



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN MEDICINA
E CHIRURGIA

Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Oncologiche e Gastroenterologiche
U.O.C. Gastroenterologia
Direttore: Ch.mo Prof. Fabio Farinati

TESI DI LAUREA:

STUDIO PROSPETTICO DI VALUTAZIONE DELLA
PERMEABILITÀ INTESTINALE IN PAZIENTI CON
MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE DELL'INTESTINO:
QUALE RUOLO DEL "LEAKY GUT"?

Relatore: Prof. Edoardo Vincenzo Savarino

Correlatrice: Dott.ssa Ilaria Marsilio

Laureando: Pierluigi Frasca

Matricola: 1152391

Anno Accademico 2021/2022

*Alla mia famiglia,
vigile guardiana
del mio presente e del mio futuro*

SOMMARIO

RIASSUNTO	5
ABSTRACT	8
1. INTRODUZIONE	11
1.1. LE MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI (MICI)	11
1.1.1 DEFINIZIONE	11
1.1.2 EPIDEMIOLOGIA	11
1.1.3 EZIOLOGIA	12
1.1.4 PATOGENESI	13
1.1.5 MANIFESTAZIONI CLINICHE	19
1.1.5.1 MANIFESTAZIONI INTESTINALI DELLA RETTOCOLITE ULCEROSA	19
1.1.5.2 MANIFESTAZIONI INTESTINALI DELLA MALATTIA DI CROHN	22
1.1.5.3 MANIFESTAZIONI EXTRA-INTESTINALI DELLE MICI	25
1.1.6 DIAGNOSI	37
1.1.7 TERAPIA	46
1.1.8 PROGNOSI	57
1.2. STUDIO DELLA PERMEABILITÀ INTESTINALE E “LEAKY GUT”	58
1.2.1 LA STRUTTURA E LE FUNZIONI DELLA BARRIERA INTESTINALE	58
1.2.2 LA PERMEABILITÀ INTESTINALE: MECCANISMI PATOLOGICI E METODI DI ANALISI	60
1.2.3 BIOMARKERS NELLA VALUTAZIONE DELLA PERMEABILITÀ INTESTINALE	66
1.2.4 IL CONCETTO DI “LEAKY GUT”	70
2. SCOPO DELLO STUDIO	74

3. MATERIALI E METODI	75
4. RISULTATI	82
4.1. CARATTERISTICHE SOCIO-DEMOGRAFICHE E CLINICHE DELLA POPOLAZIONE IN STUDIO	82
4.2. VALUTAZIONE DELLA PERMEABILITÀ INTESTINALE TRAMITE TEST <i>IN VIVO</i> AI QUATTRO ZUCCHERI	85
4.3. DETERMINAZIONE DEL MARKER <i>FGF-19</i>	87
4.4. DESCRIZIONE DELLA QUALITÀ DI VITA, SINTOMI DEPRESSIVI E DIGESTIVI DELLA POPOLAZIONE IN STUDIO	88
5. DISCUSSIONE	91
6. CONCLUSIONE	93
7. BIBLIOGRAFIA	94

RIASSUNTO

INTRODUZIONE: le malattie infiammatorie croniche dell'intestino (MICI) sono patologie a eziologia multifattoriale con interessamento di diversi segmenti del tubo gastroenterico, inducendo un danno d'organo. Esse comprendono la malattia di Crohn (MC), la rettocolite ulcerosa (RCU) e la colite indeterminata (IBD-U). I sintomi comunemente riferiti dai pazienti sono dolore addominale, perdita di peso e diarrea cronica per la MC e diarrea muco-ematica con dolore addominale per la RCU. A livello eziologico, non si conoscono ancora bene tutti i fattori coinvolti, con un intreccio complesso di fattori genetici, ambientali e immunitari che contribuiscono alla patogenesi. Tra questi, uno sembra essere l'aumentata permeabilità intestinale, che predispone all'ingresso di tossine e antigeni con attivazione dell'infiammazione. In generale, con il termine *leaky gut* si intende una condizione per cui si sviluppa un'aumentata permeabilità intestinale, con perdita della selettività della barriera epiteliale. L'integrità di parete e la permeabilità sono valutabili mediante metodiche *in vivo* (tra cui spiccano i test agli zuccheri a differente conformazione molecolare) e metodiche *in vitro* (mediante impiego delle *Ussing Chambers* su colture cellulare o biopsie). Sebbene non siano stati ancora validati, esistono dei biomarkers sanguigni e fecali rilevabili in caso di aumentata permeabilità intestinale, tra cui i più noti sono il *lipopolisaccaride batterico (LPS)*, *Fatty Acid Binding Protein (FABP)*, *Zonulina*, *Fibroblast Growth Factor-19 (FGF-19)* e la *alpha1-antitripsina fecale*.

Sono diverse le evidenze di associazioni tra il *leaky gut* e numerose patologie, gastroenterologiche e non, tra cui le MICI, la celiachia, la IBS, il lupus eritematoso sistemico, la depressione e l'autismo.

SCOPO DELLO STUDIO: valutare: i) la permeabilità intestinale in una coorte di pazienti con MICI e in una coorte di controlli sani; ii) le correlazioni tra le alterazioni della permeabilità intestinale, le condizioni psicologiche e la qualità di vita.

MATERIALI E METODI: lo studio condotto è di tipo prospettico longitudinale svolto in collaborazione con *IRCCS Azienda Ospedaliera di Bologna*. Sono stati selezionati 36 pazienti con diagnosi di MICI afferenti al centro regionale per le MICI presso la UOC di

Gastroenterologia dell'Azienda Ospedale Università di Padova. I criteri d'inclusione sono stati, per il gruppo MICI, la presenza di attività di malattia a livello clinico e/o endoscopico, e, per i controlli sani, l'assenza di patologia, né organica né funzionale. I criteri di esclusione sono stati, per il gruppo MICI, la presenza di una malattia in fase di remissione clinica ed endoscopica, e, per entrambi i gruppi, la presenza di un $BMI \geq 30$ in quanto fattore di rischio indipendente per un'aumentata permeabilità intestinale. Una volta arruolato, ai pazienti e ai controlli veniva consegnato il kit (AB Analitica s.r.l. – *Mass-Q Gastropack*®) per lo studio della permeabilità intestinale ai quattro zuccheri, in particolare *mannitolo*, *lattulosio*, *saccarosio* e *sucralosio*, e veniva prelevato del sangue per il dosaggio dei livelli circolanti dell'ormone *FGF-19*. La quantità di zuccheri escreti con le urine è stata misurata mediante metodica di cromatografia liquida ad alta prestazione accoppiata a un sistema di spettrometria di massa (*HPLC-MS*), mentre le concentrazioni sieriche di *FGF-19* sono state misurate mediante kit *Human FGF-19 Quantikine ELISA*. Infine, per la valutazione del benessere psicofisico, sono stati dispensati tre diversi questionari: *Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS)*, *Short Form Health Survey a 36 items (SF-36)* e un questionario sui sintomi digestivi a 46 items.

