

Università degli studi di Napoli Federico II



Dottorato di Ricerca in TERAPIE AVANZATE BIOMEDICHE E CHIRURGICHE

XXXI Ciclo

Titolo

L'utilizzo di un eptapeptide marcato con fluoresceina per l'identificazione della displasia colica , in pazienti affetti da rettocolite ulcerosa: studio pilota

Relatore

Chiar.mo Prof.

Giovanni Domenico De Palma

Candidato

Dott. Pietro Schettino

Triennio accademico 2015 - 2018

Studio pilota di fattibilità diagnostica, interventistico, non-farmacologico, monocentrico

Popolazione in studio: Pazienti di età superiore a 18 anni affetti da colite ulcerosa

Ricercatore Principale:

Prof. Giovanni D. de Palma, Professore Ordinario di Chirurgia Generale, Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia, Università degli Studi di Napoli "Federico II".

Altri Ricercatori:

Prof. Franco Salvatore, Direttore e Coordinatore scientifico del CEINGE - Biotecnologie Avanzate s.c. a r.l.

Dott.ssa Irene Colavita, ricercatore presso il CEINGE

Dott. Pietro Schettino, dottorando di ricerca, Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia, Università degli Studi di Napoli "Federico II".

Dipartimento o Istituto:

Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia

Università degli Studi di Napoli "Federico II", Via S. Pansini ,5, edificio 1, 80131 Napoli, Italia.

Centro di eccellenza per l'Innovazione Tecnologica in Chirurgia ITC

Università degli Studi di Napoli "Federico II", Via S. Pansini ,5, edificio 6, 80131 Napoli, Italia.

CEINGE - Biotecnologie Avanzate s.c. a r.l.

Via Gaetano Salvatore, 486, 80145 Napoli, Italia

INDICE

Premesse scientifiche e razionali dello studio	1
Scopo dello studio	3
Materiali e Metodi	4
Risultati	9
Discussione	10
Tabelle	12
Figure e legenda	13
Abstract in inglese	16
Bibliografia	17

Premesse scientifiche e razionale dello studio

All'incirca l'1-4% dei carcinomi del colon-retto insorgono in corso di malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI: rettocolite ulcerosa e Malattia di Crohn). La comparsa del cancro, in corso di MICI, è generalmente preceduta dall'insorgenza di displasia epiteliale.

Al momento sono stati identificati tre distinti pathway molecolari nella patogenesi del cancro coloretale, l'instabilità cromosomiale, l'instabilità dei microsatelliti e il pathway del fenotipo metilatore delle isole CpG. Il pathway di sviluppo della maggioranza dei carcinomi sporadici o, comunque, insorti su colon sano, segue il pathway dell'instabilità cromosomiale mentre lo sviluppo del carcinoma associato a colite ulcerosa segue il pathway dell'instabilità dei microsatelliti.

Esistono dati in letteratura che suggeriscono che l'esecuzione di colonscopie di controllo, in pazienti affetti da Rettocolite Ulcerosa (RCU), riduca il rischio di sviluppo di cancro coloretale (CRC) e ne migliori la prognosi. Le più recenti linee guida consigliano, l'esecuzione di una colonscopia annuale a partire da 8-10 anni dall'esordio della sintomatologia, (Colite ulcerosa *long standing*), per la ricerca della displasia.

Le linee guida validate raccomandano un esteso campionamento biotico (consistente almeno 32 biopsie random, oltre alla biopsia di ogni area sospetta)² durante le colonscopie di controllo per RCU, a partire dall'8-10 anno di malattia.

Sono stati recentemente proposti nuovi protocolli di campionamento biotico, in corso di colonscopia, tesi a ridurre il numero di biopsie necessarie, senza comprometterne la sensibilità; il più diffuso, in questo senso, è quello che utilizza la colorazione perendoscopica dell'intera mucosa del colon (pancromoendoscopia) praticata con indaco di carminio o blu di metilene, coloranti in grado di evidenziare aree da sottoporre a biopsie, poiché, con una certa frequenza le aree discromiche risultano displastiche.

Non sono state riscontrate differenze tra i due coloranti in termini di resa diagnostica.

La displasia, in corso di MICI, viene classificata in **displasia visibile** (polipoide: pedunculata o sessile; non-polipoide: rilevata, piatta o depressa) e **displasia non visibile** (identificata su biopsie random).

La metodica della pan-cromoendoscopia, associata all'utilizzo di endoscopi ad alta definizione, sembra sufficiente per la ricerca e la diagnosi di displasia. L'esecuzione delle biopsie random, oltre alle biopsie mirate, non sembra aggiungere molto al potenziale diagnostico.

È attualmente accettato che la resezione endoscopica seguita da stretto follow-up di tutte le lesioni sospette o diagnosticate per displasia e che siano endoscopicamente resecabili (con margini netti rispetto al tessuto circostante) sia un trattamento adeguato. L'assenza di displasia sui margini dovrebbe essere confermata da biopsie praticate sul tessuto ai margini della lesione.

La presenza di displasia non visibile, invece, dovrebbe essere confermata da un patologo esperto e la colonscopia ripetuta eventualmente in un centro attrezzato con strumentazione endoscopica di

ultima generazione (alta definizione e cromoendoscopia)².

Il trattamento per la displasia non visibile, così come per i pazienti con displasia endoscopicamente resecabile che scelgono di non sottoporsi allo stretto follow-up, rimane l'intervento chirurgico di colectomia totale.

