unità di scansione ed elimina la necessità di correggere gli allineamenti ottici, problema diffuso nella maggior parte dei microscopi.

Per creare le immagini confocali un laser a bassa potenza (a ioni di argon che genera un'eccitazione di lunghezza d'onda di 488nm) a luce blu, è focalizzato su un'area di mucosa, all'interno di un campione fluorescente. La lente funge da condensatore e focalizzatore del cammino ottico: il punto di illuminazione coincide quindi con il punto di rilevazione, da qui il termine confocale.

La luce emanata dal punto è focalizzata attraverso un'apertura (pinhole) a un detector, mentre la luce proveniente da zone esterne al punto è bloccata.

Dopo aver attraversato il pinhole, la luce fluorescente è rilevata da un dispositivo di foto rilevamento (un tubo fotomoltiplicante o fotodiodo a valanga), trasformando il segnale luminoso in elettrico che è registrato da un computer.

L'immagine ricostruita non presenta sfocature o artefatti causati da contributi luminosi provenienti da piani non focali, e rende possibile il sezionamento ottico, caratteristica chiave della microscopia rispetto alle ottiche tradizionali. Il piano focale può essere posizionato a profondità differenti mediante degli attuatori, permettendo di acquisire immagini di piani sequenziali, creando una ricostruzione tridimensionale del tessuto (ove non sono tuttavia presenti le strutture che non assorbono le sostanze di contrasto): la "biopsia virtuale".

Tutti i segnali rilevati dal punto illuminato sono catturati e misurati. Quando il laser esplora il piano d'interesse, un'intera immagine è ottenuta pixel-per-pixel e linea-per-linea. La luminosità dei pixel dell'immagine corrisponde all'intensità relativa della luce fluorescente rilevata. L'immagine ottenuta in scala di grigi è una sezione ottica che rappresenta un piano focale all'interno del campione esaminato.

Le immagini endomicroscopiche sono generate mediante l'uso di un agente di contrasto fluorescente.

I mezzi di contrasto più comunemente usati negli studi effettuati e già pubblicati sono la fluoresceina sodica e l'acriflavina idrocloride.

La fluoresceina sodica, già largamente utilizzata in oftalmologia e angiografia, è il mezzo di contrasto più adoperato per il basso costo e l'assenza di potenzialità mutagenica. Dopo la somministrazione endovenosa di 5-10 mL, la fluoresceina sodica in soluzione al 10% si distribuisce in pochi secondi attraverso l'intera mucosa: le cellule, il sistema vascolare e il tessuto connettivo possono essere ben distinti;

mentre i nuclei cellulari non sono chiaramente visibili . L'eliminazione comincia dopo 20 minuti dall'iniezione, La sostanza è eliminata completamente per via renale<sup>46-50</sup>.

L'acriflavina idrocloride può essere applicata sulla mucosa (con catetere spray) per via topica in soluzione allo 0.2%, per colorare il nucleo e il citoplasma cellulare. Questa sostanza è assorbita in pochi secondi e la sua azione è circoscritta agli strati superficiali della mucosa, circa 100  $\mu\text{m}$ . Il suo uso è da limitare per una possibile attività mutagenica.

Fluoresceina e acriflavina possono essere utilizzate contemporaneamente<sup>26</sup>.

Le immagini CLE contengono un alto contenuto di informazione: la risoluzione di 1 megapixel (1024x1024 pixel), rappresenta un campo laterale di 500 $\mu\text{m}$ x500 $\mu\text{m}$  con risoluzione laterale di 0.7 $\mu\text{m}$  . Questo campo visivo è sufficientemente largo da visualizzare l'architettura delle cripte e caratterizzato da una risoluzione tale da visualizzare dettagli cellulari, subcellulari ed in taluni casi subnucleari. La risoluzione assiale è di circa 7 $\mu\text{m}$  , con uno o due strati di cellule per immagine.

Nella colonscopia confocale laser, le cellule delle ghiandole e le cellule epiteliali possono essere chiaramente distinte. Le immagini degli strati più profondi della mucosa mostrano in toni chiari una struttura a nido d'ape: si tratta della rete di capillari che forma la micro vascolarizzazione del tessuto. E' da notare come i globuli rossi non assorbono la fluoresceina, mostrandosi nelle immagini come punti neri all'interno dei vasi.

L'imaging nella microscopia confocale laser, utilizza criteri morfologici e funzionali per la valutazione dinamica dei processi nei tessuti agli agenti di contrasto utilizzati, per valutare la disposizione cellulare nel tessuto, la migrazione delle cellule, i fenomeni di necrosi e di apoptosi. Partendo dal presupposto che la funzionalità dei capillari è alterata nei tessuti infiammati e nelle neoplasie, mediante la CLE si possono valutare le variazioni di questi vasi in vari modi, osservando l'aumento del numero di vasi nella mucosa e la loro forma. Nelle infiammazioni i vasi aumentano in numero e ma perdono in resistenza, sono molto fragili e permeabili, con conseguenti perdite di sangue e di liquido di contrasto nei tessuti, pur mantenendo diametro regolare<sup>1, 17-23</sup>.

La perdita di fluoresceina è caratteristica delle infiammazioni attive delle mucose, come la colite ulcerativa, che nelle immagini CLE si traduce in contorni forti nella lamina propria non confinati nei soli vasi. In uno stato post infiammatorio, permane

l'elevato numero di vasi, mentre le perdite di coloranti diventano meno apprezzabili. E' stato stabilito con certezza come l'angiogenesi sia una tappa fondamentale dello sviluppo patologico delle neoplasie, sviluppando vasi che differiscono dai capillari sani poiché mostrano come detto perdite e fragilità, strutture tortuose e irregolari nonché, a differenza dei soli vasi infiammati, diametro anomalo. Queste situazioni microstrutturali non sono visibili con analisi ex vivo. La fluoresceina non viene tuttavia assorbita dai nuclei, pertanto i cambiamenti degli stessi nelle neoplasie non sono valutabili.

L'endomicroscopia laser confocale (CLE) può essere eseguita attualmente con due dispositivi:

1. Endomicroscopio integrato in un endoscopio dedicato (Pentax, Tokio, Giappone, qui definito eCLE), non più in produzione;
2. Mini-sonda (di seguito definito pCLE) capace di passare attraverso il canale operativo della maggior parte degli endoscopi (Cellvizio, Mauna KeaTechnologies, Parigi, Francia).

### **Pentax EG---3870CIK (endoscopio superiore) CE---3870CILK (colonscopio)**

I componenti dell'endoscopio laser confocale sono basati sull'integrazione di un microscopio laser confocale nella punta distale di un endoscopio convenzionale, che consente di eseguire una microscopia confocale in aggiunta alla video endoscopia standard (Figura 13).

Il diametro è di 12,8 mm, la punta distale contiene un beccuccio per il getto di aria e acqua, 2 luci guida, un canale ausiliare per il getto d'acqua (usato per l'applicazione topica dell'agente di contrasto) e un canale operativo di 2,8 millimetri.

Questo sistema fornisce un'immagine confocale utilizzando un laser incidente con una lunghezza d'onda di 488 nm, e consente la rilevazione della fluorescenza con una lunghezza d'onda di 505-585 nm, con una riduzione del rumore dell'immagine rispetto ai sistemi di riflessione confocale.

Le immagini CLE vengono raccolte in una scansione con una velocità di 1,6 fotogrammi al secondo (1024 × 512 pixel) o 0,8 fotogrammi al secondo (1024 × 1024 pixel) con una profondità di scansione regolabile da 0 a 250 μm, un campo visivo di 475 × 475 μm, una risoluzione laterale 0,7 μm, e una risoluzione assiale di 7 μm.

Le immagini confocali sono generate simultaneamente con le immagini endoscopiche e il canale di lavoro dell'endoscopio può ancora essere utilizzato.

### **Sistema Cellvizio® Endomicroscopy**

Il Sistema Cellvizio® Endomicroscopy (Figura 15) è basato su una sonda con un semiconduttore laser che oscilla a 488 nm. L'ultimo modello di minisonda Cellvizio confocale creata per l'applicazione sul tratto gastrointestinale include CholangioFlex, GastroFlex, ColoFlex, GastroFlex-UHD, e ColoFlex-UHD.

Le Sonde CholangioFlex sono state progettate per l'uso durante la colangiopancreatografia retrograda endoscopica che richiede un canale endoscopico di almeno 1,2 mm, mentre le altre sonde, che sono state progettate per l'uso in gastroscopia e colonscopia, richiedono un canale maggiore di 2,8 mm.

Tutte le sonde generano immagini dinamiche (12 fotogrammi al secondo) con un campo di scansione di 30.000 pixel.

Questo sistema ha un campo visivo di 240-600  $\mu\text{m}$  (Sonde CholangioFlex: 325  $\mu\text{m}$ ; GastroFlex e ColoFlex: 600  $\mu\text{m}$ ; GastroFlex-UHD e ColoFlex-UHD: 240  $\mu\text{m}$ ) con una risoluzione laterale di 1-3,5  $\mu\text{m}$  (la risoluzione laterale per il CholangioFlex e per le sonde GastroFlex e ColoFlex è 3,5  $\mu\text{m}$ ; la risoluzione laterale per GastroFlex-UHD e ColoFlex-UHD è di 1  $\mu\text{m}$ ).

Questi sistemi hanno un piano dell'immagine a profondità fissa, e le diverse minisonde confocali sono necessarie per variare la profondità d'imaging, che è per sonde CholangioFlex 40-70  $\mu\text{m}$ , 70-130  $\mu\text{m}$  per GastroFlex e ColoFlex, e 55-65  $\mu\text{m}$  per GastroFlex-UHD e ColoFlex-UHD.

Singoli fotogrammi video sono ricostruiti da uno speciale algoritmo computerizzato ("mosaicatura") in un'immagine con un campo visivo allargato (4 mm  $\times$  2 mm).

Il sistema e-CLE ha una maggiore risoluzione, esplora un'area di mucosa più ampia e permette la scansione della mucosa dalla superficie sino a 250  $\mu\text{m}$  di profondità.

L'integrazione del microscopio confocale al video endoscopio limita le dimensioni del canale operativo (2.8 mm) e condiziona una maggiore lunghezza del terminale rigido dell'endoscopio (48 mm), rendendo lo strumento meno flessibile di uno standard. L'utilizzo del sistema p-CLE è più versatile, poiché può essere inserito nel canale accessorio di qualunque tipo di endoscopio. Per eseguire il campionamento

mirato è necessario estrarre la minisonda confocale dal canale operativo dell'endoscopio. Il campo microscopico esplorabile in vivo è inferiore al sistema e-CLE, è possibile comunque eseguire una ricostruzione della superficie esplorata nel post-processing.

Una volta che una zona sospetta della mucosa è stata identificata, vengono somministrati gli agenti di contrasto (fluoresceina e/o acriflavina), e un esame endomicroscopico confocale dell'area interessata si esegue posizionando la punta distale dell'endoscopio o la punta distale della sonda contro la mucosa.

L'orientamento del piano di "taglio" confocale delle immagini istologiche in vivo è orizzontale, mentre nei convenzionali campioni istologici è longitudinale. Nelle immagini CLE non è possibile visualizzare una panoramica simultanea della struttura mucosa e sottomucosa, a differenza dell'istologia convenzionale.

Le immagini CLE forniscono una visione completa dell'architettura mucosale consentono la differenziazione tra mucosa normale, rigenerativa e neoplastica del tratto GI. La differenziazione con la CLE tra i gradi di neoplasia intra-epiteliale, tuttavia, non è ancora possibile con le tecniche di colorazione attualmente disponibili.

Per eseguire la CLE gli Endoscopisti devono possedere una buona conoscenza della microarchitettura normale e patologica del tratto GI. Durante il processo di apprendimento è raccomandato avere un patologo in loco o almeno una revisione delle immagini memorizzate da parte di un patologo e la correlazione con l'esame istologico su biopsia.

## **SCOPO**

Lo scopo di questo studio è inquadrare e identificare le potenzialità dell'endomicroscopia laser confocale, comparata all'endoscopia in bianco e all'istologia convenzionale, nella valutazione dell'attività di malattia nella retto-colite ulcerosa, specialmente nelle forme intermedie laddove le immagini endoscopiche tendono a sottostimare la severità delle lesioni ritrovate all'esame istologico.

## **METODI**

### **Pazienti**

Sono stati arruolati tutti i pazienti consecutivi afferiti presso l'UOC di Endoscopia Digestiva Operatoria dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Federico II, con diagnosi pregressa di retto-colite ulcerosa<sup>1</sup>. Sono stati esclusi dallo studio i casi di ipersensibilità alla fluoresceina, insufficienza renale o epatica, età inferiore a 18 o maggiore di 80 anni, gravidanza o allattamento, impossibilità a capire o leggere un consenso informato. Un gruppo di pazienti controllo, seguiti presso lo stesso Dipartimento per monitoraggio da cancro del colon retto (senza segni endoscopici né istologici di IBD) è stato utilizzato per ottenere immagini di mucosa colica sana con l'endo-microscopia laser confocale<sup>9</sup>. È stato sottoscritto il consenso informato da tutti i partecipanti. Lo studio è stato approvato dal comitato etico locale.

### **Endoscopia**

La preparazione del colon è stata ottenuta somministrando polietilen-glicole. La sedazione è stata praticata, a richiesta del paziente, con midazolam 5mg e.v.<sup>24</sup>.

La valutazione endoscopica è stata praticata con colonscopio Olympus CF-HQ190 O CF Q180AL/I.