L'analisi statistica è stata portata avanti mediante software *STATA11* e sono stati impiegati test d'ipotesi non parametrici (*test di Mann-Whitney* e *test di Kruskal-Wallis*).

RISULTATI: rispetto al gruppo di controlli asintomatici (*AC*), nei pazienti con malattia di Crohn (*MC*), il mannitolo ($p < 0.01$) è risultato significativamente diminuito, mentre il *lactulose to mannitol ratio*, o *LMR* ($p = 0.05$), il saccarosio ($p < 0.001$) e il sucralosio ($p < 0.05$) significativamente aumentati. Rispetto ad *AC*, nei pazienti con *RCU* il saccarosio ($p < 0.01$) si è visto significativamente aumentato. I livelli sierici di *FGF-19* sono risultati statisticamente differenti tra i tre gruppi ($p = 0.05$) e diminuiti, rispetto ad *AC*, sia per *MC* ($p < 0.05$) sia per *RCU* ($p = 0.05$).

Dai questionari è emerso che, rispetto ad *AC*, i pazienti con *MC* presentano un peggiore benessere fisico ($p < 0.001$), un benessere emotivo più scarso ($p < 0.001$), una vitalità ridotta ($p < 0.001$), un dolore percepito maggiore ($p = 0.001$) e peggiori condizioni di salute generale ($p = 0.002$). I pazienti con *RCU*, rispetto ad *AC*, presentano scores psicometrici di ansia ($p = 0.001$) e depressione (< 0.001) più elevati, un peggior benessere fisico ($p < 0.001$), un benessere emotivo più scarso ($p < 0.001$), una vitalità ridotta ($p < 0.001$) e capacità sociali ridotte ($p < 0.001$).

CONCLUSIONI: i pazienti con MICI presentano un'aumentata permeabilità intestinale rispetto ai controlli sani asintomatici, confermata da un'aumentata escrezione degli zuccheri somministrati e da ridotti livelli sierici di *FGF-19*. All'interno del gruppo MICI, il gruppo MC presenta una maggiore variabilità rispetto al gruppo dei controlli sull'escrezione urinaria degli zuccheri. Pertanto, la rilevanza clinica del dato sembra appannaggio della MC rispetto alla RCU. Il benessere psicofisico si è visto fortemente ridotto sia nella MC sia nella RCU rispetto ai controlli. Risulta, però, difficile stabilire un rapporto causale tra il *leaky gut* e lo sviluppo di disturbi psicofisici, non considerando il peso della patologia organica cronica di per sé.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Inflammatory Bowel Diseases (IBDs) are chronic inflammatory disorders of the gastrointestinal tract, leading to organ damage. IBDs include Crohn's Disease (CD), Ulcerative Colitis (UC) and Indeterminate Colitis (IBD-U). The most commonly reported symptoms are abdominal pain, weight loss and chronic diarrhea for CD and bloody diarrhea (with or without mucus) with abdominal pain for UC. In terms of their etiology, the involved factors are not yet fully understood, with a mixture of elements coming from genetics, environment, and imbalances in the immune system response. Among them, an altered intestinal permeability seems to be an important one since it leads to an increased intake of toxins and antigens which may activate inflammatory molecular pathways. The word *leaky gut* is used to convey the idea that intestinal permeability is increased, with the epithelial barrier getting less selective. Intestinal permeability can be assessed by *in vivo* methods (mostly multi-sugar tests) and *ex vivo* methods (*Ussing Chambers* with cell cultures or tissue biopsies). Albeit not yet validated, there are some blood and fecal biomarkers that can be detected as long as the mucosal barrier is compromised, such as *bacterial lipopolysaccharides (LPS)*, *Fatty Acid Binding Protein (FABP)*, *Zonulin* and *Fibroblast Growth Factor-19 (FGF-19)*. There has been evidence that a *leaky gut* is related to several diseases (gastrointestinal and non-gastrointestinal), like IBD, celiac disease, IBS, systemic lupus erythematosus, depression and autism.

AIM OF THE STUDY: to evaluate: i) intestinal permeability in a IBD cohort and in a cohort of asymptomatic controls (AC); ii) the correlation between intestinal permeability, psychological conditions, and the quality of life.

MATERIALS AND METHODS: the study is longitudinal and prospective, carried out in collaboration with *IRCCS Azienda Ospedaliera di Bologna*. Thirty-six patients with a diagnosis of IBD were selected in the Gastroenterology Department of Azienda Ospedale Università di Padova. The inclusion criteria were, for the IBD cohort, the presence of clinically and/or endoscopically active disease, and, for the AC cohort, the lack of disease (neither functional nor organic). The exclusion criteria were, for the IBD cohort, the absence of active disease with an unremarkable physical exam and the presence of negative imaging or negative endoscopic exams, and, for both groups, the presence of a BMI ≥ 30 since obesity has been shown to be an

independent risk factor for increased intestinal permeability. Once enrolled, the patient was given a kit for the evaluation of intestinal permeability via a multi-sugar test (*mannitol, lactulose, sucrose, and sucralose*), engineered by AB Analitica s.r.l – *Mass-Q Gastropack*®. In addition, a blood sample was collected, to measure the level of the hormone *FGF-19* in the serum. The amount of urinary sugars was measured with *High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (HPLC-MS)* and the blood concentrations of *FGF-19* were measured with *Human FGF-19 Quantikine ELISA* kit. Lastly, to evaluate the psychophysical wellbeing of the enrolled patients, three different questionnaires were delivered: *Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS)*, *Short Form Health Survey with 36 items (SF-36)*, and a 46-items questionnaire assessing digestive symptoms.