L'endomicroscopia laser confocale (CLE) è una metodica ancora poco diffusa ma che si è dimostrata in grado di diagnosticare la presenza tanto di displasia quanto di neoplasia avanzata sul tratto digerente, sia in caso di adenomi sporadici, sia in caso di neoplasia insorte in corso di malattie infiammatorie croniche (IBD).

L'impiego della CLE, fino ad ora, ha sempre, però, richiesto la somministrazione endovenosa di fluoresceina sodica, con il rischio di (seppur rari) effetti collaterali sistemici¹³ quali reazioni allergiche, fino all'anafilassi.

Studi recenti hanno suggerito che alcuni biomarcatori sono in grado di evidenziare la presenza di un carcinoma o di una displasia colo-rettale; tra questi, alcuni peptidi sono quelli con le maggiori potenzialità grazie al loro basso potere immunogeno ed alla relativa facilità di produzione.

Peptidi con specifica affinità per colociti displastici sono stati identificati partendo da esperimenti su fagi in vivo. Una volta identificato un biomarker, questo può essere somministrato topicamente sulla mucosa; questa via di somministrazione è in grado di minimizzare i potenziali effetti sistemici avversi legati alla somministrazione endovenosa. È stato dimostrato che il peptide "VRPMPLQ", somministrato topicamente sulla mucosa colica, è in grado di legarsi selettivamente ad aree di displasia colica e, coniugato con fluoresceina, di rendere le aree displastiche selettivamente fluorescenti ed identificabili mediante endomicroscopia laser confocale.

Dopo somministrazione del peptide "VRPMPLQ" marcato con fluoresceina, le aree di mucosa displastica sono identificabili grazie ad un aumento della fluorescenza rispetto alle aree di mucosa normale o anche iperplastica. Nel tessuto displastico, il mezzo di contrasto fluorescente all'interno della struttura ghiandolare, la rende chiaramente distinguibile all'esame endomicroscopico; risultano ben distinguibili la morfologia delle ghiandole e dei capillari.

Il contrasto, nelle ghiandole normali o iperplastiche, si distribuisce solo all'esterno di esse e nel lume della cripta non permettendo la valutazione della morfologia ghiandolare.

In letteratura, il peptide "VRPMPLQ" è stato studiato su lesioni displastiche (polipi adenomatosi) insorte in pazienti non affetti da malattia infiammatoria cronica.

Sulla base di queste premesse appare necessario stabilire se il peptide già utilizzato su polipi adenomatosi (displasia sviluppatasi seguendo il pathway dell'instabilità cromosomica) è in grado di evidenziare con altrettanta sensibilità e specificità la displasia insorta su malattia infiammatoria cronica e sviluppatasi seguendo il pathway alternativo (instabilità dei microsatelliti).

Nello studio pilota proposto, verrà testato il peptide "VRPMPLQ" marcato con fluoresceina, per quanto riguarda la sua capacità di evidenziare la displasia insorta su RCU, somministrato ex-vivo su frammenti biotici ottenuti in corso di colonscopia di sorveglianza standard (secondo gli standard della normale pratica clinica).

Il peptide in esame potrà, in futuro, essere utilizzato come strumento aggiuntivo per la diagnosi della displasia sulle aree discromiche identificate alla cromoendoscopia al fine di ridurre ulteriormente il numero di biopsie totali.

La rapida identificazione della displasia può essere molto utile anche nel caso, ad esempio, della conferma dell'assenza di displasia sui margini di lesioni asportati, nel decision making di fronte a lesioni rilevate nel dubbio che queste siano rigenerative o displastiche (epitelio normale esuberante vs. epitelio displastico)

SCOPO DELLO STUDIO

L'obiettivo del nostro studio è stato quello di valutare la fattibilità dell'impiego del peptide "VRPMPLQ" coniugato con fluoresceina, somministrato topicamente mediante catetere spray per l'identificazione delle aree displastiche in pazienti affetti da colite ulcerosa "long standing".

Endpoint primario: Valutare la sensibilità e specificità dell'impiego dell'eptapeptide in esame nel mettere in evidenza le lesioni displastiche insorte su colite ulcerosa.

Materiali e Metodi

Criteri d'inclusione:

- Et  superiore ai 18 anni;
- Colite ulcerosa "long standing" in fase quiescente di malattia

Criteri di esclusione:

- Incapacit  a comprendere il protocollo;
- Mancanza di aderenza al consenso informato;
- Allergia nota alla fluoresceina
- Allergia nota a farmaci in genere
- Malattia in fase attiva all'endoscopia

Verranno reclutati in totale 20 pazienti

Materiali

Consumabili per l'esame endoscopico (Pan-cromoendoscopia):

- Soluzione fisiologica per infusione e diluizione coloranti
- Catererini per accesso venoso
- Farmaci per sedazione e gestione paziente: Midazolam, Flumazenil, Buscopan e vari ed eventuali a seconda delle necessit  specifiche del paziente
- Valvole di tenuta aria per endoscopia
- Caterere "Spray"
- Indaco di Carminio o Blu di Metilene in Fiale
- Pinze da biopsia e provette

Materiale utilizzato per quanto gi  previsto dalla normale pratica clinica fornito dalla Farmacia dell'AOU Policlinico Federico II

Consumabili per la sintesi del peptide:

- Fmoc(9-fluorenilmetilossicarbonile)-amminoacidi
- HOBt: 1-Hydroxybenzotriazole
- HBTU: N-[(1H-benzotriazol-1-il)(dimetilamino)metilene]-N-metilmetanammonio esafluorofosfato N-ossido
- DIPEA: Diisopropiletilammina
- PIP: Piperidina
- Resina: Rink-amide MBHA
- Ac₂O: Anidride acetica
- DMF: N,N-dimetilformammide
- DCM: diclorometano
- TFA: acido trifluoroacetico
- TIS : triisopropilsilano
- Methyl-t-Butil Etere
- ACN: acetonitrile

Materiale fornito dal ceinge

Consumabili per l'esame endoscopico:

- Fluoresceina fiale 10mg, 5 ml
- Sonde a fibra ottica per endoscopia Cellvizio

MATERIALE FORNITO DAL CEITC (ENDOMICROSCOPIO CELLVIZIO MAUNA KEA TECHNOLOGIES GIÀ IN DOTAZIONE AL CEITC)

Considerazioni etiche

I pazienti sono stati esclusi in caso di età <18 anni, rifiuto di partecipare o incapacità di fornire consenso informato scritto, ottenuto da tutti i partecipanti. Il protocollo di studio è conforme agli orientamenti etici della Dichiarazione di Helsinki del 1975 (sesta revisione, 2008) e ha è stato approvato dal ^aFederico II^o Consiglio di Revisione Istituzionale di Napoli ± Comitato Etico ^aC. Romano^o (Protocollo N.132 / 2015).

Pazienti

Tra marzo 2015 e marzo 2016, i pazienti sottoposti a colonscopia di sorveglianza *long-standing UC*. Sono state prese in considerazione per l'arruolamento pazienti con UC quiescenti all'endoscopia (Mayo Ulcerative Colitis Endoscopic Punteggio di gravità) e con lesioni endoscopicamente reseccabili nel contesto della colite ulcerosa .

Metodiche

Esami ematochimici e strumentali:

Come da comune pratica clinica normalmente prevista, a tutti i pazienti sono stati sottoposti ad esame emocromocitometrico e della coagulazione e valutazione cardiologica ed elettrocardiogramma per l' idoneità a sottoporsi ad esame endoscopico.

Valutazione anamnestica e consenso informato:

Tutti i pazienti sono stati interrogati riguardo alla sintomatologia, alle terapie attualmente in atto, alla possibilità di allergie come normalmente previsto dalla comune pratica clinica. In questa fase ai pazienti è stato somministrato il consenso informato a sottoporsi alla normale colonscopia di controllo come previsto dalle comuni norme di good practice.

In aggiunta, ai pazienti è stata richiesta la partecipazione allo studio somministrando un modulo di informativa riguardante le finalità, i rischi e le metodiche dello studio in esame.

È stato raccolto un consenso firmato aggiuntivo alla partecipazione allo studio, a coloro che accetteranno di prenderne parte.

Esame endoscopico standard (pan-cromoendoscopia):

Come da comune pratica clinica, a tutti i pazienti è stata inserita una cannula di accesso venoso, tale da poter somministrare farmaci sedativi di tipo Benzodiazepinico per il controllo dell'ansia e Flumazenil per il risveglio su richiesta dei pazienti seguendo i normali protocolli di sedazione cosciente per l'endoscopia digestiva.

In casi sporadici sono stati utilizzati farmaci vagolitici ed antispastici per il controllo della frequenza cardiaca e degli spasmi della muscolatura liscia del colon.

Sono stati utilizzati endoscopi ad alta risoluzione, Olympus CF-HQ190 o CF TYPE Q180AL / I. Dopo l'intubazione dell'ileo si è proceduto a ritirare lentamente lo strumento ed ispezionare la mucosa per individuare lesioni visibili.

Dopo aver spruzzato indaco di carminio o blu di metilene, è stata esaminata attentamente la mucosa alla ricerca di aree discromiche.

Si è proceduto a prelevare biopsie random di tutti i tratti e di tutte le aree sospette come da comune pratica clinica e come suggerito dalle più recenti linee guida ASGE.

Sono state valutate lesioni sospette per displasia per la resecabilità endoscopica. Lesioni polipoidi e non polipoidi con bordi distinti e senza le caratteristiche endoscopiche dell'invasione sottomucosa sono stati rimossi en-bloc endoscopicamente con resezione della mucosa. Le biopsie sono state divise per tratto e per localizzazione delle aree sospette.

Sintesi del peptide:

L'eptapeptide "VRPMPLQ", coniugato alla coda N-terminale alla fluoresceina con un linker di acido amminoesanoico, come riportato in letteratura, sarà sintetizzato mediante la standard chimica Fmoc (Fluorenyl-MethOxy-Carbonyl), su fase solida, utilizzando un sintetizzatore multicanale SyroWave (Biotage).

Il prodotto ottenuto purificato e caratterizzato mediante reverse phase HPLC/MS (High-Performance-Liquid-Chromatography/Mass Spectrometry) utilizzando un sistema ibrido Gilson/Perkin Elmer.

La purezza minima garantita del prodotto finito sarà del 98%, come certificato dall'analisi HPLC/MS.