L'attività di malattia è stata valutata attraverso il sub-score endoscopico di Mayo<sup>25</sup>:

0 = mucosa normale o quiescente;

1= malattia in fase inattiva (eritema, congestione e amputazione del disegno vascolare);

2 = moderata attività di malattia (erosioni, friabilità della mucosa, eritema marcato, scomparsa del disegno vascolare);

3 = attività di malattia severa (ulcerazioni, muco-pus, sanguinamento spontaneo). I pazienti sono stati suddivisi in base all'attività di malattia in tre gruppi:

1. Malattia quiescente (QUC – Mayo 0)
2. Malattia inattiva (IUC – Mayo 1)
3. Malattia attiva moderato-severa (AUC – Mayo 2-3)

## Endomicroscopia laser confocale

L'esame endo-microscopico è stato praticato utilizzando la Probe-based CLE (p-CLE) di Cellvizio® Endomicroscopy System (Mauna Kea Technologies, Paris, France). Questo sistema usa una sonda da 2,5 mm (Coloflex UHD-type probe) che viene inserita attraverso il canale operativo dell'endoscopio per ottenere le immagini mucosali. L'acquisizione delle immagini avviene a 12 frame per secondo con un campo da 30000 pixel. Il campo di visione è 240 x 200 µm, con una risoluzione laterale di 1 µm. Per ridurre gli artefatti legati alla peristalsi intestinale, sono stati somministrati, 10mg di buscopan e.v.

Ad ogni paziente, prima della scansione con CLE, sono stati somministrati 5mL di fluoresceina sodica al 10% e l'esame endomicroscopico è stato eseguito per un intervallo di tempo standard di 15 minuti<sup>5,26</sup>.

L'esame endomicroscopico in tutti i casi e controlli è stato condotto nel retto medio, a circa 6 cm dalla linea dentata. Dopo la valutazione con p-CLE sono state praticate biopsie nella stessa area, per la valutazione anatomo-patologica.

I parametri presi in considerazione al p-CLE sono:

1. Architettura delle cripte: regolarità, presenza di cripte fuse, diametro delle cripte e distanza inter-criptica.
2. Pattern microvascolare: regolari, dilatati, irregolari, interrotti e deformati.
3. Stravasamento di fluoresceina: assente o presente nel lume ghiandolare<sup>17,22,23,27</sup>.

Per ridurre gli artefatti tecnici ed evidenziare il maggior numero possibile di cripte, è stato adoperato la tecnica di " video-mosaicing" (Mauna Kea Technologies, Paris, France) per la ricostruzione post-esame delle immagini.

Per ogni paziente sono stati ricostruite dieci immagini contenenti almeno 10 cripte ghiandolari per un totale di almeno 100 cripte per paziente. L'analisi è stata effettuata usando l'algoritmo di un software dedicato (Cellvizio Viewer, Mauna Kea Technologies, Paris, France).

## **L'esame istologico.**

Le biopsie endoscopiche sono state valutate all'istologia convenzionale. I campioni sono stati fissati con ematossilina-eosina. Per la valutazione istologica dell'attività di malattia nella colite ulcerosa è stata utilizzata la classificazione di Geboes:

- Geboes 0 : Nessuna alterazione,
- Geboes 1 infiltrato infiammatorio cronico;
- Geboes 2 infiltrato di neutrofili e eosinofili nella lamina propria;
- Geboes 3 Infiltrato di neutrofili nell'epitelio;
- Geboes 4 Distruzione delle cripte;
- Geboes 5 ulcerazioni.

I risultati istologici sono stati comparati alla valutazione con p-CLE<sup>28</sup>.

## **Analisi statistica**

I dati acquisiti sono stati espressi come mediane e range interquartili in caso di dati individuali continui, o come frequenze di eventi, in caso di dati parametrici. I dati continui non parametrici sono stati confrontati attraverso l'esame di Wilcoxon. I dati parametrici sono stati paragonati attraverso il test *chi-quadro* o il test di Fisher, a seconda dei casi. Un valore di "p" uguale o inferiore a 0,05 è stato considerato statisticamente significativo. I grafici sono stati elaborati mediante software Prism (GraphPad Prism, versione 5.0f, La Jolla, CA, USA). Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software SPSS (versione 16.0, Chicago, IL, USA) per Windows.

## RISULTATI

Sono stati inclusi nello studio cinquanta pazienti [22 femmine, mediana di età 43 anni (18-67)] con diagnosi di rettocolite ulcerosa. Il gruppo dei controlli è composto da 10 pazienti.

In tabella 1 sono riassunti i principali dati endoscopici e microendoscopici.

Alla valutazione endoscopica, 11 pazienti (22%) presentavano una malattia in fase quiescente (QUC – Mayo 0), 19 pazienti (38%) una malattia inattiva (IUC – Mayo 1), 12 pazienti (24%) avevano una malattia in fase attiva moderata (AUC - Mayo 2) e 8 pazienti (16%) una malattia in fase attiva severa (AUC – Mayo 3).

All'endomicroscopia laser confocale sono state ritrovate cripte fuse in tutti i pazienti con rettocolite ulcerosa, anche in quelli con malattia quiescente, mentre non erano presenti in nessun paziente del gruppo controllo.

Le cripte erano regolari e uniformemente distribuite nel gruppo di controllo e nella maggior parte delle immagini dei pazienti con malattia quiescente, al contrario risultavano irregolari e diradate nelle fasi attive di malattia.

Il diametro delle cripte dei pazienti con QUC erano di dimensioni simili ai controlli (72.8  $\mu\text{m}$  vs 75.8  $\mu\text{m}$ ;  $p=0.54$ ), mentre era significativamente aumentato nel gruppo IUC (86.6  $\mu\text{m}$ ;  $p<0.01$ ), e nei pazienti AUC (89.6  $\mu\text{m}$  and 91  $\mu\text{m}$ ;  $p<0.01$  and  $<0.001$ , rispettivamente, Figura 1).

La distanza inter-criptica (IC) è direttamente correlata all'attività di malattia (Figura 2), risultando maggiore nel gruppo con AUC severa (90.5  $\mu\text{m}$ ) rispetto al gruppo con AUC moderata (88.6  $\mu\text{m}$ ) e nei pazienti con IUC (ID 83.1  $\mu\text{m}$ ;  $p<0.01$ ). L'IC non è risultata differente nei pazienti con QUC rispetto a quelli con mucosa sana (65.1  $\mu\text{m}$  vs 63.7  $\mu\text{m}$ ;  $p=0.55$ ).

Le alterazioni della microvascolarizzazione riscontrate alla p-CLE sono correlate all'attività di malattia. Esse sono state ritrovate in tutti i pazienti con AUC, nel 40% dei pazienti con IUC, nel 18% dei pazienti con QUC. Nessuna alterazione è stata ritrovata nei pazienti controllo.

La fuoriuscita di fluoresceina nel lume ghiandolare (FL) è direttamente correlata all'attività di malattia (Figura 3). La FL è stata ritrovata in tutti i pazienti AUC severi,

nel 90% dei pazienti AUC moderati, nel 27% dei pazienti IUC e nel 18% dei pazienti FL non è stato riscontrato nei pazienti controllo.

Le figure 4, 5 e 6 mostrano i principali aspetti all'endomicroscopia laser confocale nei pazienti con rettocolite ulcerosa.

Tutti i 10 pazienti controllo hanno presentato reperti istologici compatibili con Geboes 0. Negli 11 pazienti QUC, 6 sono stati valutati Geboes 0 (immagine rappresentativa in Fig. 7) e 5 come Geboes 1 (immagine rappresentativa in Fig. 8). Nei 19 pazienti IUC, 15 sono stati classificati Geboes 2 (immagine rappresentativa in Fig. 9) e 4 Geboes 3 (immagine rappresentativa in Fig. 10). Nei 12 pazienti AUC moderati, 7 avevano lesioni compatibili con uno score Geboes 3, e 5 con uno score Geboes 4 immagine rappresentativa in (Fig. 11). Tutti gli 8 pazienti AUC severi presentavano uno stadio Geboes 5 (immagine rappresentativa in Fig. 12).

Per quanto concerne gli effetti collaterali delle procedure, 3 pazienti hanno riferito un transitorio ingiallimento della cute. Nessuna reazione allergica e nessun'altra reazione avversa è stata riscontrata al termine dell'esame e nei 30 giorni successivi alla procedura.

## DISCUSSIONE

La frequente discrepanza tra la valutazione endoscopica e istologica rende la valutazione endoscopica necessaria ma non sufficiente nella valutazione dell'attività di malattia. C'è una buona correlazione tra endoscopia e istologia nelle fasi estreme (malattia in fase inattiva e attività severa), mentre negli stadi intermedi l'endoscopia mostra un'alta percentuale di falsi negativi<sup>34</sup>. Circa il 40% dei pazienti con una guarigione mucosale alla colonscopia in bianco presentava segni di attività di malattia all'esame istologico<sup>35-37</sup>.

Questa discrepanza nelle forme intermedie potrebbe essere legata anche a problemi valutativi inter-osservatore, sia per quanto riguarda la valutazione endoscopica che istologica. Pertanto, una migliore stadiazione dell'attività infiammatoria in questo gruppo di pazienti potrebbe avere la sua importanza, nell'identificazione dei casi con un rischio aumentato di ricaduta nei successivi 12 mesi<sup>2,3</sup>.

L'endomicroscopia laser confocale permette un'analisi microscopica accurata della mucosa intestinale e può quindi costituire il ponte tra l'endoscopia e l'istologia convenzionale<sup>16,23</sup>.

In questo studio, l'attività di malattia nella rettocolite ulcerosa è stata valutata mediante p-CLE, prendendo in considerazione come markers endo-microscopici le alterazioni dell'architettura delle cripte, le caratteristiche della microvascolarizzazione e la fuoriuscita di fluoresceina nel lume ghiandolare<sup>22,23</sup>.

L'architettura delle cripte è un importante parametro per valutare lo stato di salute della mucosa. Nel nostro studio, l'architettura ghiandolare è stata valutata prendendo in considerazione 4 elementi:

1. La regolarità delle cripte;
2. La presenza di cripte fuse;
3. Il diametro delle cripte;
4. La distanza tra una cripta e l'altra.

Rispetto ad una scala descrittiva<sup>23</sup>, questo approccio analitico permette una valutazione più oggettiva dell'architettura delle cripte. Nel nostro studio, le cripte fuse sono una caratteristica tipica della rettocolite ulcerosa, perché assenti in tutti i controlli, ma presenti costantemente in tutti i pazienti affetti da RCU,

indipendentemente dal grado di attività di malattia. La dimensione delle cripte e la distanza inter-criptica, come atteso, sono direttamente proporzionali alla severità dell'infiammazione vista all'endoscopia, ciò è la conseguenza della presenza di essudato nel lume ghiandolare e dell'infiltrato infiammatorio nella lamina propria<sup>38,39</sup>.

Le alterazioni della microvascolarizzazione costituiscono affidabili e specifici parametri alla p-CLE nella valutazione dell'infiammazione, con un'alta correlazione con l'esame istologico<sup>23</sup>. Nel nostro studio, le irregolarità vascolari sono segni comuni nella RCU con attività severa, ma è ancora più interessante ritrovare queste caratteristiche nel 18% dei pazienti QUC, che non presentavano segni endoscopici di attività di malattia.

È già stata dimostrata la correlazione tra perdita di fluoresceina ed evidenza istologica di infiammazione. Infatti, la presenza di fluoresceina al di fuori del compartimento micro-vascolare, e soprattutto nella lamina propria pericriptica, è dovuta all'aumento della permeabilità vascolare, che è un segno indiretto dell'infiammazione. La FL è risultata direttamente correlata con l'aumentare del grado di attività di malattia. La FL era presente anche nel 18% dei pazienti in fase di quiescenza all'esame endoscopico (QUC), mentre era totalmente assente nel gruppo di controllo.

Le biopsie sono servite per valutare all'esame istologico convenzionale le aree studiate con l'endomicroscopia. L'esame anatomo-patologico è stato effettuato utilizzando la classificazione di Geboes, come già riportato<sup>28,45</sup>. Nel gruppo QUC, l'esame istologico convenzionale non evidenziava nessuna alterazione in 5 casi su 11, sebbene la p-CLE mostrava cripte fuse in tutti i pazienti del gruppo.

Bisogna precisare che l'area esplorata dalla microscopia confocale è campionata random biotticamente. Va altresì precisato che, al di là delle cripte fuse, diverse cripte normali sono ad ogni modo nei pazienti QUC. È dunque possibile che il campionamento aleatorio delle aree interessate dalla procedura non contenesse necessariamente le anomalie riscontrate alla tecnica confocale.

La tecnica confocale, pertanto, consente un'analisi microscopica di una superficie di mucosa notevolmente maggiore rispetto all'esame istologico, permettendo di ottenere dati su un numero molto maggiore di ghiandole.

La maggiore discrepanza tra endoscopia e istologia è stata riscontrata nelle fasi intermedie di attività. Nel gruppo IUC (altrimenti detto Mayo 1), 4 erano stati valutati Geboes 3, con infiltrato di neutrofili nell'epitelio, segno di solito presente nelle fasi di attività più severa. Nonostante la buona correlazione tra le alterazioni evidenziate alla tecnica confocale e lo score istologico di Geboes, un confronto diretto non appare pertinente, dal momento che le due tecniche valutano parametri differenti. Infatti i parametri endomicroscopici come la dimensione delle cripte ghiandolari, la distanza inter-criptica e la fuoriuscita di fluoresceina, non sono direttamente comparabili ai parametri anatomo-patologici considerati nello score di Geboes (infiltrazione dei neutrofili).

Ad ogni modo, sia l'esame istologico che quello endo-microscopico rilevano alterazioni mucosali anche in pazienti senza evidenza di malattia all'endoscopia tradizionale a luce bianca. In altri termini, la p-CLE appare più sensibile rispetto alla colonscopia standard in pazienti RCU con malattia quiescente.

In questo studio abbiamo usato l'endo-microscopio confocale miniaturizzato in una sonda TTS (p-CLE). Altri studi hanno utilizzato l'endoscopia laser confocale integrata all'endoscopia (e-CLE). Il vantaggio della p-CLE risiede nella maggiore flessibilità, nella possibilità di utilizzo con qualsiasi endoscopio standard, e nella scelta della sonda più idonea in funzione della mucosa da analizzare; il vantaggio della e-CLE risiede nella migliore risoluzione ( $1 \mu\text{m}$  vs  $0.7 \mu\text{m}$ ) e nel maggior campo di visione ( $240\text{--}600 \mu\text{m}$ ) rispetto alla p-CLE. Nessuno studio scientifico ha direttamente comparato le due metodiche.