The statistical analysis was performed by the means of *STATAll* software packages, carrying through non-parametric statistic tests (*Mann-Whitney test* and *Kruskal-Wallis test*).

RESULTS: compared to the AC group, in CD patients mannitol ($p<0.01$) was significantly decreased, whilst *lactulose to mannitol ratio* or *LMR* ($p=0.05$), sucrose ($p<0.001$) and sucralose ($p<0.05$) were significantly increased. Compared to the AC group, sucrose ($p<0.01$) was significantly increased in UC patients. Serum levels of *FGF-19* were significantly different between the three groups ($p=0.05$) and decreased, compared to the AC group, for both CD patients ($p<0.05$) and UC patients ($p=0.05$).

Assessing the results of the questionnaires, CD patients, compared to the AC group, were more physically ($p<0.001$) and emotionally ($p<0.001$) affected, showing a decreased vitality ($p<0.001$), a perceived stronger pain ($p=0.001$) and worse general health ($p=0.002$). Patients with UC, compared to the AC group, had higher scores in HADS-A ($p=0.001$) and HADS-D (<0.001), showing worse well-being both physically ($p<0.001$) and emotionally ($p<0.001$), with a decrease in vitality ($p<0.001$) and social functioning ($p<0.001$).

CONCLUSIONS: patients with IBD have shown an increased intestinal permeability compared to the AC, confirmed by increased urinary sugar levels and decreased levels of serum *FGF-19*. In the IBD cohort, CD patients had an overall higher variability in the urinary excretion of sugars than the AC group. Hence, the clinical relevance of the data seems to be bigger in CD than in UC. The psychophysical well-being in the IBD cohort has been shown as worse overall than in the AC group. It appears to be difficult, though, to establish a causative link between the *leaky gut* and psychophysiological disorders, taking out the burden of the chronic disease per se.

1. INTRODUZIONE

1.1. LE MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI (MICI)

1.1.1 DEFINIZIONE

Le MICI sono un gruppo di patologie caratterizzate da un processo infiammatorio cronico del tubo digerente associato a un'alterata risposta immunitaria alla flora intestinale. Esse comprendono la **rettocolite ulcerosa (RCU)**, la **malattia di Crohn (MC)** e la **Colite indeterminata (IBD-U)**, differenti per la loro localizzazione e la profondità d'interessamento del processo flogistico all'interno della parete intestinale.¹

La maggior parte dei pazienti affetti da MICI presenta una patologia specifica, mentre, in almeno il 10% dei pazienti, le caratteristiche di malattia sono simili tale da non rendere possibile una netta distinzione tra le due, definendo, così, la **colite indeterminata**.¹

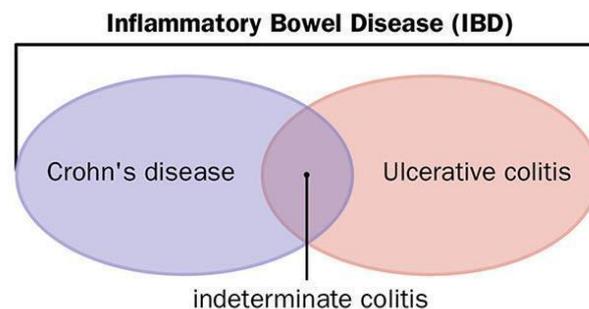


Figura 1 Visione schematica delle MICI (o IBD), divise in malattia di Crohn (o Crohn's disease), rettocolite ulcerosa (o ulcerative colitis) e colite indeterminata (indeterminate colitis). Modificata da: <https://www.hopkinsmedicine.org/>

1.1.2. EPIDEMIOLOGIA

Le MICI presentano un'incidenza che varia considerevolmente nelle diverse aree geografiche. La maggior parte degli studi epidemiologici provengono dal Nord America e dall'Europa, dove si registrano i tassi d'incidenza più elevati delle MICI.

In generale, si è assistito a un aumento a livello globale dell'incidenza sia di RCU sia di MC negli ultimi decenni, con un gradiente piuttosto conservato tra nord-sud a favore del primo in termini di numeri. Per esempio, a livello europeo, l'incidenza delle MICI è caratterizzata da un gradiente nord-sud ed est-ovest, in cui l'incidenza è, da dati del 2019, di 6.3/100.000 abitanti nel Nord Europa contro 3.6/100.000 abitanti per il Sud Europa per MC; mentre per RCU si riporta 11.4 e 8 su 100.000 abitanti rispettivamente per il Nord e il Sud Europa. In riferimento al gradiente est-ovest, recentemente si sta assistendo a un aumento dell'incidenza anche a livello dei paesi asiatici, dove fino a poco tempo fa erano considerate malattie rare.²