Il peptide fluoresceinato sarà fornito, come polvere liofila da conservare a -20°C, in aliquote pronte all'uso dopo opportuna solubilizzazione in acqua

Metodiche

I campioni sono stati sciacquati con acqua e quindi spruzzati con la soluzione di peptide 100µVRPMPLQ entro 15 minuti dopo l'escissione. Dopo un tempo di incubazione di 10 minuti [15], i campioni sono stati risciacquato nuovamente per rimuovere l'eccesso di peptide non legato specificamente al tessuto. L' esame CLE è stato quindi eseguito, spostando la sonda vicino alla superficie della mucosa del campione con il sistema Cellvizio1Endomicroscopy (Mauna Kea Technologies, Parigi, Francia), che utilizza una sonda per catetere da 2,5 mm (sonda tipo Coloflex UHD). Questo sistema ha un campo visivo di 240 x 200 µm, con una risoluzione laterale di 1 µm. Le immagini CLE sono raccolte ad una velocità di scansione di 12 fotogrammi al secondo con un campo di scansione di 30.000 pixel.

Alla fine dell'esame CLE, i campioni sono stati fissati in formalina al 10% e trattati per esame istologico di routine. Ogni campione è stato classificato in base al sito di escissione ed è stato quindi assegnato un numero univoco per consentire la corrispondenza e il confronto di istologico sezioni di ematossilina-eosina con le corrispondenti immagini CLE.

Le ricostruzioni di mosaici sono state eseguite utilizzando la versione del software Cellvizio1Viewer

1.6.2 (Mauna Kea Technologies, Parigi, Francia).

L'accesso ai database ed ai software utilizzati è stato protetto mediante password.

Risultati

Nove pazienti sono stati arruolati nello studio. Tutti i pazienti erano affetti da UC di vecchia data (> 10 anni) e presentavano UC quiescente[18] alla colonscopia di sorveglianza.

Sono state ottenute un totale di 11 lesioni dai pazienti arruolati. In particolare, sono state rilevate 7 lesioni polipoidi e 4 non polipoidi ed alla fine resecate durante l'endoscopia .

All'istologia definitiva, 4 lesioni sono state diagnosticate come pseudo-polipi infiammatori, 6 come lesioni displastiche (displasia di basso grado) e una lesione classificata come cancro invasivo (SM3). La tabella 1 mostra le caratteristiche istologiche delle lesioni raccolte.

Ex-vivo VRPMPLQ-enhanced CLE

Nella mucosa non displastica, il segnale di fluorescenza è stato osservato nelle aree corrispondenti a spazi peri-criptali. Le cripte sono state quindi evidenziate in negativo (Fig 1).

In caso di polipi infiammatori, i risultati di CLE della lesione insieme all'ambiente circostante il tessuto era simile alla mucosa non displastica, che mostrava accumulo passivo del fluorescente peptide negli spazi inter-criptali allargati e nel lume delle cripte (Fig. 2).

D'altra parte, in presenza di displasia, legame attivo del peptide a colonociti displastici è stato osservato (Fig 3, Fig 4).

Discussione

Diversi studi hanno valutato la fattibilità di rilevare la displasia del colon mediante fluorescenza mirata sonde [17]. Anticorpi contro antigeni specifici o peptidi che mostrano affinità di legame per il tessuto displastico sono stati testati in modelli animali di CRC [11,20] e in pazienti con adenomi sporadici o CRC [13,15]. In particolare, gli studi in vivo hanno dato risultati incoraggianti risultati in termini di sensibilità e specificità [15]. In questo contesto promettente, la possibilità di il rilevamento di alterazioni neoplastiche associate a IBD utilizzando CLE molecolare è rimasto inesplorato ad oggi. A nostra conoscenza, questo è il primo studio che si occupa di valutare e confermare la possibilità di rilevare Displasia associata a UC all'esame CLE ex-vivo mediante l'utilizzo del peptide marcato con fluoresceina. In particolare, abbiamo usato il peptide VRPMPLQ coniugato con fluoresceina come sonda molecolare. Questo è un eptapeptide derivato dai fagi che è stato segnalato per evidenziare displasia sporadica del colon in vivo durante CLE.15

In questo studio, per la prima volta, è stato dimostrato il peptide VRPMPLQ essere in grado di rilevare anche la displasia associata alla colite ulcerosa. Crediamo questo risultato è lontano dall'essere ovvio. Infatti, VRPMPLQ è stato originariamente selezionato a causa del suo legame affinità con polipi adenomatosi sporadici [15]. Come la maggior parte dei tumori sporadici, adenomatosi sporadici i polipi sono generalmente sostenuti da una via di instabilità cromosomica [21], mentre neoplastici i cambiamenti nella UC sono più frequentemente associati al percorso di instabilità dei microsatelliti [22].

Questi diversi percorsi genetici si traducono in diversi fenotipi [23] che potrebbero comportare affinità diversa per questa sonda, a causa dell'espressione differenziale del bersaglio molecolare del Peptide VRPMPLQ, che è ancora sconosciuto [15].

Nel presente studio la specificità della sonda per le aree di displasia è stata confermata dal diversa distribuzione del peptide osservata a seconda dell'assenza o presenza di displasia stessa, come determinato dall'istologia tradizionale. In assenza di displasia, un accumulo passivo del peptide nelle cripte del lume e negli spazi peri-cryptali è stato osservato, come in precedenza descritto [15]. Grazie a questo modello di distribuzione passiva, l'architettura del tessuto (cioè le cripte) è evidenziato in contrasto negativo. Al contrario, in presenza di displasia, il legame attivo di il peptide ai colonociti è stato osservato.

Questi risultati aprono nuovi scenari nella gestione delle lesioni scoperte nel contesto di UC.