Alcuni limiti tecnici possono interferire con una corretta valutazione mucosale in corso d'esame: il campo visivo ristretto e il decadimento della fluoresceina (circa 15-20min), limitano in maniera significativa il tempo per l'acquisizione delle immagini e possono influire sulla corretta valutazione della mucosa colica. Il costo della strumentazione e l'aumento significativo della durata dell'esame endoscopico, rappresentano il limite per l'applicazione routinaria della metodica. Infine, una curva di apprendimento è necessaria per effettuare un corretto esame endo-microscopico. Ciò può creare un certo disaccordo valutativo tra un osservatore e l'altro, come spesso accade nell'acquisizione di una nuova metodica.

Tra i limiti intrinseci di questo studio dobbiamo annoverare il numero ristretto dei pazienti arruolati. Studi condotti su estese popolazioni di pazienti garantirebbero, oltre alla conferma dei dati sperimentali, maggiori informazioni sulla sicurezza e la

tollerabilità della tecnica. La validazione dell'esame p-CLE permetterebbe anche di standardizzare la procedura e di inserirla nelle linee guida di diagnosi e cura della RCU.

Alla luce di questi dati si possono fare alcune deduzioni principali:

- 1) La tecnica p-CLE consente la visualizzazione di alterazioni mucosali specifiche in pazienti con rettocolite ulcerosa in guarigione mucosale. In particolare la fusione delle cripte, che appare un'anomalia tipica della RCU. La valutazione di questi parametri alla p-CLE è immediata, senza la necessità di effettuare ricostruzioni delle immagini registrate. Ciò può permettere l'esecuzione di biopsie mirate aumentando l'accuratezza della valutazione anatomo-patologica, nei pazienti in remissione endoscopica di malattia.
- 2) La tecnica p-CLE conferma la presenza di alterazioni mucosali in tutti i pazienti con attività di malattia moderata e severa. La p-CLE è pertanto non inferiore all'endoscopia tradizionale nell'identificazione di lesioni in questi pazienti.

## **CONCLUSIONI**

L'endomicroscopia laser confocale è un mezzo utile per determinare e quantificare l'attività di malattia nei pazienti con rettocolite ulcerosa, specialmente nelle forme intermedie dove l'esame endoscopico in bianco è meno sensibile. La selezione di opportuni parametri alla CLE è un fattore chiave per ottenere una valutazione affidabile dell'attività di malattia. La fusione delle cripte appare un segno specifico nei pazienti affetti da RCU. Lo stravasamento di fluoresceina e le alterazioni microvascolari hanno permesso di identificare delle anomalie in un sotto-gruppo di pazienti che erano inizialmente classificati in guarigione mucosale alla colonscopia tradizionale.

Sarebbe interessante valutare prospetticamente questi pazienti, per verificare se presentassero un maggiore tasso di recidiva di malattia rispetto a quelli con malattia inattiva alla p-CLE.

## PROSPETTIVE FUTURE

L'endomicroscopia laser confocale si presta a sfruttare i recenti progressi nel campo dell'*imaging* molecolare. Piccole molecole e nanoparticelle fluorescenti possono essere legate ad anticorpi monoclonali o a peptidi che si legano a loro volta a specifici bersagli. Queste molecole così prodotte appaiono visibili alla luce laser, e, se utilizzate in corso di endomicroscopia, potrebbero consentire lo studio morfologico-funzionale della mucosa da analizzare<sup>54</sup>.

Un anticorpo marcato, selettivo per il TNF $\alpha$  è stato utilizzato per evidenziare la presenza di questa molecola sui colociti. Questo dato può essere utile per valutare l'aggressività della malattia e la probabilità di ripresa di malattia, ma può essere utilizzato anche come indice predittivo per la risposta terapeutica con gli anti TNF $\alpha$ .<sup>55,56</sup>

In recenti studi è stato impiegato un eptapeptide fluorescente sensibile e specifico per i polipi adenomatosi. Dopo somministrazione topica, l'esame endomicroscopico ha visualizzato un legame preferenziale del peptide ai colonociti displastici con un'alta sensibilità e specificità (rispettivamente 81% e 82%), sebbene la sequenza del bersaglio molecolare sia ancora sconosciuta<sup>51</sup>.

Nel nostro dipartimento, svolto in collaborazione con i laboratori del CEINGE – Biotecnologie avanzate, è attualmente in corso un altro progetto di ricerca, che prevede l'utilizzo di peptidi marcati con fluoresceina nella valutazione della mucosa dei pazienti con rettocolite ulcerosa. Tale studio concerne l'utilizzo del peptide "VRPMPLQ" marcato con fluoresceina e applicato *ex vivo* su campioni biotici di mucosa in pazienti con rettocolite ulcerosa.

Il peptide mostra affinità per i colociti displastici, e grazie al legame con la fluoresceina è possibile l'identificazione con endomicroscopia laser confocale. Queste caratteristiche permettono l'identificazione in tempo reale di aree displastiche, al punto da effettuare biopsie mirate nella sorveglianza dei pazienti affetti da rettocolite ulcerosa "long-standing". L'utilizzo topico del peptide marcato evita la somministrazione della fluoresceina per via sistemica evitando l'insorgenza degli effetti collaterali sistemici.

In un altro studio è stata valutata l'abilità dello studio endomicroscopico con *imaging* molecolare di determinare in tempo reale l'espressione di EGFR, target

terapeutico per il cancro del colon-retto, in un modello animale. EGFR è iperespresso in molti tumori, gioca un ruolo centrale nella proliferazione, angiogenesi, invasione e metastasi. In questo studio è stato possibile visualizzare e differenziare i pattern di espressione di EGFR in topi con xenotrapianto di tumore coloretale umano con una sonda CLE palmare dopo iniezione di anticorpi fluorescenti. L'applicazione topica dell'anticorpo fluorescente ha fornito un adeguato contrasto, permettendo di distinguere il tessuto neoplastico da quello non neoplastico in base all'espressione di EGFR <sup>52</sup>.

Gli stessi ricercatori hanno studiato successivamente anche l'espressione di VEGF, target terapeutico del cancro coloretale metastatico <sup>53</sup>.

Questi primi studi dimostrano la fattibilità dell'immunoendoscopia e potenzialmente l'applicabilità nella pratica clinica. L'immunoendoscopia potrebbe, dunque, essere di aiuto nell'identificazione di sottogruppi di pazienti in grado di beneficiare di terapie mirate, e nella valutazione precoce dell'eventuale risposta al trattamento.

## BIBLIOGRAFIA

1. **Dignass A**, Eliakim R, Magro F, Maaser C, Chowers Y, Geboes K, Mantzaris G, Reinisch W, Colombel J-F, Vermeire S, Travis S, Lindsay JO, Van Assche G. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 1: definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis* 2012;**6**:965–90 [PMID: 23040452 DOI: 10.1016/j.crohns.2012.09.003]
2. **Tibble JA**, Sigthorsson G, Bridger S, Fagerhol MK, Bjarnason I. Surrogate markers of intestinal inflammation are predictive of relapse in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2000;**119**:15–22 [PMID: 10889150]
3. **Rutter M**, Saunders B, Wilkinson K, Rumbles S, Schofield G, Kamm M, Williams C, Price A, Talbot I, Forbes A. Severity of inflammation is a risk factor for colorectal neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2004;**126**:451–9 [PMID: 14762782]
4. **Peyrin-Biroulet L**, Sandborn W, Sands BE, Reinisch W, Bemelman W et al. Selecting Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease (STRIDE): Determining Therapeutic Goals for Treat-to-Target. *Am J Gastroenterol*. 2015 Sep;**110**(9):1324–38. [PMID: 26303131]
5. **Kiesslich R**, Goetz M, Neurath MF. Virtual histology. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2008;**22**:883–97 [PMID: 18790437 DOI: 10.1016/j.bpg.2008.05.003]
6. **Kiesslich R**, Burg J, Vieth M, Gnaendiger J, Enders M, Delaney P, Polglase A, McLaren W, Janell D, Thomas S, Nafe B, Galle PR, Neurath MF. Confocal laser endoscopy for diagnosing intraepithelial neoplasias and colorectal cancer in vivo. *Gastroenterology* 2004;**127**:706–13 [PMID: 15362025]
7. **Mascolo M**, Staibano S, Ilardi G, Siano M, Vecchione ML, Esposito D, De Rosa G, De Palma GD. Probe-based confocal laser endomicroscopy evaluation of colon preneoplastic lesions, with particular attention to the aberrant crypt foci, and comparative assessment with histological features obtained by conventional endoscopy. *Gastroenterol Res Pract* 2012;**2012**:645173 [PMID: 22566999 DOI: 10.1155/2012/645173]
8. **De Palma GD**, Staibano S, Siciliano S, Persico M, Masone S, Maione F, Siano M, Mascolo M, Esposito D, Salvatori F, Persico G. In vivo characterisation of superficial colorectal neoplastic lesions with high-resolution probe-based confocal laser endomicroscopy in combination with video-mosaicing: a feasibility study to enhance routine endoscopy. *Dig Liver Dis* 2010;**42**:791–7 [PMID: 20409761 DOI: 10.1016/j.dld.2010.03.009]
9. **De Palma GD**, Maione F, Esposito D, Luglio G, Giglio MC, Siciliano S, Gennarelli N, Cassese G, Campione S, D'Armiento FP, Bucci L. In vivo assessment of tumour angiogenesis in colorectal cancer: the role of confocal laser endomicroscopy. *Colorectal Dis* 2016;**18**:O66–73 [PMID: 26589643 DOI: 10.1111/codi.13222]
10. **Tontini GE**, Mudter J, Vieth M, Atreya R, Günther C, Zopf Y, Wildner D, Kiesslich R, Vecchi M, Neurath MF, Neumann H. Confocal laser endomicroscopy for the differential diagnosis of ulcerative colitis and Crohn's disease: a pilot study. *Endoscopy* 2015;**47**:437–43 [PMID: 25521573 DOI: 10.1055/s-0034-1391226]
11. **Rispo A**, Castiglione F, Staibano S, Esposito D, Maione F, Siano M, Salvatori F, Masone S, Persico M, De Palma GD. Diagnostic accuracy of confocal laser endomicroscopy in diagnosing dysplasia in patients affected by long-standing ulcerative colitis. *World J Gastrointest Endosc* 2012;**4**:414–20 [PMID: 23125900 DOI: 10.4253/wjge.v4.i9.414]
12. **van den Broek FJC**, van Es JA, van Eeden S, Stokkers PCF, Ponsioen CY, Reitsma JB, Fockens P, Dekker E. Pilot study of probe-based confocal laser endomicroscopy during colonoscopic surveillance of patients with longstanding ulcerative colitis. *Endoscopy* 2011;**43**:116–22 [PMID: 21165821 DOI: 10.1055/s-0030-1255954]

13. **Kiesslich R**, Goetz M, Vieth M, Galle PR, Neurath MF. Confocal laser endomicroscopy. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2005;**15**:715–31 [PMID: 16278135 DOI: 10.1016/j.giec.2005.08.010]
14. **Hurlstone DP**, Thomson M, Brown S, Tiffin N, Cross SS, Hunter MD. Confocal endomicroscopy in ulcerative colitis: differentiating dysplasia-associated lesional mass and adenoma-like mass. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007;**5**:1235–41 [PMID: 17690019 DOI: 10.1016/j.cgh.2007.06.003]
15. **De Palma GD**, Staibano S, Siciliano S, Maione F, Siano M, Esposito D, Persico G. In-vivo characterization of DALM in ulcerative colitis with high-resolution probe-based confocal laser endomicroscopy. *World J Gastroenterol* 2011;**17**:677–80 [PMID: 21350720 DOI: 10.3748/wjg.v17.i5.677]
16. **De Palma GD**. Confocal laser endomicroscopy in the ‘in vivo’ histological diagnosis of the gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol* 2009;**15**:5770–5 [PMID: 19998496] 17. **Travis SPL**, Schnell D, Krzeski P, Abreu MT, Altman DG, Colombel J-F, Feagan BG, Hanauer SB, Lichtenstein GR, Marteau PR, Reinisch W, Sands BE, Yacyshyn BR, Schnell P, Bernhardt CA, Mary J-Y, Sandborn WJ. Reliability and initial validation of the ulcerative colitis endoscopic index of severity. *Gastroenterology* 2013;**145**:987–95 [PMID: 23891974 DOI: 10.1053/j.gastro.2013.07.024]
17. Ralf **Kiesslich**, Peter R. Galle, Markus F. Neurath, *Atlas of Endomicroscopy*. Springer, 2008
18. **Samuel S**, Bruining DH, Loftus E V, Thia KT, Schroeder KW, Tremaine WJ, Faubion WA, Kane S V, Pardi DS, de Groen PC, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. Validation of the ulcerative colitis colonoscopic index of severity and its correlation with disease activity measures. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013;**11**:49–54.e1 [PMID: 22902762 DOI: 10.1016/j.cgh.2012.08.003]
19. **Daperno M**, Comberlato M, Bossa F, Biancone L. Concordance in IBD endoscopic scoring requires expertise and training: preliminary results of an ongoing IG-IBD study. *Colitis P2892013*;2013 SRC
20. **De Palma GD**, Rispo A. Confocal laser endomicroscopy in inflammatory bowel diseases: dream or reality? *World J Gastroenterol* 2013;**19**:5593–7 [PMID: 24039350 DOI: 10.3748/wjg.v19.i34.5593]
21. **Wallace MB**, Fockens P. Probe-based confocal laser endomicroscopy. *Gastroenterology* 2009;**136**:1509–13 [PMID: 19328799 DOI: 10.1053/j.gastro.2009.03.034]
22. **Watanabe O**, Ando T, Maeda O, Hasegawa M, Ishikawa D, Ishiguro K, Ohmiya N, Niwa Y, Goto H. Confocal endomicroscopy in patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;**23 Suppl 2**:S286–90 [PMID: 19120913 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2008.05559.x]
23. **Li C-Q**, Xie X-J, Yu T, Gu X-M, Zuo X-L, Zhou C-J, Huang W-Q, Chen H, Li Y-Q. Classification of inflammation activity in ulcerative colitis by confocal laser endomicroscopy. *Am J Gastroenterol* 2010;**105**:1391–6 [PMID: 19935787 DOI: 10.1038/ajg.2009.664]
24. **Hassan C**, Bretthauer M, Kaminski MF, Polkowski M, Rembacken B, Saunders B, Benamouzig R, Holme O, Green S, Kuiper T, Marmo R, Omar M, Petruzzello L, Spada C, Zullo A, Dumonceau JM. Bowel preparation for colonoscopy: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) guideline. *Endoscopy* 2013;**45**:142–50 [PMID: 23335011 DOI: 10.1055/s-0032-1326186]
25. **Rutgeerts P**, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johans J, Travers S, Rachmilewitz D, Hanauer SB, Lichtenstein GR, de Villiers WJS, Present D, Sands BE, Colombel JF. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2005;**353**:2462–76 [PMID: 16339095 DOI: 10.1056/NEJMoa050516]