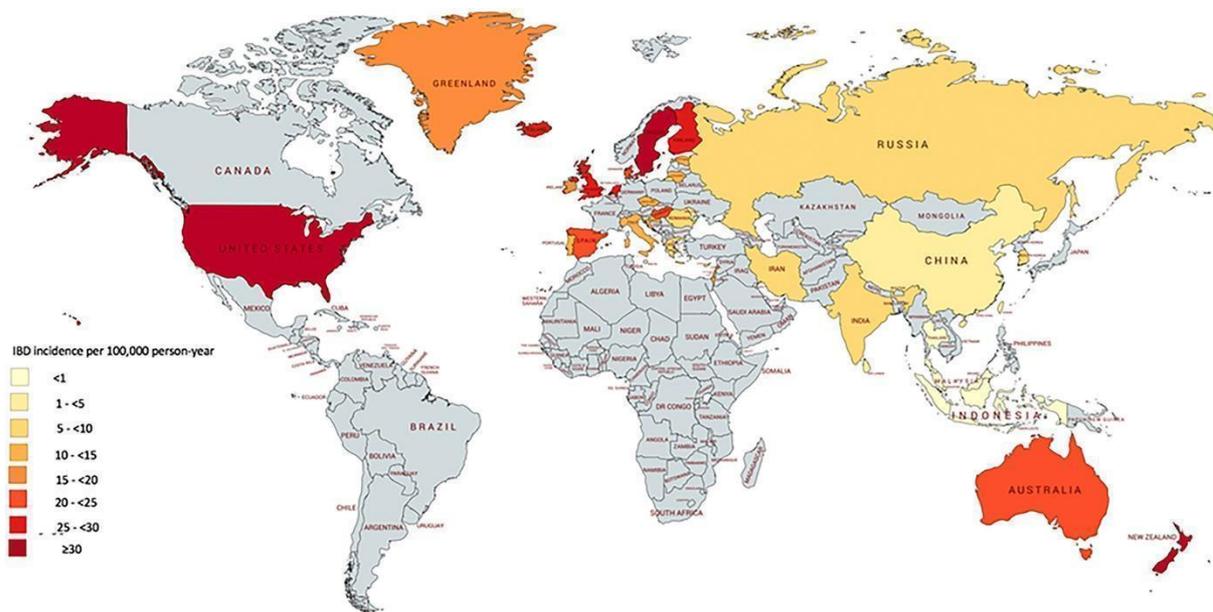


Figura 2 Visione schematica dell'incidenza delle MICI secondo studi di popolazione condotti tra il 2010 e il 2019.²

In termini di prevalenza, in Europa essa si aggira intorno a livelli dello 0,3%, con circa 2.5-3 milioni di casi di MICI, variando tra 1.5 e 213 per 100.000 abitanti per MC e tra 2.4 e 294 per 100.000 abitanti per RCU.²

1.1.3. EZIOLOGIA

L'eziologia delle MICI, a oggi, non è ancora nota. Diversi fattori concorrono allo sviluppo del processo immuno-mediato che porta alla progressiva distruzione dell'integrità della parete intestinale.

Molte cause sono state individuate ma nessuna di queste è presente in tutti i pazienti, rendendo impossibile la definizione di un'eziologia unica. Per quanto riguarda la MC, si è trovata una forte associazione con il **fumo di sigaretta**, il quale, però, risulta protettivo per la RCU.³

La correlazione con la **dieta** è ancora oggi oggetto di studio, ma da reviews sistematiche e metanalisi recenti si è visto che ci sono evidenze limitate sul ruolo della dieta elementare⁴ nel mantenimento della remissione e nella prevenzione delle riaccensioni di malattia in pazienti adulti con MC. A ogni modo, la dieta elementare si è vista efficace esclusivamente per MC e non per RCU, probabilmente per il suo ruolo che ha nella riduzione della permeabilità intestinale.⁵ A tal proposito, si è visto che l'**aumentata permeabilità intestinale** può giocare un ruolo all'interno della patogenesi, in quanto questa predispone all'assorbimento di antigeni con aumentata probabilità di sviluppo di una risposta immunitaria aberrante, la quale può portare all'attivazione clinica della MC.⁶ A prova di ciò, si è visto che i pazienti con alterata permeabilità intestinale presentano aumentati livelli circolanti di cellule B CD19⁺ attivate, con immunostochimica positiva per il marker CD45RO.⁷

Un ultimo aspetto indagato negli studi è la **genetica**, in particolare si è vista una correlazione tra alcuni polimorfismi del **gene CARD15** e l'attività di malattia.³ Questa correlazione si è vista più forte in MC e meno in RCU.³

1.1.4. PATOGENESI

Come per la definizione dell'eziologia, anche per la patogenesi non si riconoscono meccanismi universali per tutti i pazienti, ma sono presenti diverse influenze a livello genetico, ambientale e immunitario.

Per quanto riguarda i fattori **ambientali** che concorrono alla patogenesi delle MICI, tra questi è stato studiato il fumo di sigaretta, il quale vede una correlazione differente per MC e RCU. Si è visto che il paziente con RCU è, tipicamente, un non-fumatore mentre il paziente con Crohn è, tipicamente, un fumatore. Nel secondo caso, in particolare, si è visto che il fumo è un fattore di rischio indipendente per la ripresa endoscopica e clinica della patologia, oltre a determinare l'*outcome* della chirurgia. Per tale motivo, il fumo si inserisce a metà tra un fattore di rischio e un fattore eziologico di patologia.

Si aggiunge, poi, la **predisposizione genetica** alla patologia, con associazione sia orizzontale sia verticale all'interno della stessa famiglia, includendo padre-figlio, padre-figlia, madre-figlio e madre-figlia, oltre che anche tra fratelli, con la frequenza di MICI nei parenti di primo grado che può arrivare fino al 40%.⁸ Inoltre, stando ad ampi studi condotti in Scandinavia, si è visto il rischio familiare come un fattore che predispone alle MICI con un rischio relativo 10 volte più alto di sviluppare la malattia in caso di storia familiare positiva rispetto alla popolazione generale⁹, con maggiore concordanza sia per MC sia per RCU nei gemelli monozigoti rispetto a quelli dizigoti.¹⁰ Sempre all'interno della concordanza della patologia a livello familiare, si sono osservate, di solito, similitudini nei casi di malattia all'interno della stessa famiglia, in particolare in termini di età d'esordio, sito d'infiammazione e fenotipo clinico.¹¹ Nonostante tutte queste associazioni, non è, però, possibile escludere la componente ambientale dalla patogenesi della malattia; non si può, infatti, parlare di un'ereditarietà mendeliana classica quanto, piuttosto, di un'eziologia multifattoriale.

In ultimo, all'interno della patogenesi svolge un ruolo centrale la **risposta immunitaria**, che risulta disregolata e aumentata, responsabile del processo flogistico immuno-mediato a livello del tubo digerente associato alle MICI. Tra i fattori principali coinvolti si ritrovano:

1. Immunità umorale:

1.1. **Cellule B mucosali**: si tratta delle cellule che, normalmente, albergano all'interno della parete mucosa intestinale. A livello della mucosa dei pazienti con MICI, si trova un maggior numero di plasmacellule che partecipano alla risposta immunitaria disregolata propria della patologia con la produzione di *IgG*. In particolare, si sono viste delle differenze all'interno di MC, dove risultano aumentate soprattutto le *IgG2*, e di RCU, dove risultano maggiori le *IgG1*;¹²