In presenza di un endoscopicamente lesione resecabile, l'applicazione tematica del peptide fluorescente VRPMPLQ potrebbe consentire una precisa definizione dei confini delle lesioni, evitando i margini di resezione positivi. Certamente, questo teorico vantaggio deve essere dimostrato da studi comparativi su un maggior numero di lesioni. Inoltre, permetterebbe un esame dettagliato della mucosa piatta che circonda la lesione, osservando residui di displasia da scoprire, orientando così le biopsie ed evitando resezioni inutili, quando non indicato. Inoltre, la somministrazione topica di questo contrasto molecolare evita somministrazione endovenosa di fluoresceina, evitando così i suoi effetti sistemici avversi, e permettendo a CLE nei pazienti nei quali la somministrazione di fluoresceina sistemica è controindicata [24,25]

Ulteriori studi su una più ampia popolazione di pazienti con UC sono necessari per stimare l'accuratezza e il valore aggiuntivo di CLE mirato rispetto alla sola chromoendoscopia, anche in

termini di costi / benefici. In effetti, l'uso di CLE nella sorveglianza del cancro rimane limitato alle aree sospette evidenziate dal blu di metilene o dal carminio indaco, in quanto l'esame di tutta la mucosa del colon di CLE rimane impraticabile [7]. Wanders e colleghi hanno scoperto che la combinazione di cromoendoscopia e CLE ha un'applicabilità limitata nella sorveglianza dei pazienti con IBD a causa di una bassa sensibilità (0,43) [26]. Tuttavia, il loro studio è stato ostacolato dai frequenti fallimenti della tecnica del sistema integrato endoscopio di CLE (iCLE) utilizzato dagli autori.

Il sistema iCLE integra il CLE nella punta dell'endoscopio, in contrasto con la sonda CLE (pCLE), usato in questo studio, dove una sonda CLE viene fatta avanzare attraverso il canale operativo di un endoscopio standard. Al contrario, Duglosz e colleghi hanno trovato una buona precisione di con pCLE nel differenziare la mucosa neoplastica dalla non neoplastica durante la sorveglianza nei pazienti con IBD ad alta sensibilità (0,89) [26]. Un grosso inconveniente della ricerca con CLE della mucosa infiammata è il rischio di falsi positivi per la displasia a causa di cambiamenti infiammatori come distruzione delle cripte e perdite di fluoresceina, che possono essere erroneamente diagnosticate come displasia [27,28].

Quindi, CLE molecolare potrebbe migliorare la specificità della CLE classica in presenza di infiammazione grazie alla specificità della sonda legante-displasia.

Ci sono molte limitazioni a questo studio, sebbene la maggior parte di esse sia intrinseca alla fattibilità di studio. Innanzitutto, si tratta di uno studio pilota limitato a un'indagine ex vivo, come richiesto dal locale Comitato etico. Data l'esperienza di Hsiung et al. [15], siamo fiduciosi che l'attualità la somministrazione in vivo del peptide evidenzia in maniera utile i colonociti displastici nei pazienti con UC. Tuttavia, questo sarà il prossimo passo della nostra ricerca. In secondo luogo, un peptide di controllo non è usato per testare la specificità del legame. Infatti, ci siamo basati sull'osservazione di Hsiung et al. [15] e il peptide ha anche mostrato un diverso pattern di distribuzione sulle lesioni non displastiche.

Terzo, lo studio era limitato ai pazienti con UC con malattia di quiescenza. Infatti, la presenza di una mucosa infiammata potrebbe influenzare il legame del peptide. Aumento della permeabilità della mucosa e la distanza potrebbe favorire l'accumulo passivo del peptide (cioè legame non specifico), rendendo difficile la differenziazione tra associazione attiva e passiva. Inoltre, problemi di sicurezza potrebbero emergere in caso di somministrazione in vivo in pazienti con malattia attiva. Sebbene i peptidi sono stati preferiti agli anticorpi in considerazione della loro ridotta immunogenicità [17], la quota di assorbimento sistemico potrebbe aumentare in presenza di mucosa alterata. Infine, noi abbiamo testato il peptide su una piccola popolazione di lesioni nei pazienti con UC. Queste lesioni potrebbero non rappresentare l'intera varietà di lesioni in termini di genotipo e fenotipo che potrebbero essere individuate in pazienti con UC.

In conclusione, il peptide VRPMPLQ è una sonda promettente per il rilevamento della displasia in il contesto di IBD. Ulteriori studi in vivo su popolazioni più grandi sono necessari per valutare il contributo efficace di questa sonda molecolare nella gestione delle lesioni rilevate durante la sorveglianza di pazienti con UC.

TABELLE

Table 1. Characteristics of excised lesions as resulted after histological evaluations. For Patient 3 and 7, two different lesions were collected and analyzed.