26. **Wallace MB**, Meining A, Canto MI, Fockens P, Miehlke S, Roesch T, Lightdale CJ, Pohl H, Carr-Locke D, Löhr M, Coron E, Filoche B, Giovannini M, Moreau J, Schmidt C, Kiesslich R. The safety of intravenous fluorescein for confocal laser endomicroscopy in the gastrointestinal tract. *Aliment Pharmacol Ther* 2010;**31**:548–52 [PMID: 20002025 DOI: 10.1111/j.1365-2036.2009.04207.x]
27. **Wallace M**, Lauwers GY, Chen Y, Dekker E, Fockens P, Sharma P, Meining A. Miami classification for probe-based confocal laser endomicroscopy. *Endoscopy* 2011;**43**:882–91 [PMID: 21818734 DOI: 10.1055/s-0030-1256632]
28. **Geboes K**, Riddell R, Ost A, Jensfelt B, Persson T, Löfberg R. A reproducible gradingscale for histological assessment of inflammation in ulcerative colitis. *Gut*. 2000 Sep;**47**(3):404–9. [PMID: 10940279]
29. **Nguyen NQ**, Leong RWL. Current application of confocal endomicroscopy in gastrointestinal disorders. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;**23**:1483–91 [PMID: 18761561 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2008.05469.x]
30. **Paramsothy S**, Leong RWL. Endoscopy: Fluorescein contrast in confocal laser endomicroscopy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;**7**:366–8 [PMID: 20606632 DOI: 10.1038/nrgastro.2010.83]
31. **Murube J**. Fluorescein: the most commonly used surfocular vital stain. *Ocul Surf* 2013;**11**:144–9 [PMID: 23838016 DOI: 10.1016/j.jtos.2013.04.003]
32. **Breidablik A**, De Pater GH, Walther C, Nopp A, Guttormsen AB. Intravenous fluorescein as a cause of immunoglobulin E-mediated anaphylactic shock. *Acta Anaesthesiol Scand* 2012;**56**:1066–8 [PMID: 22762373 DOI: 10.1111/j.1399-6576.2012.02732.x]
33. **Bregu M**, Tesha PE, Wong DT, Giavedoni LR, Altomare F, Yoganathan P, Chow DR, Romano MR. Nausea and fluorescein injection speed. *Ophthalmology* 2012;**119**:1281–1281.e1 [PMID: 22656891 DOI: 10.1016/j.ophtha.2011.12.021]
34. **Lemmens B**, Arijs I, Van Assche G, Sagaert X, Geboes K, Ferrante M, Rutgeerts P, Vermeire S, De Hertogh G. Correlation between the endoscopic and histologic score in assessing the activity of ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2013;**19**:1194–201 [PMID:23518809 DOI: 10.1097/MIB.0b013e318280e75f]
35. **Rosenberg L**, Nanda KS, Zenlea T, Gifford A, Lawlor GO, Falchuk KR, Wolf JL, Cheifetz AS, Goldsmith JD, Moss AC. Histologic markers of inflammation in patients with ulcerative colitis in clinical remission. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013;**11**:991–6 [PMID: 23591275 DOI: 10.1016/j.cgh.2013.02.030]
36. **Bessissow T**, Lemmens B, Ferrante M, Bisschops R, Van Steen K, Geboes K, Van Assche G, Vermeire S, Rutgeerts P, De Hertogh G. Prognostic value of serologic and histologic markers on clinical relapse in ulcerative colitis patients with mucosal healing. *Am J Gastroenterol* 2012;**107**:1684–92 [PMID: 23147523 DOI: 10.1038/ajg.2012.301]
37. **Salvatori F**, Siciliano S, Maione F, Esposito D, Masone S, Persico M, De Palma GD. Confocal Laser Endomicroscopy in the Study of Colonic Mucosa in IBD Patients: A Review. *Gastroenterol Res Pract* 2012;**2012**:525098 [PMID: 22474440 DOI: 10.1155/2012/525098]
38. **Rubio CA**, Johansson C, Kock Y. A quantitative method of estimating inflammation in the rectal mucosa. III. Chronic ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 1982;**17**:1083–7 [PMID:7167739]
39. **Rubio CA**, Johansson C, Uribe A, Kock Y. A quantitative method of estimating inflammation in the rectal mucosa. IV. Ulcerative colitis in remission. *Scand J Gastroenterol* 1984;**19**:525–30 [PMID: 6463576]

40. **Kiesslich R**, Duckworth CA, Moussata D, Gloeckner A, Lim LG, Goetz M, Pritchard DM, Galle PR, Neurath MF, Watson AJ. Local barrier dysfunction identified by confocal laser endomicroscopy predicts relapse in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2012 Aug;61(8):1146-53. doi: 10.1136/gutjnl-2011-300695. Epub 2011 Nov 24.
41. **Gheorghe C**, Cotruta B, Iacob R, Becheanu G, Dumbrava M, Gheorghe L. Endomicroscopy for assessing mucosal healing in patients with ulcerative colitis. *J Gastrointest Liver Dis*. 2011 Dec;20(4):423-6.
42. **Laharie D**, Filippi J, Roblin X, et al. Impact of mucosal healing on long-term outcomes in ulcerative colitis treated with infliximab: a multicenter experience. *APT* 2013;37:998-1004.
43. **Colombel JF**, Rutgeerts P, Reinisch W, et al. Early mucosal healing with infliximab is associated with improved long-term clinical outcomes in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2011;141:1194-201.
44. **Ardizzone S**, Cassinotti A, Duca P, et al. Mucosal healing predicts late outcomes after the first course of corticosteroids for newly diagnosed ulcerative colitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011;9:483-9.
45. **Villanacci V**, Antonelli E, Geboes K, et al. Histological healing in inflammatory
46. **Paramsothy S**, Leong RW. Endoscopy: Fluorescein contrast in confocal laser endomicroscopy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010 Jul;7(7):366-8. doi: 10.1038/nrgastro.2010.83.
47. **Murube J**. Fluorescein: the most commonly used surfocular vital stain. *Ocul Surf*. 2013 Jul;11(3): 144-9. doi: 10.1016/j.jtos.2013.04.003. Epub 2013 May 9. Review.
48. **Breidablik A**, De Pater GH, Walther C, Nopp A, Guttormsen AB. Intravenous fluorescein as a cause of immunoglobulin E-mediated anaphylactic shock. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2012 Sep;56(8):1066-8.
49. **Bregu M**, Tesha PE, Wong DT, Giavedoni LR, Altomare F, Yoganathan P, Chow DR, Romano MR. Nausea and fluorescein injection speed. *Ophthalmology*. 2012 Jun;119(6):1281-1281
50. **Fuchs FS**, Zirlik S, Hildner K, Frieser M, Ganslmayer M, Schwarz S, Uder M, Neurath MF. Fluorescein-aided confocal laser endomicroscopy of the lung. *Respiration*. 2011;81(1):32-8. doi: 10.1159/000320365. Epub 2010 Aug 21.
51. **Hsiung PL**, Hardy J, Friedland S, Soetikno R, Du CB, Wu AP, Sahbaie P, Crawford JM, Lowe AW, Contag CH, Wang TD. Detection of colonic dysplasia in vivo using a targeted heptapeptide and confocal microendoscopy. *Nat Med* 2008;14:454-458.
52. **Goetz M**, Ziebart A, Foersch S, Vieth M, Waldner MJ, Delaney P, Galle PR, Neurath MF, Kiesslich R. In vivo molecular imaging of colorectal cancer with confocal endomicroscopy by targeting epidermal growth factor receptor. *Gastroenterology* 2010;138:435-446.
53. **Foersch S**, Kiesslich R, Waldner MJ, Delaney P, Galle PR, Neurath MF, Goetz M. Molecular imaging of VEGF in gastrointestinal cancer in vivo using confocal laser endomicroscopy. *Gut* 2010;59:1046-1055.
54. **Gheonea DI**, Cârțână T, Ciurea T, Popescu C, Bădărău A, Săftoiu A. , Confocal laser endomicroscopy and immunoendoscopy for real-time assessment of vascularization in gastrointestinal malignancies. *World J Gastroenterol* 2011; 17(1): 21-27

55. **Chu CQ.** Molecular probing of **TNF**: From identification of therapeutic target to guidance of therapy in inflammatory diseases. *Cytokine*. 2016 Sep 12. pii: S1043-4666(16)30474-4. doi: 10.1016/j.cyto.2016.08.020. [Epub ahead of print]
56. **Atreya R,** Neumann H, Neufert C, Waldner MJ, Billmeier U, Zopf Y, Willma M, App C, Münster T, Kessler H, Maas S, Gebhardt B, Heimke-Brinck R, Reuter E, Dörje F, Rau TT, Uter W, Wang TD, Kiesslich R, Vieth M, Hannappel E, Neurath MF In vivo imaging using fluorescent antibodies to tumor necrosis factor predicts therapeutic response in Crohn's disease.. *Nat Med*. 2014 Mar;20(3):313-8. doi: 10.1038/nm.3462. Epub 2014 Feb 23.

## FIGURE LEGENDS:

**Figure 1.** Relazione tra diametro delle cripte alla p-CLE e Mayo score

**Figure 2.** Relazione tra la distanza inter-criptica e Mayo score

**Figure 3.** Relazione tra fuoriuscita di fluoresceina e Mayo score.

**Figure 4.** Mucosa rettale alla p-CLE di paziente in remissione di malattia per RCU. È presente una irregolare disposizione e distorsione delle cripte; cripte fuse e riduzione della quantità di goblet cells. Molti capillari sono visibili nella lamina propria.

**Figure 5.** Mucosa colica alla p-CLE di paziente con rettocolite ulcerosa in fase attiva. Presenza di spazi inter-criptici aumentati e vasi dilatati e distorti.

**Figure 6.** Mucosa colica alla p-CLE di paziente con rettocolite ulcerosa in fase attiva. Presenza di cripte ingrandite, irregolari con presenza di fluoresceina nel lume ghiandolare, con epitelio parzialmente conservato.

**Figure 7.** Immagine microscopica (haematoxylin-eosin stain) illustrante una mucosa normale senza segni di infiammazione (Geboes 0). Ingrandimento 200x.

**Figure 8 a, b.** Immagine microscopica (haematoxylin-eosin stain) illustrante una mucosa con infiltrato infiammatorio cronico (Geboes 1). **8a:** 106x; **8b:** 200x.

**Figure 9.** Immagine microscopica (haematoxylin-eosin stain) illustrante una mucosa con infiltrazione di neutrofili and eosinofili nella lamina propria (Geboes 2). 200x.

**Figure 10.** Immagine Microscopica (haematoxylin-eosin stain) illustrante una mucosa con infiltrazione di neutrofili nell'epitelio (Geboes 3). 200 x.

**Figure 11.** Immagine Microscopica (haematoxylin-eosin stain) che mostra la distruzione delle cripte (Geboes 4). **11a:** 40x ; **11b:** 200x.

**Figure 12.** Immagine Microscopica (haematoxylin-eosin stain) che mostra erosioni e ulcerazioni mucosali (Geboes 5). **12a:** 106x. **12b:** 200x.