1.2. **Autoanticorpi e autoantigeni**: perché si parli di una vera e propria malattia autoimmune, è necessario che si ritrovino degli autoanticorpi rivolti contro autoantigeni che sono in grado di portare alla malattia e attivare l'infiammazione, con conseguente danno tissutale. All'interno dei numerosi autoanticorpi che sono stati rinvenuti nei pazienti con MICI, quelli che hanno

dimostrato un potere patogenetico sono le IgG contro una proteina colica da 40 kDa, scoperta da Takahashi e Das.¹⁶ Questi particolari autoanticorpi sono in grado di riconoscere diversi antigeni che condividono lo stesso epitopo, localizzati all'interno di colon, pelle, epitelio biliare, occhi e articolazioni. Ciò spiegherebbe anche la correlazione della RCU con le sue manifestazioni extraintestinali all'interno degli stessi distretti dove si ritrova l'autoantigene. Nello specifico, questo antigene sembra essere la frazione 5 della famiglia delle tropomiosine, le quali si ritrovano all'interno delle proteine del citoscheletro cellulare.¹⁵ In generale, il ruolo degli autoanticorpi all'interno della patogenesi è, tutt'oggi, dubbio, in quanto nello studio di tutte le patologie autoimmuni si è, ormai, sfatato il loro ruolo patologico assoluto, configurandosi come reperti di una (anche) normale omeostasi del sistema immunitario;

1.3.**ANCA**: un interesse particolare si è rivolto verso gli anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili (*ANCA*). Essi risultano particolarmente prevalenti nella RCU, dove si è osservata una loro positività fino all'80% dei casi, fino ad aumentare ancora di più in caso di compresenza di colangite sclerosante primitiva.¹⁷ La presenza di *pANCA* (che riconoscono il citoplasma dei neutrofili a livello perinucleare) si è vista essere maggiore all'interno dei membri della famiglia con storia di RCU¹⁸ e in quelli con malattia più aggressiva,¹⁹ oltre che in quelli a rischio di pouchite cronica in seguito a colectomia.²⁰

2. **Mediatori di immunoregolazione e infiammazione**: questo si configura come l'aspetto più rilevante, che ha permesso di conoscere meglio la patologia e di applicare queste conoscenze a fini terapeutici. Tra i principali mediatori si annoverano:

2.1.*Interleuchina-2 (IL-2)*: è la principale citochina immuno-modulatoria, responsabile del mantenimento e dell'aumento dell'infiammazione soprattutto a livello della MC. In particolare, si è visto che i linfociti T mucosali a livello intestinale sono maggiormente reattivi a IL-2, con maggiore espressione di IL-2R α ¹² e con peggioramento della sintomatologia alla somministrazione di IL-2¹³;

2.2. *Interferone-gamma (IFN- γ)*: strettamente correlato alla precedente, esso risulta prodotto all'interno delle cellule mononucleate della lamina propria della mucosa intestinale, dove si è riscontrato un aumento dell'espressione dell'mRNA a esso associato a livello citoplasmatico. La produzione di IFN- γ è strettamente correlata all'espansione clonale dei linfociti T indotta da IL-2 e risulta essere marcata soprattutto all'interno della MC, dove si può evidenziare una maggiore risposta immunitaria di tipo Th1 rispetto alla RCU,^{23,24} come importante criterio di diagnosi differenziale;

2.3. *Interleuchina-12 (IL-12) e Interleuchina-23 (IL-23)*: insieme all'IFN- γ , rientrano tra i principali protagonisti della risposta dei linfociti T CD4⁺ in senso Th1, con attivazione dell'immunità cellulo-mediata. Da modelli murini, indispensabili nelle conoscenze odierne sulla patogenesi delle MICI, si è visto che IL-12 si configura come il principale protagonista nella perpetuazione del processo infiammatorio cronico a carico dell'intestino.³⁴ Il ruolo della IL-12 è stato rivalutato quando, negli anni 2000, si è scoperta una citochina a essa correlata strettamente, anche dal punto di vista della struttura chimica, che è la IL-23. In particolare, la IL-12 è una citochina eterodimerica composta dalle subunità *p35* e *p40*, mentre la IL-23 è una molecola eterodimerica composta dalla stessa subunità *p40*, con l'aggiunta della *p19*. Considerando che la gran parte degli esperimenti e delle scoperte sulla IL-12 sono stati condotti utilizzando dei composti radio-marcanti che vanno a legarsi alla subunità *p40*, probabilmente, molti dei risultati a cui si è giunti sono dovuti anche all'azione della IL-23. In particolare, si è visto che la IL-23 ha un ruolo nell'attivazione di una cascata infiammatoria che coinvolge anche altre citochine, come il TNF- α , IL-6, IFN- γ e IL-17, a livello dell'intestino.³⁵ Dei risultati simili sono stati rinvenuti anche in processi infiammatori a carico del cervello e delle articolazioni, a prova del suo ruolo-chiave nell'attivazione del processo infiammatorio. La IL-23, in particolare, presenta il suo recettore a livello dei linfociti T_h17 attivati, i quali producono, una volta stimolati, IL-17, che va a indurre la produzione di citochine infiammatorie a partire dai macrofagi attivati, con amplificazione della risposta infiammatoria.³⁵