Patient	Type of lesion	Site	Histology
1	Polypoid	Sigmoid colon	Dysplasia
2	Polypoid	Transverse colon	Dysplasia
3	Polypoid	Left colon	Dysplasia
	Non-polypoid	Left colon	Dysplasia
4	Polypoid	Right colon	Inflammatory pseudo polyp
	Non-polypoid	Sigmoid colon	Inflammatory pseudo polyp
6	Polypoid	Recto sigmoid junction	Invasive Cancer
7	Polypoid	Left colon	Dysplasia
	Non-polypoid	Left colon	Inflammatory pseudo polyp
8	Polypoid	Left colon	Dysplasia
9	Non-polypoid	Sigmoid colon	Inflammatory pseudo polyp

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180509.t001>

FIGURE

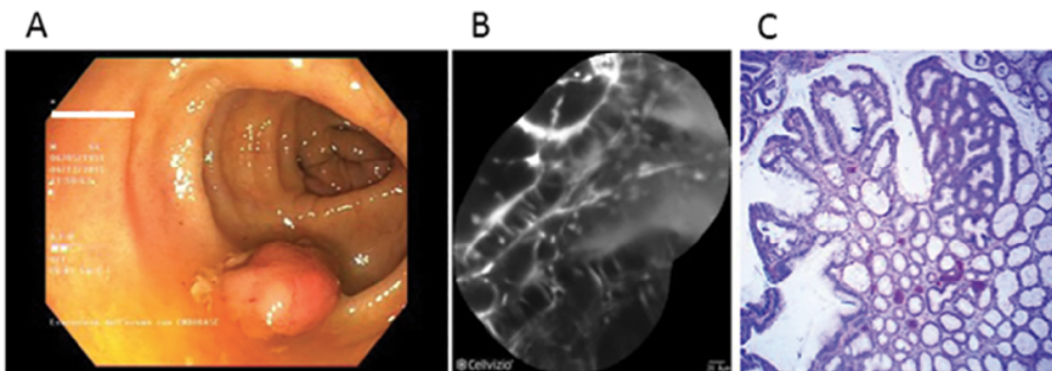


Fig 4. Dysplastic lesion. White-light endoscopic view showing a polypoid lesion (Is, Paris classification) of the transverse colon (A). After resection and coloration with the 100μ VRPMPQLQ peptide solution, CLE shows active binding of the peptide to dysplastic colonocytes is observed. This along with passive accumulation of the peptide determines an increase in fluorescence (B). Conventional histology (haematoxylin/eosin, original magnification, X 106) showing low-grade dysplasia (C).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180509.g004>

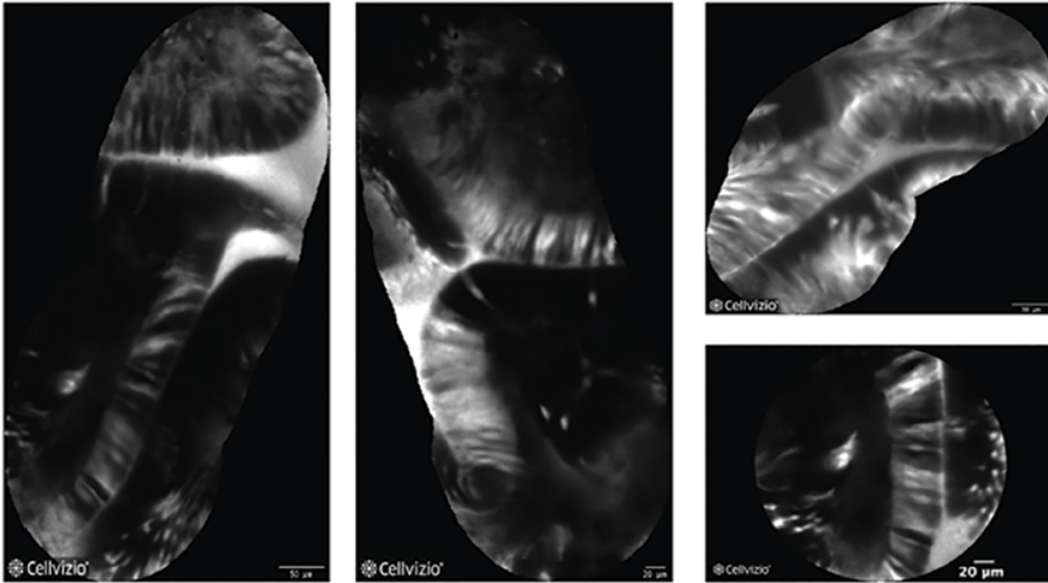


Fig 3. Dysplastic mucosa at CLE with heptapeptide (VRPMPLQ). A series of VRPMPLQ/CLE images from different patients showing dysplastic colonocytes. The active binding of the peptide to the colonocytes is observed and determinates a strong increase in fluorescence.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180509.g003>

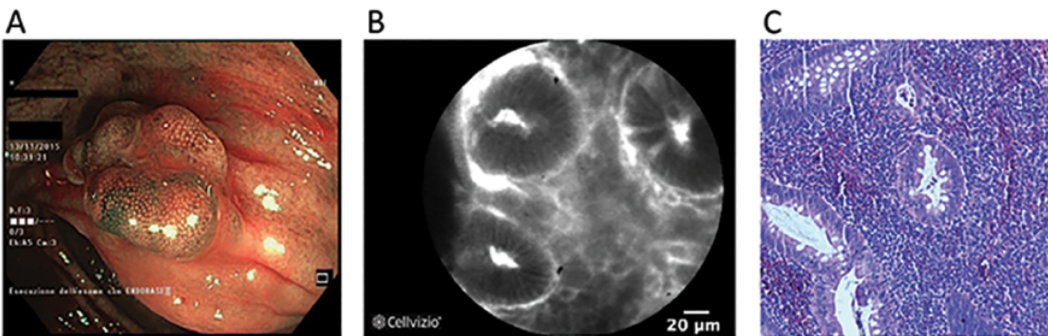


Fig 2. Non-dysplastic lesion. NBI-endoscopic view showing a polypoid lesion (Is, Paris classification) of the right colon (A). After resection and coloration with the 100 μ VRPMPLQ peptide solution, CLE shows accumulation of the fluorescent peptide in the enlarged inter-crypt spaces and in the lumen crypts. Crypts are therefore highlighted in negative (B). Conventional histology (haematoxylin/eosin, original magnification, X 106) showing inflammatory pseudopolyp (C).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180509.g002>