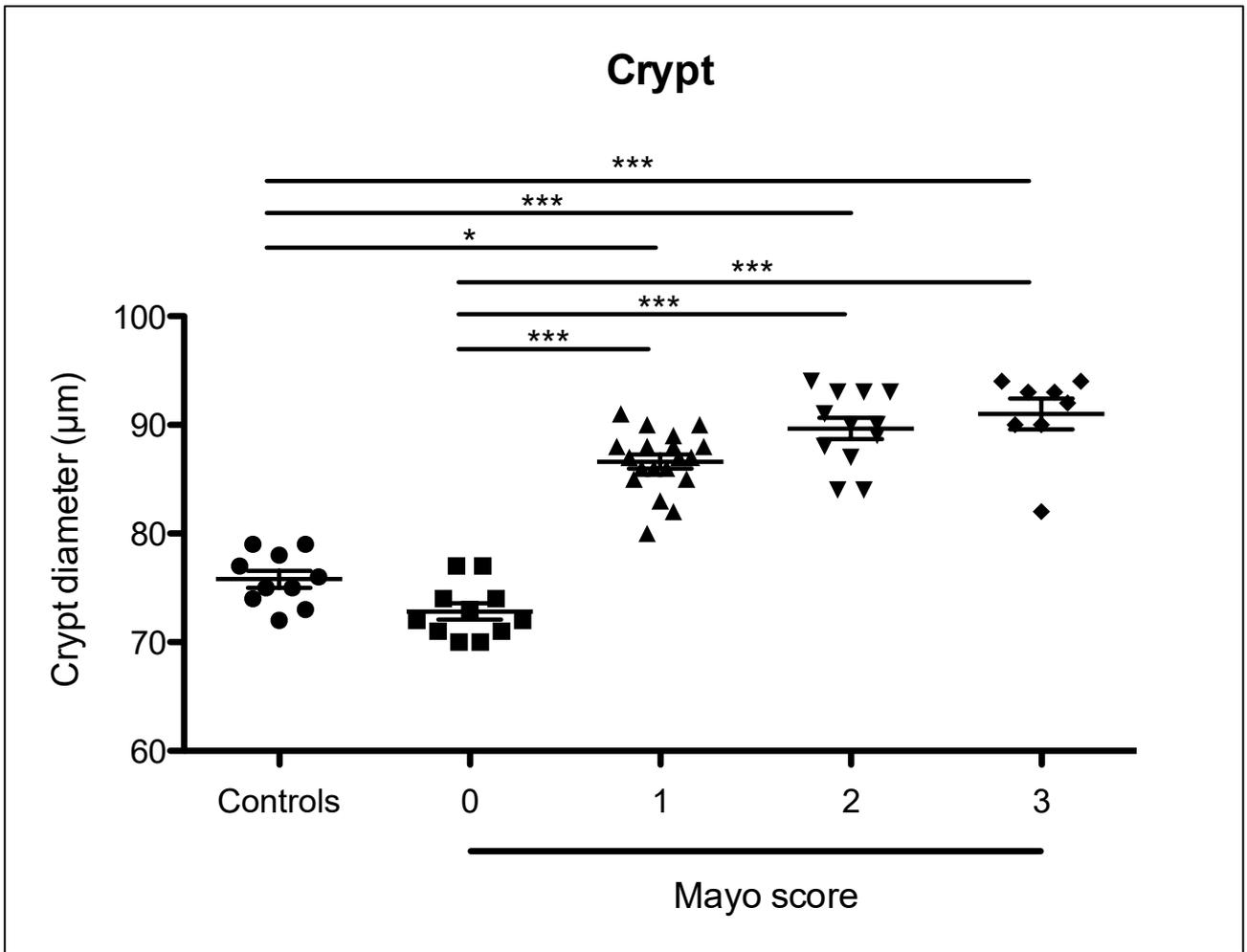
**Figure 13.** Endomicroscopio Laser Confocale: A) eCLE; B) pCLE.

**Figure 14:** meccanismo dell' endomicroscopia laser confocale

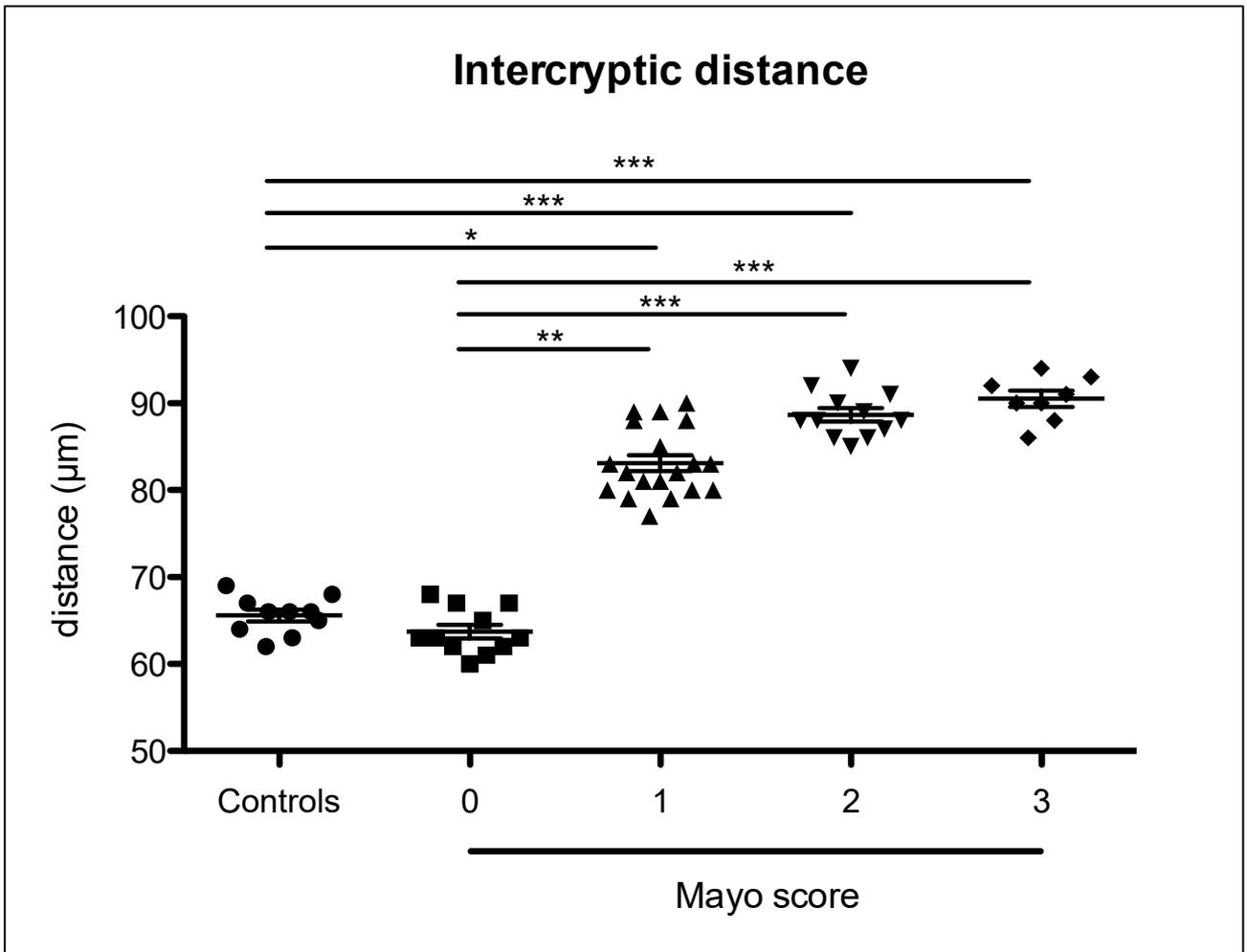
**Figure 15:** Sistema pCLE.

Mayo Score	Fluorescein Leak	Crypt diameter ( $\mu\text{m}$ )	Intercrypt distance ( $\mu\text{m}$ )
0	2/11 (18,18%)	72,82um(70-77um)	63,73 (60-68)
1	7/19 (36,84%)	86,63 (80-91)	83,1 (77-90)
2	11/12 (91,66%)	89,66 (84-94)	88,66 (85-94)
3	8/8 (100%)	91 (82-94)	90,5 (88-94)

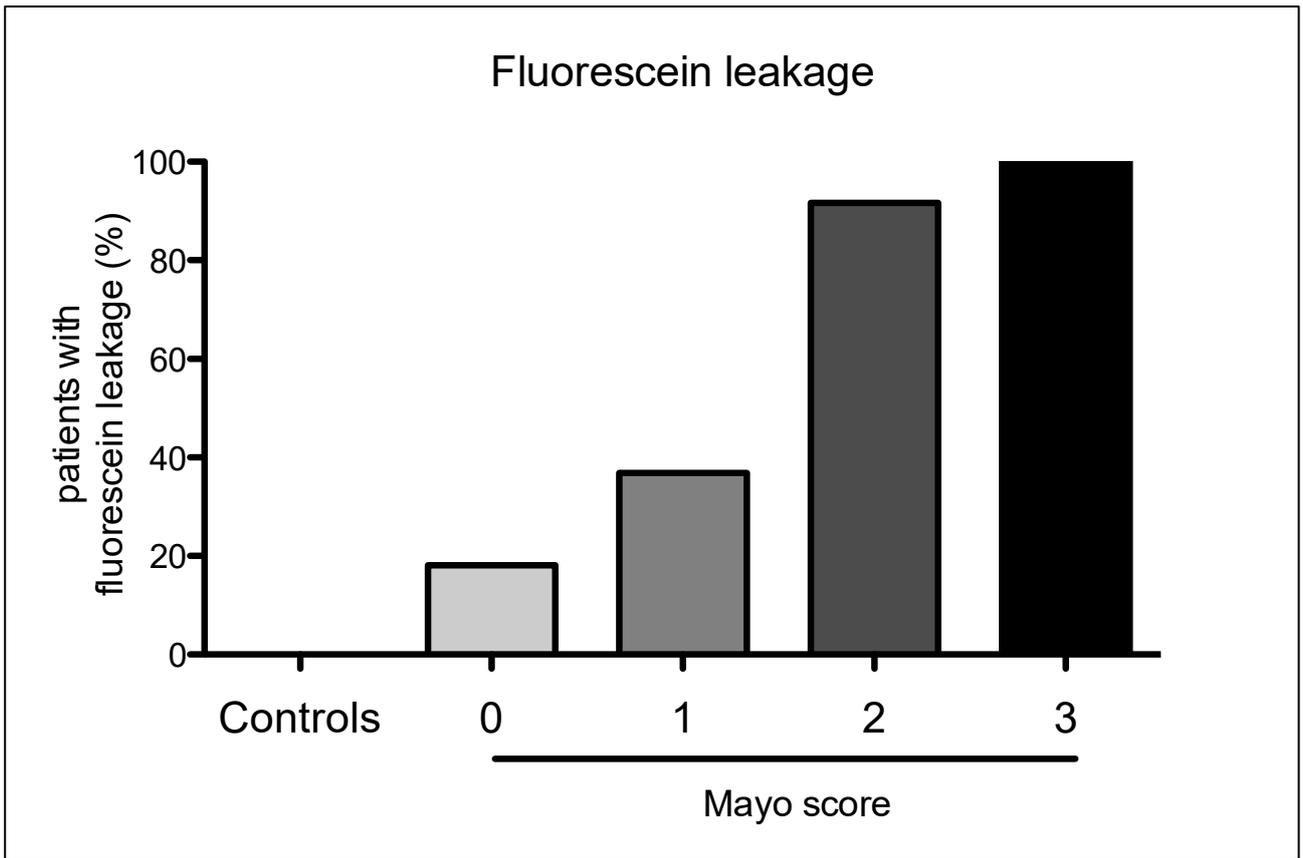
**Table 1.** Morphological CLE aspects of colonic mucosa according to the Mayo score.



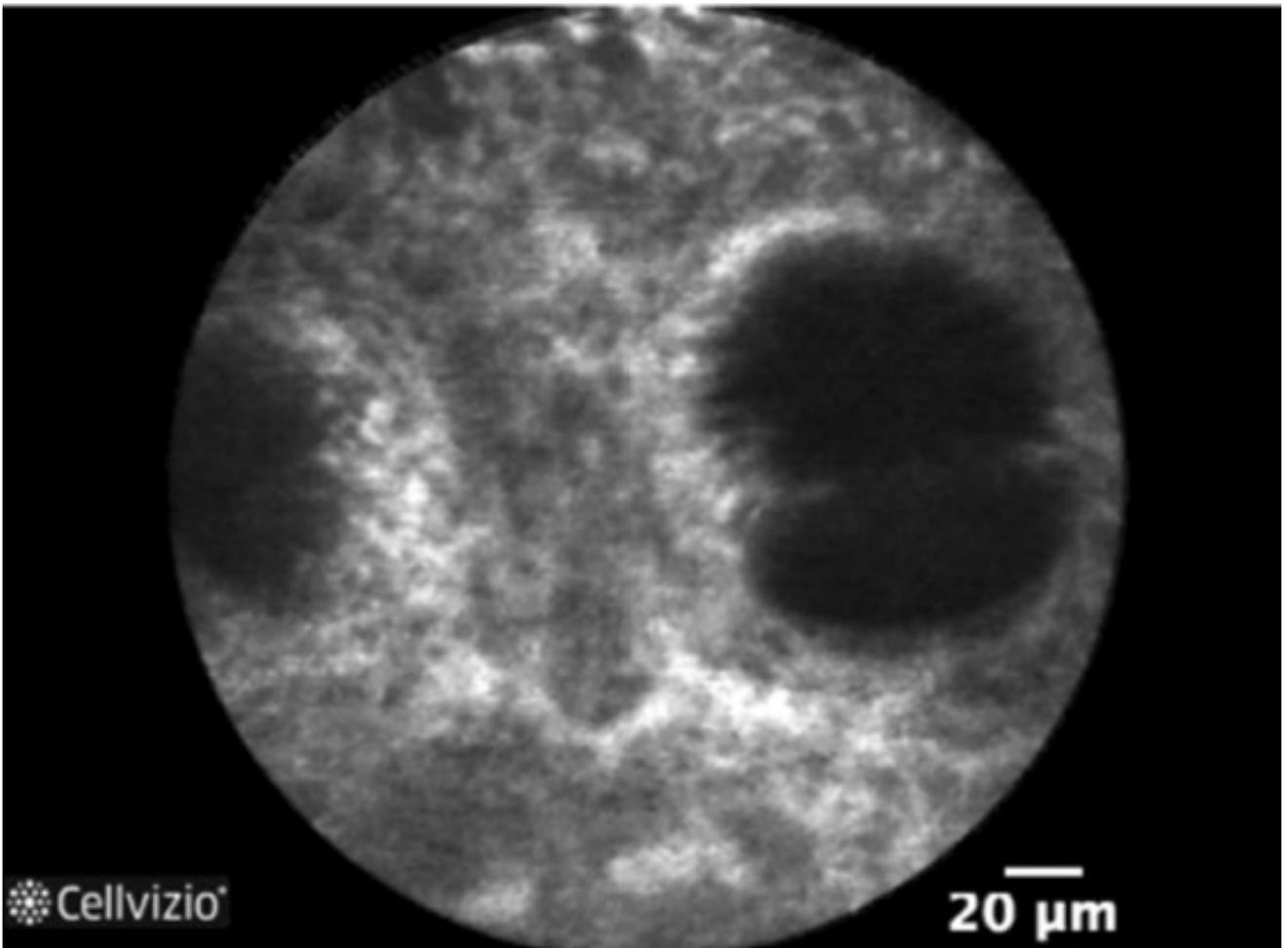
**Figure 1.** Relationship between *crypt diameter* at CLE and Mayo score