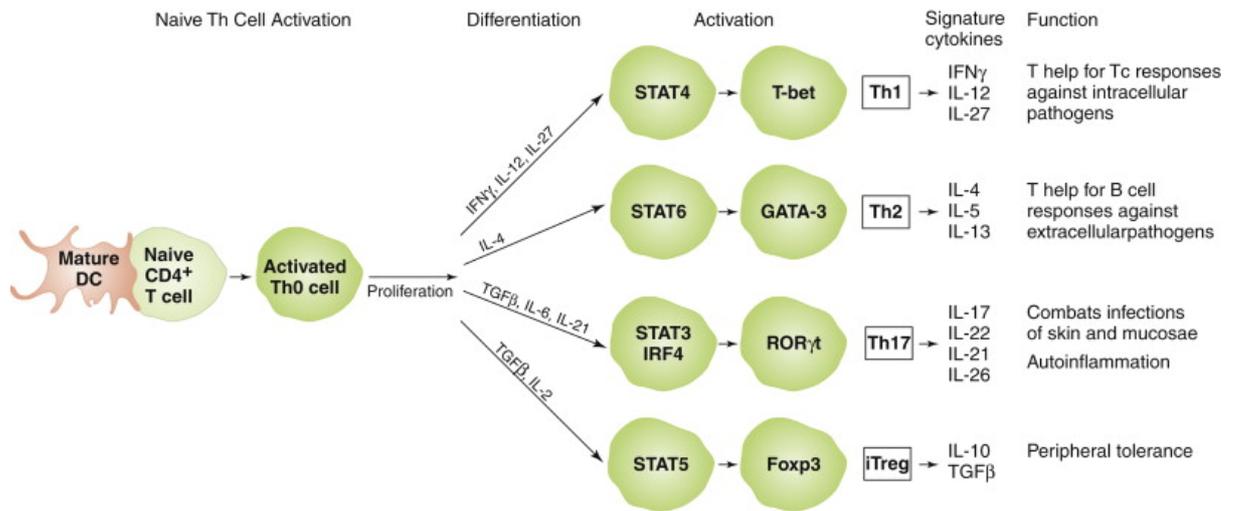


Figura 3 Visione schematica dei diversi tipi di differenziazione a cui può andare incontro un linfocita T_h .CD4⁺ in seguito al contatto con la cellula presentante l'antigene (APC) e l'antigene. Modificato da: Mak, Saunders, e Jett, «Chapter 9 - T Cell Development, Activation and Effector Functions».

2.4. *Tumor Necrosis Factor – alpha (TNF- α)*: si tratta della citochina infiammatoria sicuramente più studiata all'interno delle MICI. Le prime evidenze del possibile ruolo patogenetico del TNF- α all'interno della MC e della RCU risalgono a quando sono stati pubblicati i primi studi che affermano un aumentato livello della citochina all'interno del siero dei pazienti affetti, come anche nelle biopsie mucosali e nei campioni fecali degli stessi.^{25,26,27} Nel periodo strettamente successivo a queste scoperte, le evidenze dello stretto rapporto tra la citochina e la patologia sono state messe in discussione dal fatto che i livelli di TNF- α aumentano anche in caso di colite infettiva²⁸ e molti pazienti con MICI non presentano, comunque, aumentati livelli della citochina²⁹. Il tutto, poi, è stato riportato *in auge* da alcuni studi che affermano l'efficacia del trattamento con anticorpi monoclonali chimerici contro il TNF- α (*cA2* o *Infliximab*) in pazienti affetti da MC³⁰; in questo modo è stata, infine, stabilita una chiara correlazione patogenetica tra la citochina e le MICI. Per approfondirla, sono stati creati diversi modelli murini che simulino la sovrapproduzione di TNF- α (*topi TNF Δ ARE/ Δ ARE*) in modo tale da trovare una possibile correlazione tra la produzione di TNF- α e l'infiammazione a livello intestinale. In questi ultimi modelli omozigoti si sviluppano, entro le 1-4 settimane di età, diverse patologie sistemiche di carattere infiammatorio, come severe poliartriti croniche, importante infiammazione dell'ileo terminale e, a volte, del colon prossimale (oltre anche timo ipoplasico e occasionale infiammazione epatica e

polmonare).³¹ Per i modelli eterozigoti, le alterazioni sono pressoché le stesse, con la differenza che il loro esordio è più tardivo, con le poliartriti a 6-8 settimane di età e una severa MICI a 4-7 mesi di età.³¹ I modelli omozigoti, poi, hanno un calo ponderale e muoiono tra le 5 e le 12 settimane di vita.³¹ È stato, inoltre, dimostrato che l'infiammazione cronica intestinale può essere conseguente a una sovrapproduzione localizzata di TNF- α a livello epiteliale intestinale. Modelli murini omozigoti per una sovrapproduzione localizzata a livello epiteliale di TNF- α (*topi TNF^{i Δ ARE/i Δ ARE}*) sviluppano un'ileite cronica all'età di 16-20 settimane, con aumento dei livelli sistemici della citochina.³² A differenza dei modelli precedenti, però, le manifestazioni sistemiche (come le artriti e l'infiammazione a livello epato-polmonare) sono assenti. I topi eterozigoti per una sovrapproduzione localizzata di TNF, invece, sviluppano solo un debole appiattimento dei villi, con infiammazione scarsa non significativa.³² In definitiva, diversi studi hanno dimostrato che la persistente sovrapproduzione di TNF- α , sia a livello locale sia a livello sistemico, è dannosa e responsabile dell'infiammazione a livello intestinale, insieme a seri problemi di salute fino, anche, alla morte.³³

In conclusione, risulta impossibile determinare uno specifico motivo per cui si sviluppano le MICI in maniera univoca, a dimostrazione del fatto che all'interno dell'intestino vige un equilibrio molto complesso a causa di un enorme carico di antigeni provenienti sia dalla dieta sia dalla flora batterica luminale, con la presenza di un grado d'infiammazione fisiologica. In un intestino sano, questi elementi sono controllati da fini e potenti meccanismi, i quali, però, possono squilibrarsi per svariate ragioni, in parte note in parte no. Inoltre, è impossibile determinare una causa singola dietro ciò, a dimostrazione del fatto che le MICI sono patologie molto eterogenee che presentano una localizzazione e uno sviluppo clinico molto differenti tra loro, che varia da paziente a paziente, con un miscuglio di fattori genetici, immunitari e ambientali che si intersecano tra loro.

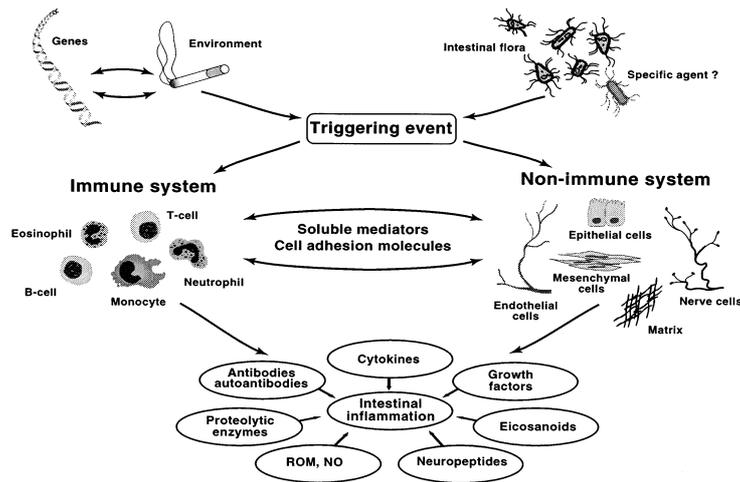


Figura 4 Visione schematica della patogenesi delle MICI, per cui vi sono fattori microbici, ambientali e genetici che portano ad un danno tissutale a livello intestinale, con cooperazione di cellule immunitarie e non, comunicanti tra loro tramite molecole di adesione. Modificato da: Focchi, «Inflammatory Bowel Disease: Etiology and Pathogenesis»