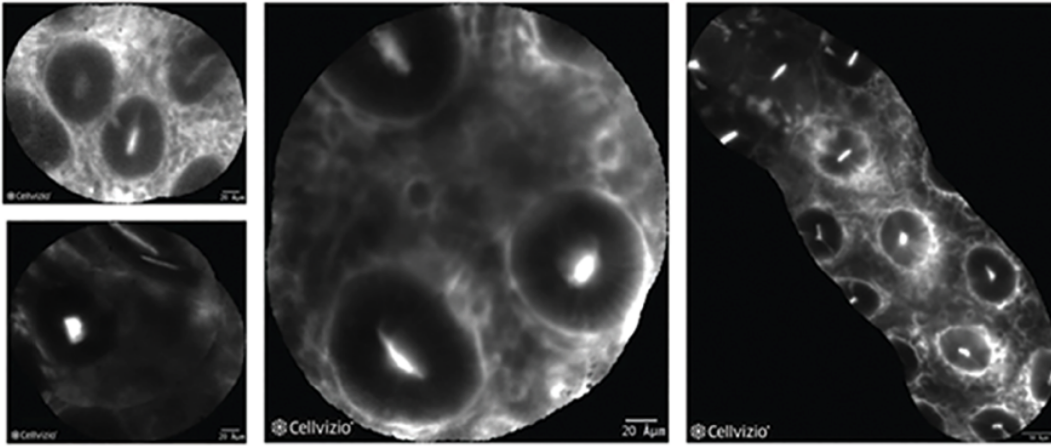


Fig 1. Non-dysplastic mucosa at CLE with heptapeptide (VRPMPLQ). A series of VRPMPLQ/CLE images from different patients showing non-dysplastic colonocytes. The fluorescence signal is seen emanating from areas corresponding to the pericryptal spaces and, to a much lesser extent, from the crypt-lumen. Crypts are highlighted in negative.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180509.g001>

Abstract in inglese

Aim

Targeted molecular probes have been used to detect sporadic colonic dysplasia during confocal laser endomicroscopy (CLE) with promising results. This is a feasibility pilot study aiming to assess the potential role of CLE combined with a fluorescent-labeled peptide to stain and detect dysplasia associated with Ulcerative Colitis.

Method

A phage-derived heptapeptide with predicted high binding affinity for dysplastic tissue, was synthesized and labeled with fluorescein. Eleven lesions with suspected dysplasia at endoscopy were excised from nine patients with long-standing ulcerative colitis. Specimens were sprayed with the peptide and examined by CLE. The CLE images were then compared to the corresponding histological sections.

Results

At definitive histology, 4 lesions were diagnosed as inflammatory polyps, 6 as dysplastic lesions and one as invasive cancer. In inflammatory polyps, the fluorescence signal came from peri-cryptal spaces and crypt lumen due to passive accumulation of the peptide in these areas. Dysplasia was associated with active binding of the peptide to dysplastic colonocytes.

Conclusion

Ex vivo staining of ulcerative colitis-associated dysplasia using a fluorescent labeled molecular probe and CLE is feasible. *In vivo* studies on larger populations are required to evaluate the safety and the effective contribution of molecular probes in cancer surveillance of ulcerative colitis.

Bibliograia

1. Munkholm P. Review article: the incidence and prevalence of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18 Suppl 2:1±5.
2. Van Assche G, Dignass A, Bokemeyer B, Danese S, Gionchetti P, Moser G, et al. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 3: special situations. *J Crohns Colitis* 2013; 7:1±33. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2012.09.005> PMID: 23040453
3. Farraye FA, Odze RD, Eaden J, Itzkowitz SH. AGA technical review on the diagnosis and management of colorectal neoplasia in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 2010; 138:746±74. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.035> PMID: 20141809
4. Brostroém O, Loéfborg R, Ost A, Reichard H. Cancer surveillance of patients with longstanding ulcerative colitis: a clinical, endoscopic, and histological study. *Gut* 1986; 27:1408±13. PMID: 3804019
5. Hurlstone DP, Sanders DS, McAlindon ME, Thomson M, Cross SS. High-magnification chromoscopic colonoscopy in ulcerative colitis: a valid tool for in vivo optical biopsy and assessment of disease extent. *Endoscopy* 2006; 38:1213±7. <https://doi.org/10.1055/s-2006-944732> PMID: 17163321
6. Kiesslich R, Fritsch J, Holtmann M, Koehler HH, Stolte M, Kanzler S, et al. Methylene blue-aided chromoendoscopy for the detection of intraepithelial neoplasia and colon cancer in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2003; 124:880±8. <https://doi.org/10.1053/gast.2003.50146> PMID: 12671882
7. Laine L, Kaltenbach T, Barkun A, McQuaid KR, Subramanian V, Soetikno R. SCENIC international consensus statement on surveillance and management of dysplasia in inflammatory bowel disease. *Gastrointest Endosc* 2015; 81:489±501. <https://doi.org/10.1016/j.gie.2014.12.009> PMID: 25708752
8. De Palma GD, Staibano S, Siciliano S, Persico M, Masone S, Maione F, et al. 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. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2010.03.009> PMID: 20409761
9. Rispo A, Castiglione F, Staibano S, Esposito D, Maione F, Siano M, et al. 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. <https://doi.org/10.4253/wjge.v4.i9.414> PMID: 23125900
10. Kiesslich R, Goetz M, Lammersdorf K, Schneider C, Burg J, Stolte M, et al. Chromoscopy-guided endomicroscopy increases the diagnostic yield of intraepithelial neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2007; 132:874±82. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.01.048> PMID: 17383417
11. Foersch S, Kiesslich R, Waldner MJ, Delaney P, Galle PR, Neurath MF, et al. Molecular imaging of VEGF in gastrointestinal cancer in vivo using confocal laser endomicroscopy. *Gut* 2010; 59:1046±55. <https://doi.org/10.1136/gut.2009.202986> PMID: 20639250
12. Goetz M, Ziebart A, Foersch S, Vieth M, Waldner MJ, Delaney P, et al. In vivo molecular imaging of colorectal cancer with confocal endomicroscopy by targeting epidermal growth factor receptor. *Gastroenterology* 2010; 138:435±46. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.10.032> PMID: 19852961
13. Liu J, Zuo X, Li C, Yu T, Gu X, Zhou C, et al. In vivo molecular imaging of epidermal growth factor receptor in patients with colorectal neoplasia using confocal laser endomicroscopy. *Cancer Lett* 2013; 330:200±7. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.11.044> PMID: 23220286
14. Cał rțalnă T, Săftoiu A, Gruionu LG, Gheonea DI, Pirici D, Georgescu CV, et al. Confocal laser