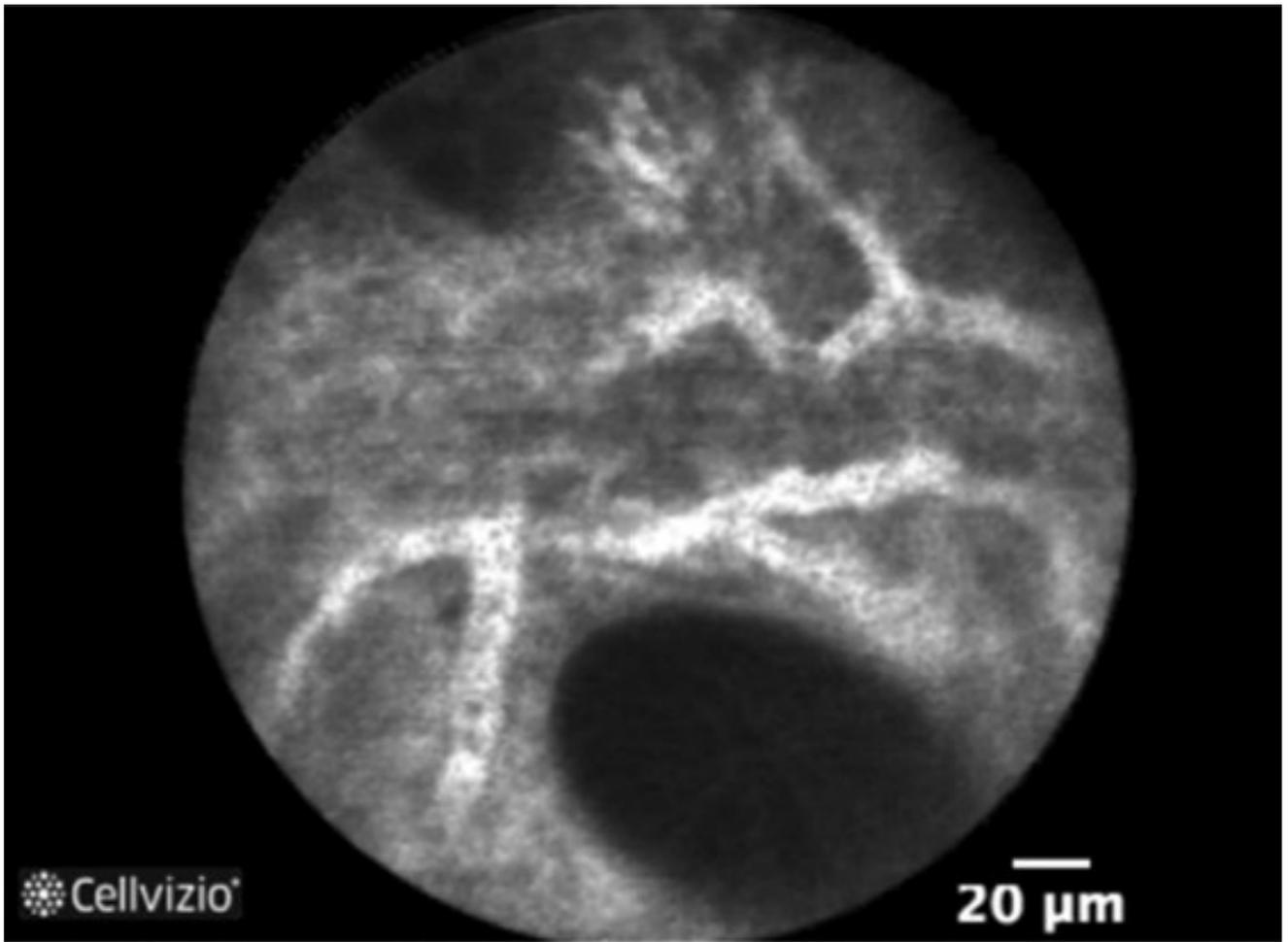
**Figure 2.** Relationships between CLE-measured *intercryptic distance* and Mayo score



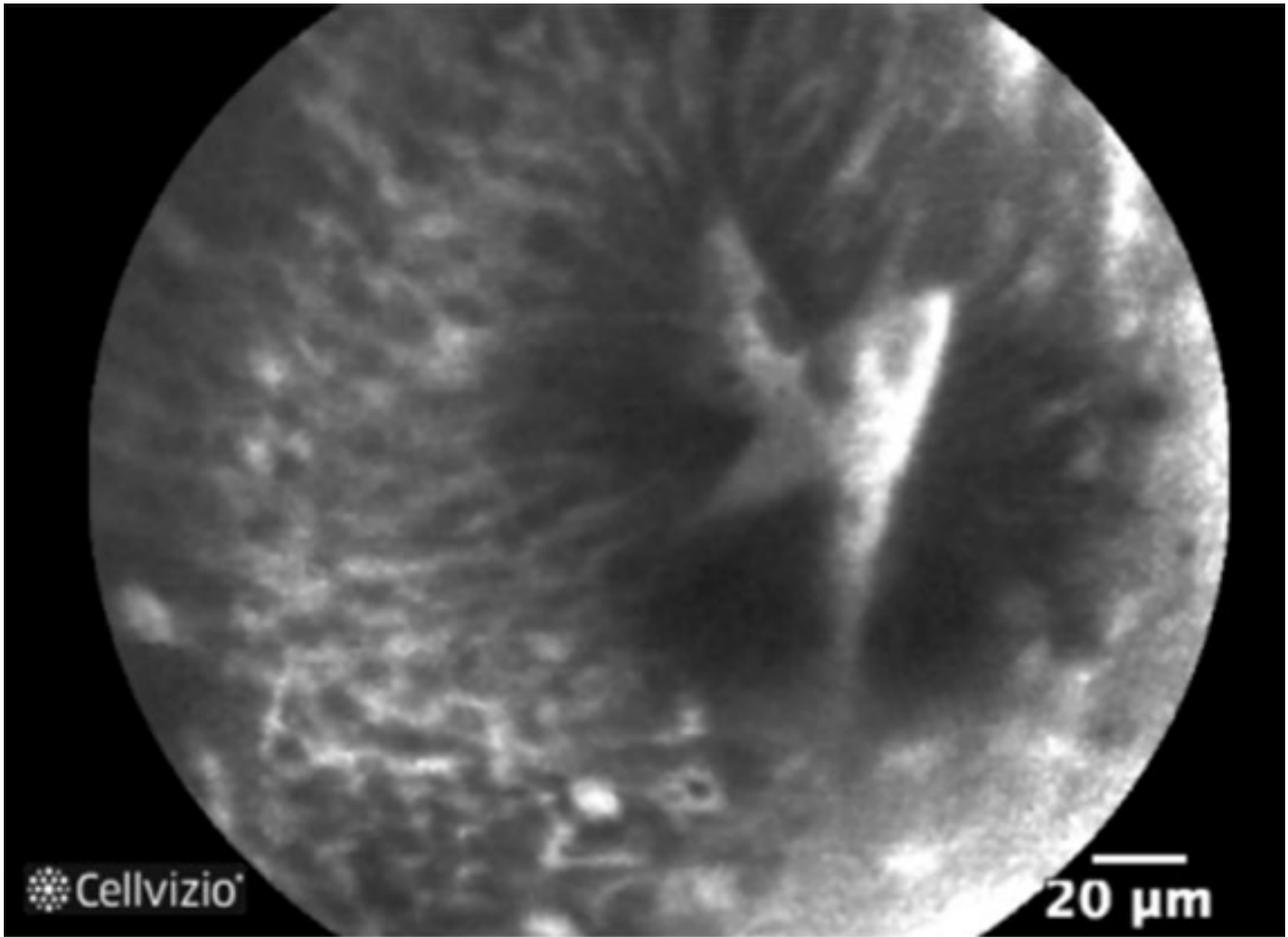
**Figure 3.** Relationships between *fluorescein leakage* and Mayo score.



**Figure 4.** p-CLE imaging of rectal mucosa of patient in remission from ulcerative colitis showing irregular alignment of crypt, crypt distortion and fusion, with reduced amount of goblet cells. Many capillaries are visible in the lamina propria.



**Figure 5.** p-CLE imaging of colonic mucosa of patient with acute ulcerative colitis showing enlarged spaces between crypts and dilated prominent branching vessels.



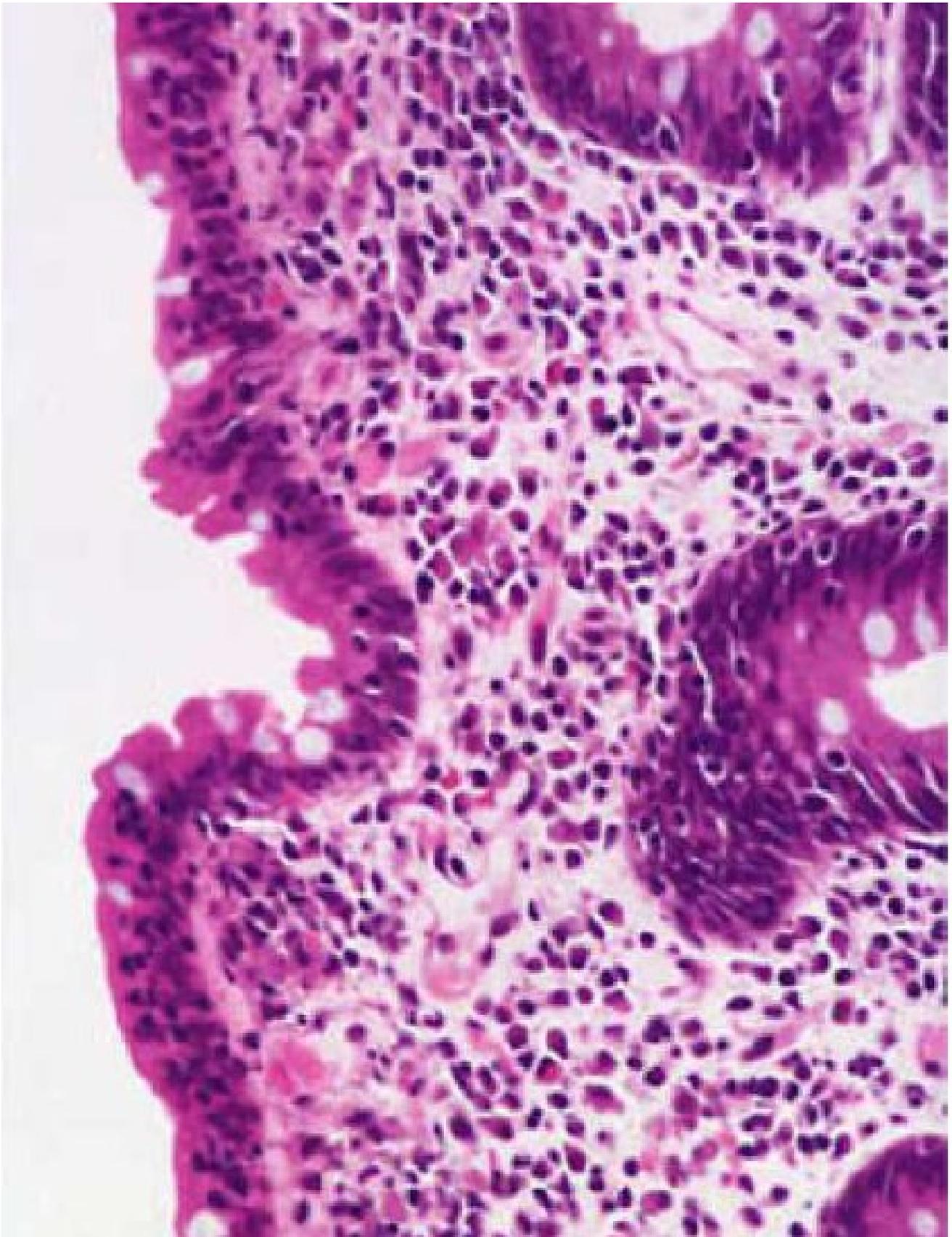
**Figure 6.** p-CLE imaging of colonic mucosa of patient with acute ulcerative colitis showing dilated, irregular and bright crypt lumen (fluorescein leakage) with partially intact epithelium