1.1.5. MANIFESTAZIONI CLINICHE

Le manifestazioni cliniche delle MICI variano molto non solo tra RCU e MC ma anche per fenotipo e localizzazione di malattia. Esse si dividono in due grosse categorie: **manifestazioni intestinali** e **manifestazioni extra-intestinali**.

Per quanto riguarda le manifestazioni intestinali, è molto importante distinguere e chiarire le differenze tra le due patologie.

1.1.5.1 MANIFESTAZIONI INTESTINALI DELLA RETTOCOLITE ULCEROSA

In linee generali, il processo infiammatorio all'interno della RCU coinvolge esclusivamente le mucose a livello colico e rettale, con un'estensione che parte sempre dal retto, per poi propagarsi in maniera continua a livello prossimale. Per tale motivo, è nata la classificazione di Montreal per la RCU per cui si distinguono:³⁶

- E1 (*proctite ulcerosa*): con interessamento dell'inflammazione limitato al solo retto, con il punto più prossimale posto distalmente rispetto alla giunzione retto-sigmoidea;
- E2 (*RCU distale o sinistra*): l'inflammazione interessa tutto il colon dal retto (compreso) alla flessura splenica, distalmente a quest'ultima;
- E3 (*RCU pancolica*): dal retto (incluso) prossimalmente verso il cieco, coinvolgendo tutto il colon.

Ciò implica due aspetti principali:

- Per via del solo coinvolgimento mucosale a livello coloretale, le manifestazioni cliniche principali della RCU sono:
 - **Diarrea di tipo infiammatorio**, con presenza/assenza di muco o di sangue, con l'entità che dipende sia dalla localizzazione sia dal grado d'inflammazione;
 - **Urgenza**;
 - **Tenesmo**, come una contrazione spasmodica dello sfintere anale, spesso associata a dolore e accompagnata da un continuo stimolo ad evacuare, senza o con emissione di materiale in modica quantità;
 - **Incontinenza**.
- Per via dell'estensione più o meno ampia, la RCU si può manifestare con:
 - **Anemia sideropenica** da perdite ematiche spesso con le feci (*emotochezia*), come stillicidio ematico (*spotting*) o, più raramente, come sanguinamento attivo rettale (*rettorragia*);
 - **Dolore addominale** con varia localizzazione, per esempio pelvico nella proctite ulcerosa o in fosse iliaca sinistra nella RCU sinistra;
 - **Perdita di peso** da perdita di liquidi per diarrea da disfunzione mucosale colica. Più precisamente, è da inquadrare come un sintomo sistemico complesso aspecifico, dovuto anche alla flogosi cronica insita della patologia;

- **Disionie e segni e sintomi di ipovolemia**, soprattutto in caso di acuzie severe di patologia.

Nel caso di patologie particolarmente gravi e/o non correttamente trattate, il quadro clinico si può presentare con alcune **complicanze**, tra cui:

- **Megacolon tossico**: per definizione si configura come una dilatazione del colon su base non ostruttiva a livello totale (*pancolico*) o segmentario, confermata a livello radiografico con diametri superiori ai 6 cm. Non è una complicanza specifica della RCU, e delle MICI in generale, bensì di tutti i fenomeni infiammatori a livello colico. La principale complicanza a cui si può andare incontro è la **perforazione intestinale**, un'emergenza medico-chirurgica potenzialmente mortale. Oltre al criterio radiografico, nella definizione diagnostica della patologia si devono accompagnare almeno tre dei segni seguenti:
 - **Febbre**, con temperatura corporea maggiore o uguale di 38°C;
 - **Frequenza cardiaca** maggiore di 120 bpm;
 - **Leucocitosi neutrofila**, con una conta di almeno 10500/μL;
 - **Anemia**.

A ciò si deve aggiungere almeno uno dei seguenti segni:

- Disidratazione;
 - Alterazioni del sensorio;
 - Disionie;
 - Ipotensione.
- **Colite fulminante**: si tratta di una forma particolarmente severa di **colite acuta**, la quale si manifesta, stando ai criteri di Truelove e Witts³⁸, con almeno sei scariche di diarrea ematica al giorno accompagnate da segni di tossicità sistemica come febbre, tachicardia, anemia grave fino a esigenza di trasfusione o un aumento della VES. Spesso, si accompagnano segni di sepsi sistemica con leucocitosi, ipotensione e tachicardia. I criteri della colite fulminante sono molto simili a quelli del megacolon tossico con alcune differenze:

- manca la necessità di conferma radiografica di dilatazione colica;
- la terapia è chirurgica d'urgenza, mentre per il megacolon tossico è medica al fine di indurre un'immunosoppressione a livello acuto per sventare il rischio di perforazione, la quale indirizza, eventualmente, alla chirurgia d'urgenza.

Fortunatamente, si tratta di una manifestazione rara della RCU che coinvolge solo circa l'1-2% dei pazienti.³⁹

1.1.5.2 MANIFESTAZIONI INTESTINALI DELLA MALATTIA DI CROHN

Differentemente dalla RCU, la MC presenta un'inflammazione che va a coinvolgere una parte o tutta la parete di uno o più tratti dell'intero tratto gastrointestinale, dalla bocca all'ano. Inoltre, a differenza della RCU, la flogosi è saltuaria, mancando di continuità.