endomicroscopy

for the morphometric evaluation of microvessels in human colorectal cancer using targeted anti-CD31 antibodies. *PLoS One* 2012; 7:e52815. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052815> PMID: 23285192

15. Hsiung P-L, Hsiung P-L, Hardy J, Friedland S, Soetikno R, Du CB, et al. Detection of colonic dysplasia in vivo using a targeted heptapeptide and confocal microendoscopy. *Nat Med* 2008; 14:454±8. <https://doi.org/10.1038/nm1692> PMID: 18345013

16. Sturm MB, Joshi BP, Lu S, Piraka C, Khondee S, Elmunzer BJ, et al. Targeted imaging of esophageal neoplasia with a fluorescently labeled peptide: first-in-human results. *Sci Transl Med* 2013; 5:184ra61. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004733> PMID: 23658246

17. Karstensen JG, Klausen PH, Saftoiu A, Vilmann P. Molecular confocal laser endomicroscopy: a novel technique for in vivo cellular characterization of gastrointestinal lesions. *World J Gastroenterol* 2014; 20:7794±800. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i24.7794> PMID: 24976717

18. Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, et al. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2005; 353:2462±76. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa050516> PMID: 16339095

19. ASGE Standards of Practice Committee, Shergill AK, Lightdale JR, Bruining DH, Acosta RD, Chandrasekhara

V, et al. ASGE guideline: The role of endoscopy in inflammatory bowel disease. *Gastrointest Endosc*. 2015 May; 81(5):1101±21.e1-13. <https://doi.org/10.1016/j.gie.2014.10.030> PMID: 25800660

20. Goetz M, Hoetker MS, Diken M, Galle PR, Kiesslich R. In vivo molecular imaging with cetuximab, an anti-EGFR antibody, for prediction of response in xenograft models of human colorectal cancer. *Endoscopy* 2013; 45:469±77. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1326361> PMID: 23580409

21. Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology* 2010; 138:2059±72. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.065> PMID: 20420946

22. Fujiwara I, Yashiro M, Kubo N, Maeda K, Hirakawa K. Ulcerative colitis-associated colorectal cancer is frequently associated with the microsatellite instability pathway. *Dis Colon Rectum* 2008; 51:1387±94. <https://doi.org/10.1007/s10350-008-9212-9> PMID: 18546042

23. Dunican DS, McWilliam P, Tighe O, Parle-McDermott A, Croke DT. Gene expression differences between the microsatellite instability (MIN) and chromosomal instability (CIN) phenotypes in colorectal cancer revealed by high-density cDNA array hybridization. *Oncogene* 2002; 21:3253±7. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205431> PMID: 12082642

24. Wallace MB, Meining A, Canto MI, Fockens P, Miehle S, Roesch T. The safety of intravenous fluorescein

for confocal laser endomicroscopy in the gastrointestinal tract. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 31:548±52. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2009.04207.x> PMID: 20002025

25. Paramsothy S, Leong RWL. Endoscopy: Fluorescein contrast in confocal laser endomicroscopy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7:366±8. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.83> PMID: 20606632

26. Wanders LK, Kuiper T, Kiesslich R, Karstensen JG, Leong RW, Dekker E, et al. Limited applicability of chromoendoscopy-guided confocal laser endomicroscopy as daily-practice surveillance strategy in Crohn's disease. *Gastrointest Endosc* 2016; 85:966±971.

27. Dlugosz A, Barakat AM, BjoérkstroémNK, Oé st Å, Bergquist A. Diagnostic yield of endomicroscopy for dysplasia

in primary sclerosing cholangitis associated inflammatory bowel disease: a feasibility study. *Endosc Int Open*. 2016; 4:E901±11 <https://doi.org/10.1055/s-0042-111203> PMID: 27540581

28. Thorlacius H1, Toth E. Role of chromoendoscopy in colon cancer surveillance in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2007; 13:911±917. <https://doi.org/10.1002/ibd.20118> PMID: 17309075