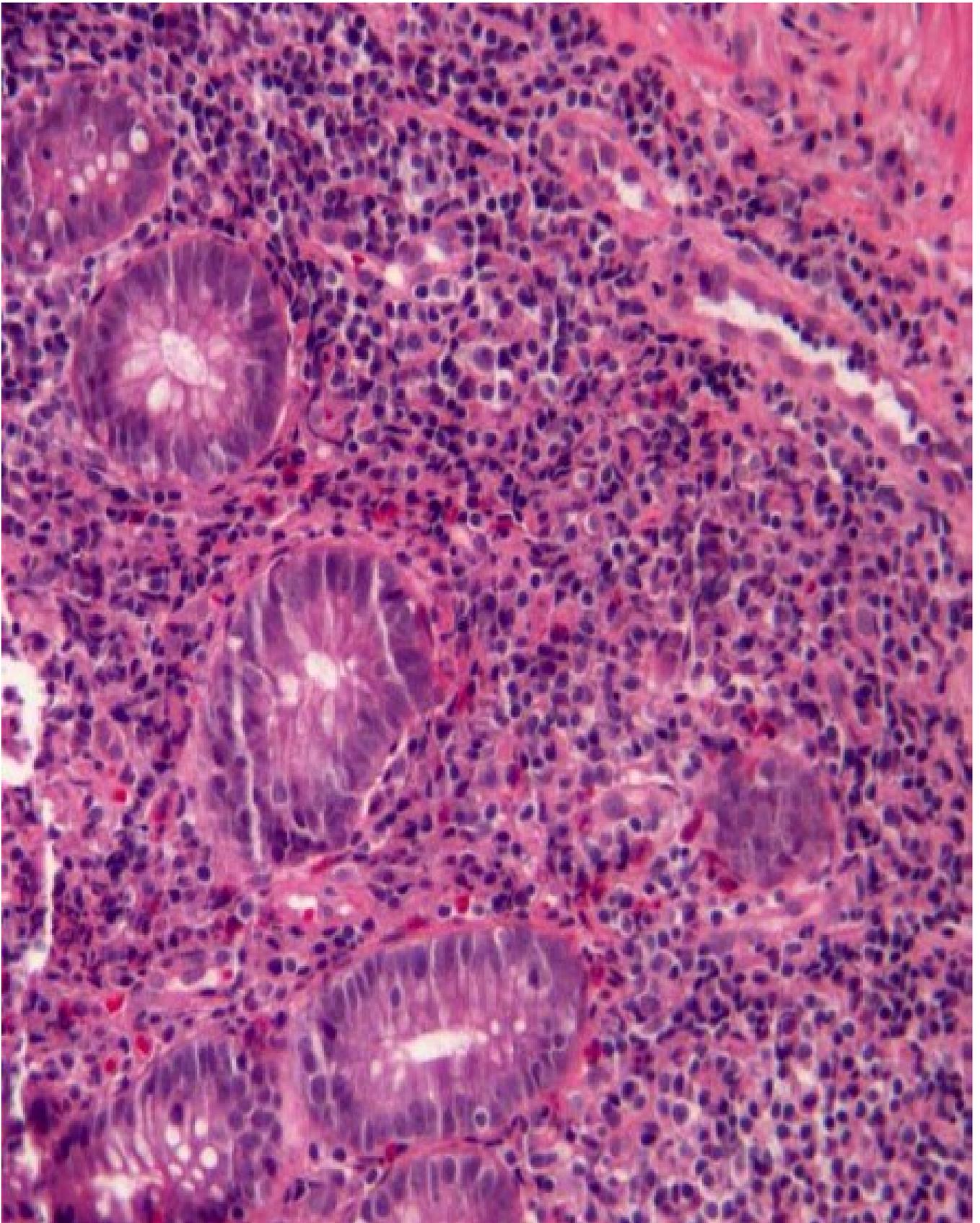
**Figure 7.** Microscopic photograph (haematoxylin-eosin stain) illustrating a normal mucosa with no sign of active inflammation (Geboes 0). 200x magnification.



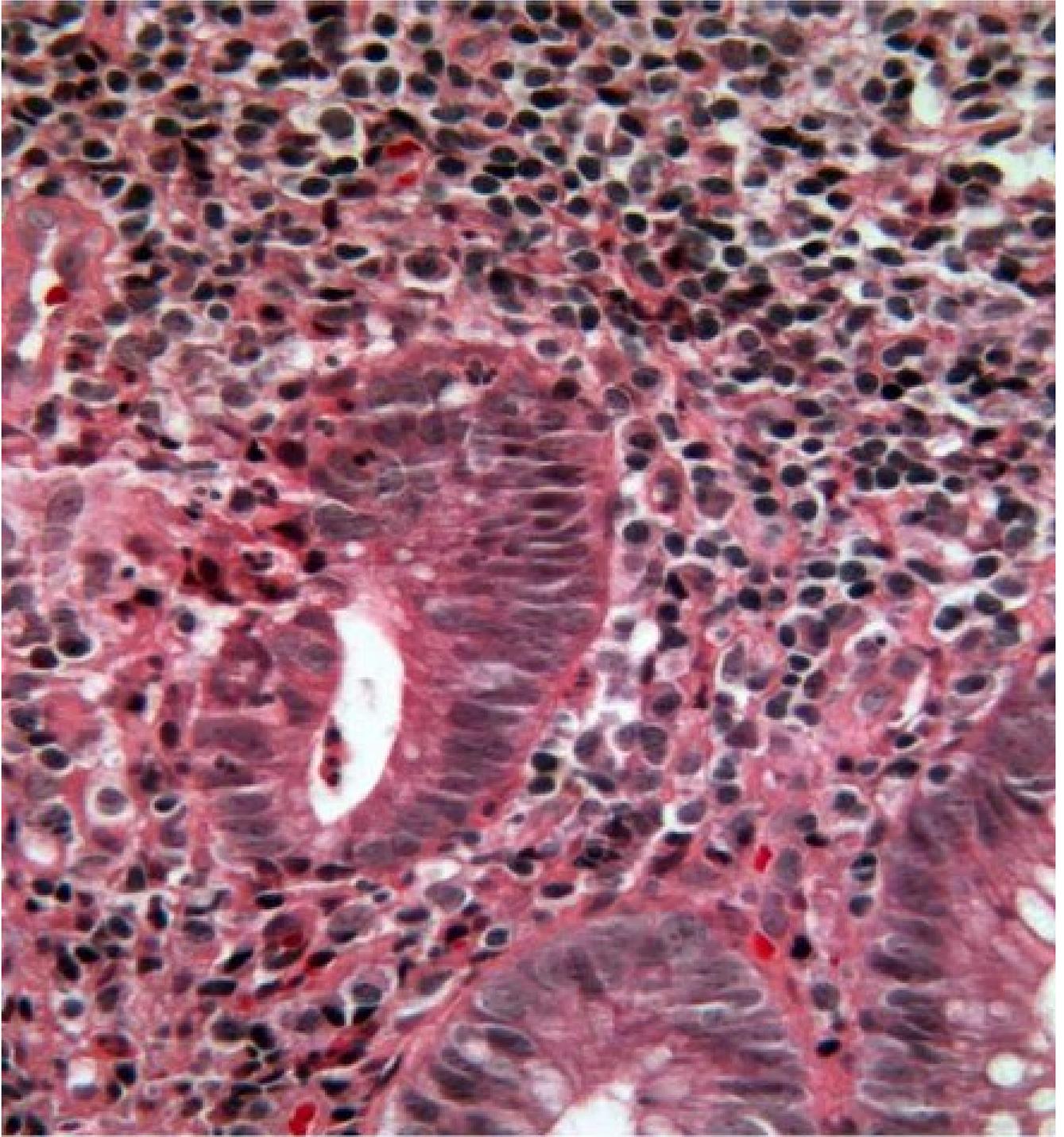
**Figure 8 a,** Microscopic photographs (haematoxylin-eosin stain) illustrating a chronic inflammatory infiltrate (Geboes 1). : 106 x magnification;



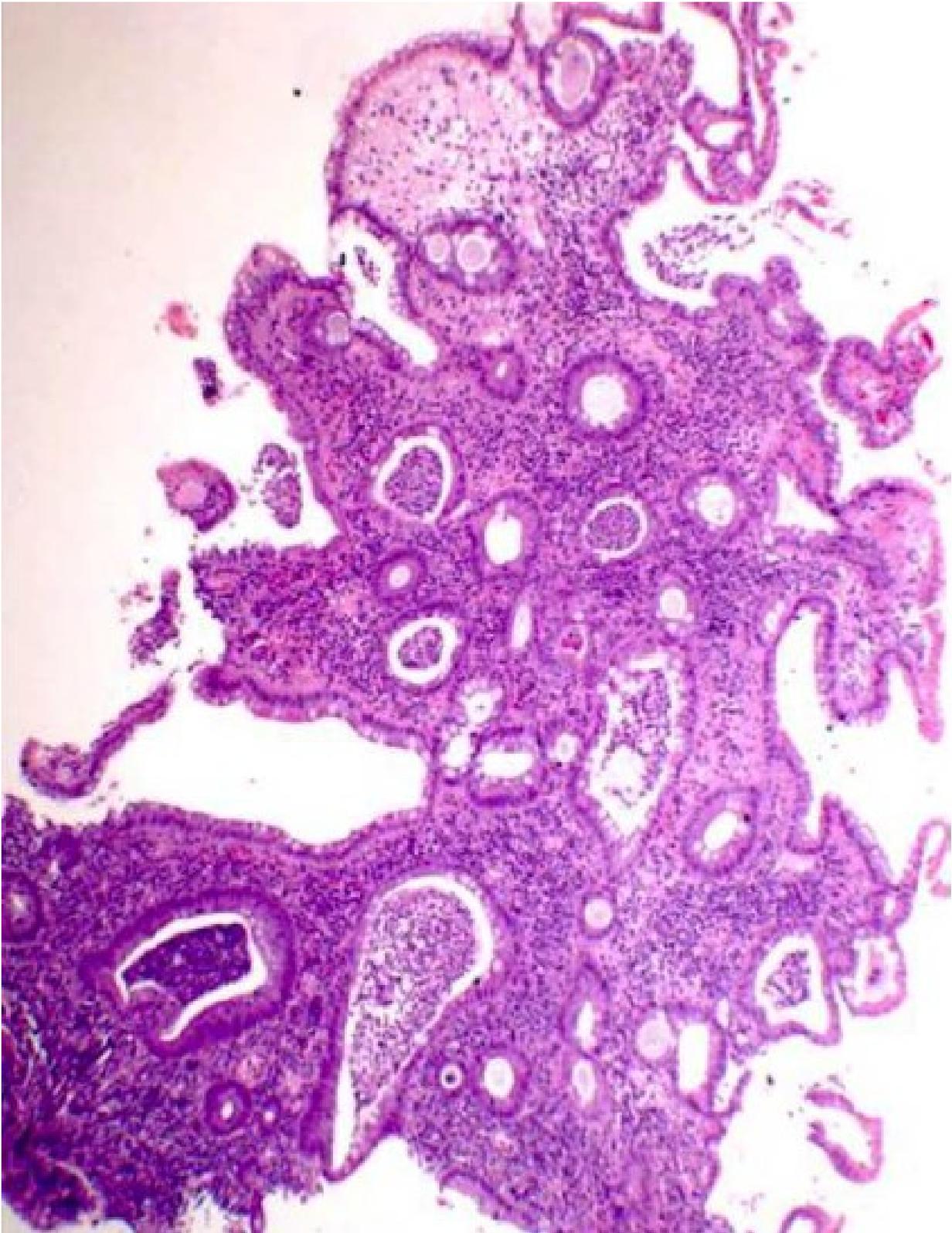
**Figure 8 b.** Microscopic photographs (haematoxylin-eosin stain) illustrating a chronic inflammatory infiltrate (Geboes 1). : 200x magnification



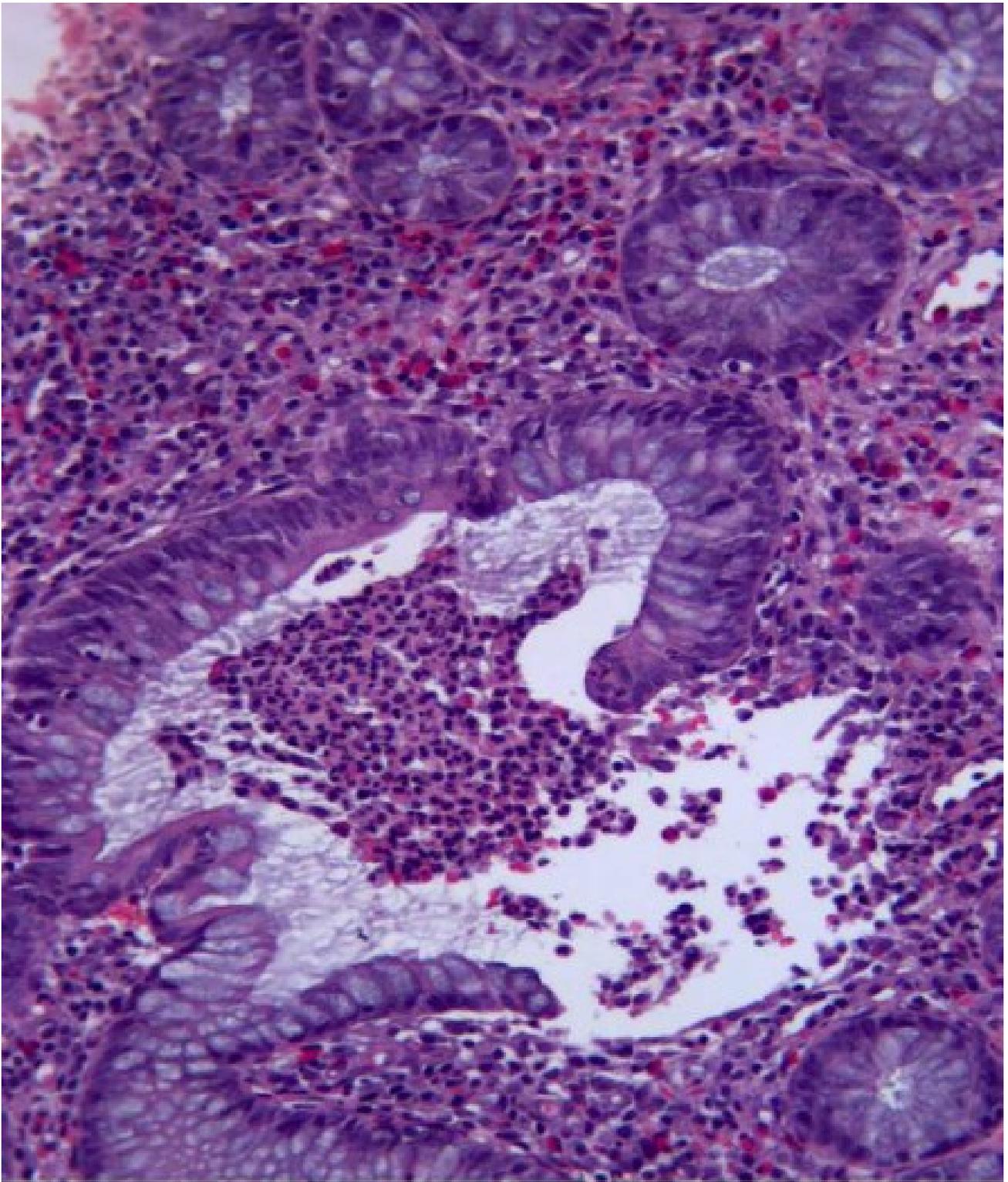
**Figure 9.** Microscopic photograph (haematoxylin-eosin stain) illustrating neutrophils and eosinophils infiltrating the lamina propria (Geboes 2). 200x magnification



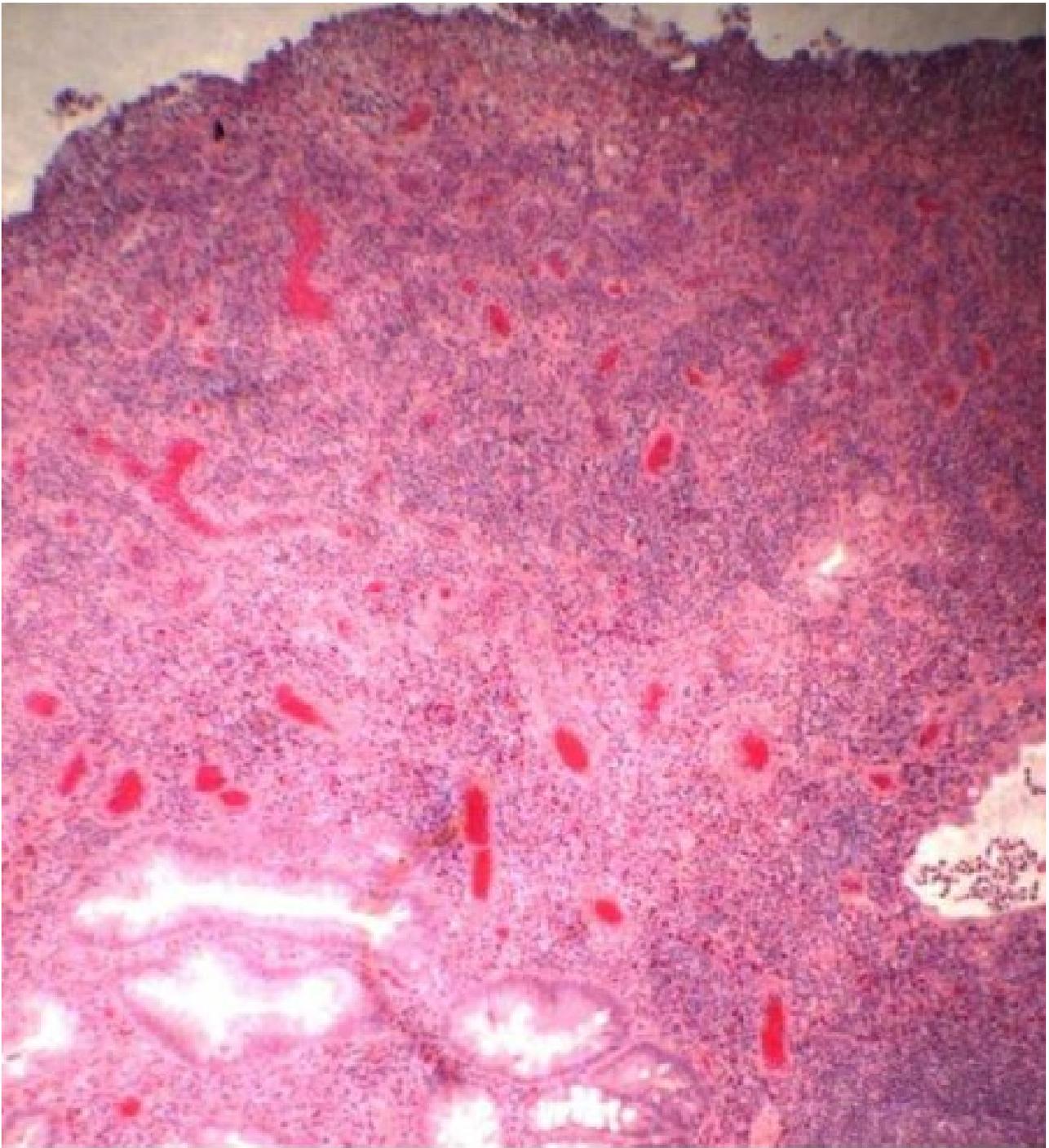
**Figure 10.** Microscopic photograph (haematoxylin-eosin stain) illustrating neutrophils in the epithelium (Geboes 3). 200 x magnification



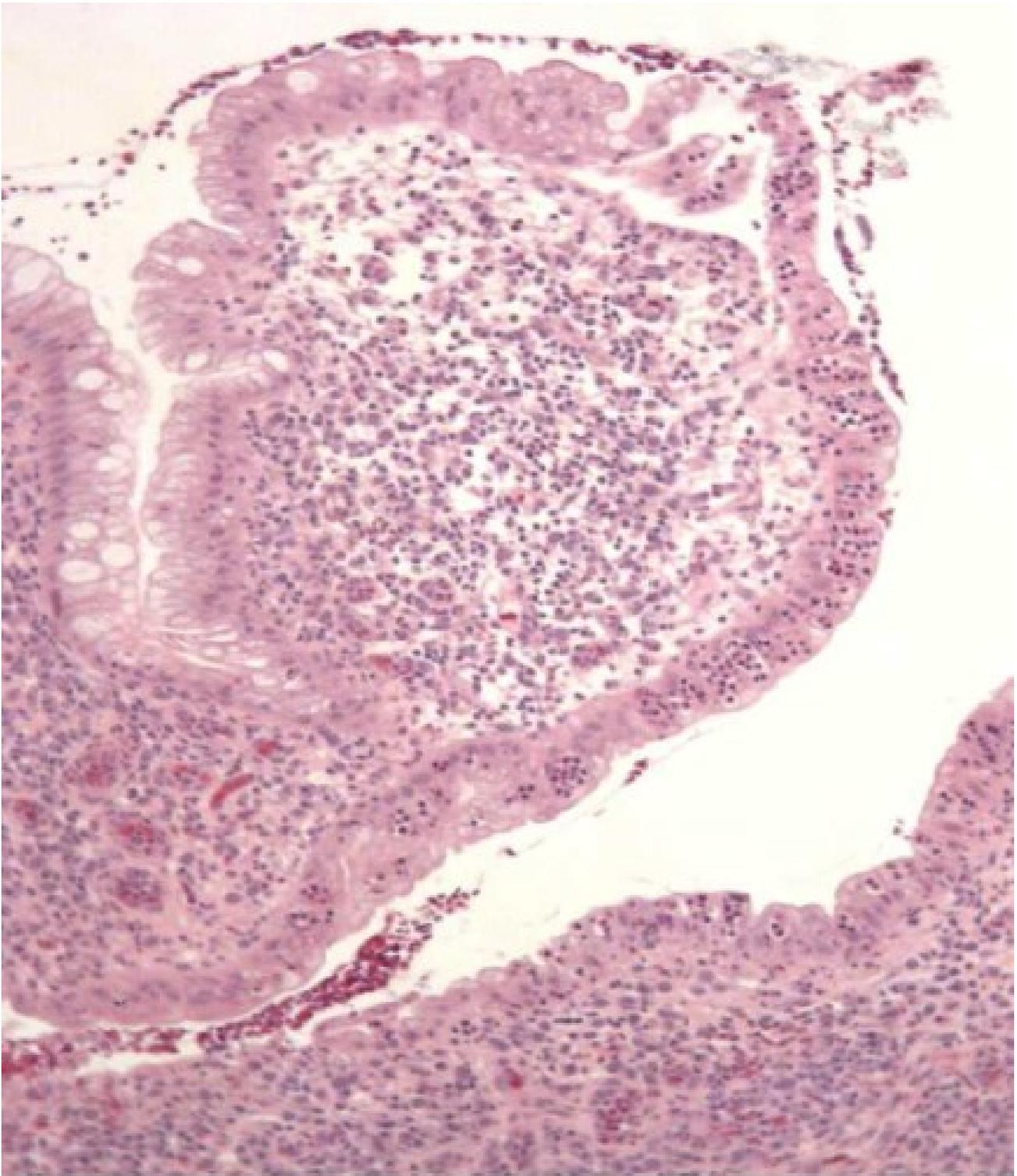
**Figure 11a.** Microscopic photographs (haematoxylin-eosin stain) showing crypt destruction (Geboes 4). 40x magnification;



**Figure 11b.** Microscopic photographs (haematoxylin-eosin stain) showing crypt destruction (Geboes 4): 200x magnification



**Figure 12a.** Microscopic photographs (haematoxylin-eosin stain) showing mucosal erosions and ulcerations (Geboes 5). : 106x magnification..



**Figure 12b.** Microscopic photographs (haematoxylin-eosin stain) showing mucosal erosions and ulcerations (Geboes 5).: 200x magnification.

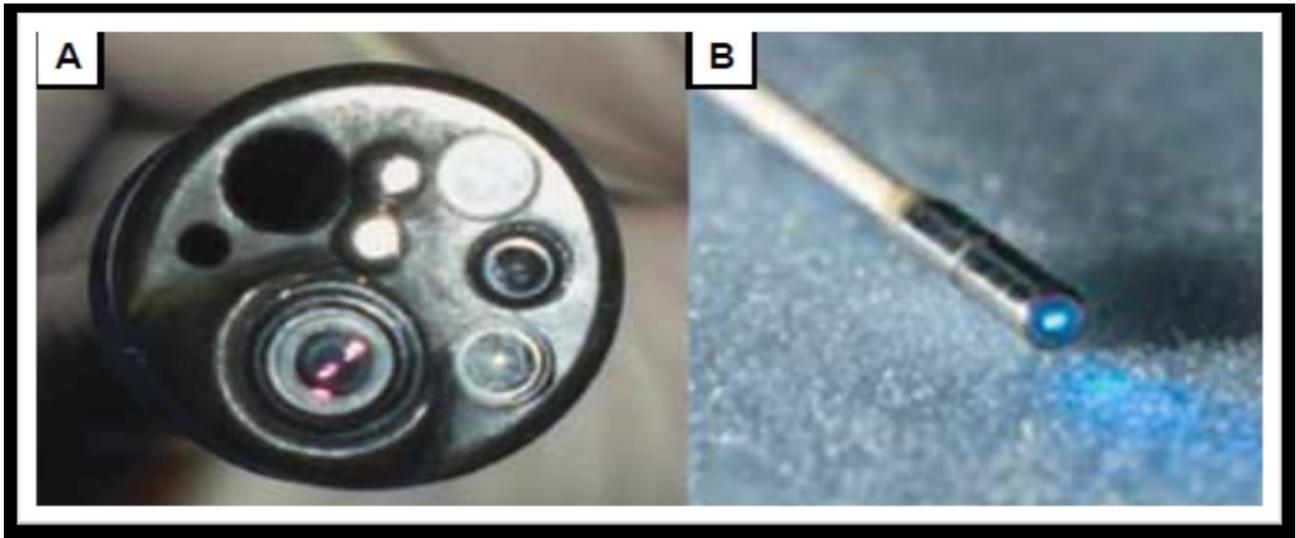


Figure 13. Confocal laser endomicroscopy: A) eCLE; B) pCLE.

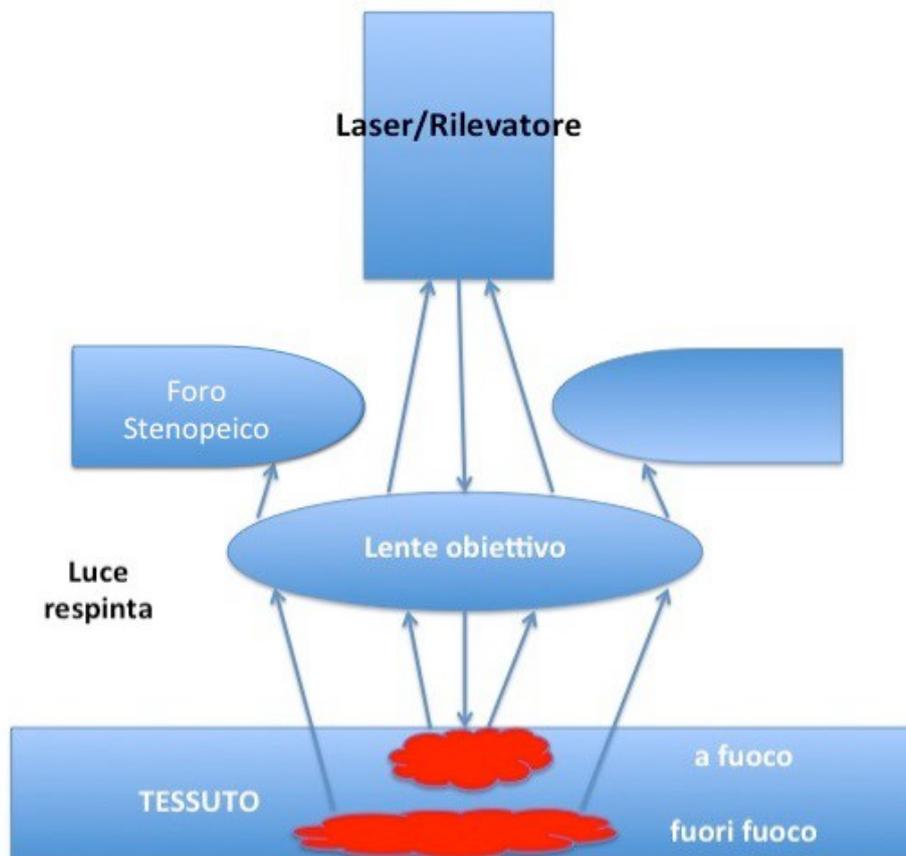


Figure 14: mechanism of confocal laser microscopy



Figure 15: pCLE system