Per tali motivi, il quadro clinico è molto più variabile rispetto alla RCU e dipende strettamente sia dalla localizzazione di malattia sia dal suo comportamento. In particolare, vi è la classificazione di Montreal che permette l'inquadramento della patologia sotto tre aspetti:³⁶

- Localizzazione:
 - L1: la malattia è localizzata a livello dell'ileo;
 - L2: la malattia è localizzata a livello colico;
 - L3: la malattia è localizzata a livello ileocolico;
 - L4: la malattia è localizzata prossimalmente all'ileo, nel tratto gastrointestinale superiore;

- Età alla diagnosi:
 - A1: sotto i 16 anni;
 - A2: tra i 17 e i 40 anni;

- A3: sopra i 40 anni;
- Comportamento:
 - B1: non fistolizzante, non penetrante;
 - B2: stenosante;
 - B3: fistolizzante;
 - Si aggiunge, poi, il parametro p nel momento in cui si aggiunge la malattia perianale, contraddistinta da fistole, ascessi, stenosi e ragadi a livello anale. Si configura come un criterio prognostico negativo sul piano chirurgico, con guarigione delle ferite chirurgiche gravato da numerose difficoltà e alta probabilità di recidiva.⁴⁰

A seconda del particolare fenotipo di malattia e alla sua localizzazione, le principali manifestazioni cliniche a livello intestinale della MC sono:

- **Dolore addominale:** è il sintomo principale e, a volte, l'unico della MC, indipendentemente dalla localizzazione. In particolare, il dolore può essere maggiormente caratterizzato in base alle caratteristiche della malattia, come:
 - Nel caso di ileite terminale, il dolore è localizzato a livello della fossa iliaca destra;
 - Nel caso di **fenotipo stenosante**, è possibile lo sviluppo di un'**occlusione intestinale**, con addome acuto, febbre, distensione addominale e segni di ipotensione e ipovolemia, o di una **sindrome sub-occlusiva**, con alvo chiuso a feci, iperattivazione vagale (sudorazione, giramenti di testa) e dolore addominale acuto dopo 30 minuti-2 ore da pasti particolarmente abbondanti. Si tratta di due conseguenze di differente gravità, con la prima che è una vera e propria emergenza chirurgica a rischio di shock ipovolemico;
- **Diarrea:** è una comune presentazione ma come sintomo può essere fluttuante, infatti la presenza di diarrea persistente e intermittente, in assenza di franca ematochezia e insieme alla compresenza di altri segni e sintomi, è fortemente suggestiva di MC. I meccanismi per cui essa si sviluppa sono molteplici, tra cui:

- Eccessiva secrezione di fluidi e inefficace riassorbimento degli stessi per via della presenza di infiammazione a livello intestinale;
- Nel caso di ileite terminale, in particolare, risulta inefficace il ricircolo enteroepatico di sali biliari, con conseguente steatorrea;
- Fistole entero-enteriche, in caso di estesi segmenti intestinali che vengono bypassati;
- Nel caso di localizzazione colica o presenza di malattia perianale superimposta, è possibile la presenza, anche, di **ematochezia o rettorragia**. Tuttavia, nella maggior parte dei casi, c'è positività solo per sanguinamenti microscopici, con positività al sangue occulto fecale.⁴¹

- **Sintomi e segni sistemici:**

- Febbre, come segno di infiammazione;
- Affaticamento, dovuto sia al malassorbimento sia all'infiammazione cronica;
- **Calo ponderale**, motivo per cui il paziente 'tipico' con MC si configura come molto magro e tendente al sottopeso. Ciò è dovuto sia al malassorbimento sia all'inappetenza, molto comuni nel caso di fenotipo stenotico di patologia.

- **Segni e sintomi di MC fistolizzante:** da uno studio di coorte su 160 pazienti, è emerso che circa il 7% dei pazienti presenta almeno una fistola di qualsiasi tipo ad almeno 30 giorni dalla diagnosi.⁴³

Si dividono diversi tipi di fistole, con diverse manifestazioni cliniche conseguenti:

- Fistola entero-vescicale, che si manifesta con la presenza di feci nelle urine, con ripetute infezioni delle vie urinarie e pneumaturia;
- Fistola entero-enterica, con due parti di intestino, normalmente non comunicanti, che vengono in contatto l'una con l'altra. Di solito è asintomatica o si può presentare come una massa palpabile;
- Fistola retroperitoneale, con ascessi, prevalentemente, a livello dello psoas;
- Fistola entero-cutanea, con il contenuto intestinale che si riversa a livello della cute, con rischio di impetiginizzazioni e dermatiti, dolore locale ed eritrodermia;⁴²

- Fistola perianale, inquadrata all'interno della malattia perianale, con comunicazioni che si formano tra retto e cute o tra ano e cute, con infezione della cute circostante e aumentato rischio di **ascessi**;
- Fistola enterovaginale, con fuoriuscita di aria e feci a livello vaginale nel sesso femminile.

In definitiva, le manifestazioni intestinali della MC sono molteplici e può risultare molto difficile orientarsi. In linee generali, la malattia va sospettata soprattutto in caso di storia di diarrea intermittente recidivante accompagnata da dolore addominale, soprattutto in caso di compresenza di altri segni e sintomi sistemici (come artralgie, febbre etc.), con elevata probabilità a priori.

1.1.5.3 MANIFESTAZIONI EXTRA-INTESTINALI DELLE MICI⁴⁴

Trattandosi di malattie infiammatorie croniche immuno-mediate, le MICI possono essere accompagnate da alcune manifestazioni sistemiche extra-intestinali che possono andare ad aggravare ulteriormente il quadro clinico del paziente. In particolare, alcune di queste condividono il meccanismo di azione con l'infiammazione a livello intestinale e ciò ha permesso una divisione in due grosse categorie:

- **Manifestazioni extra-intestinali immuno-mediate delle MICI:** esse correlano con l'attività di malattia a livello intestinale, condividendo lo stesso meccanismo patogenetico. Tra queste:
 - **Artropatia periferica:** essa si riscontra nel 2.8-31% dei pazienti con MICI, con un interessamento principalmente asimmetrico delle articolazioni, tra cui quelle delle ginocchia e delle anche, riflettendo l'attività di malattia a livello intestinale.⁴⁵ Il rischio di presentare tale manifestazione aumenta nel caso di coinvolgimento colico della patologia, insieme anche alla compresenza di uveite, malattia perianale e altre manifestazioni dermatologiche.⁴⁶ Più precisamente, l'artropatia periferica correlata alle MICI viene divisa in due tipi:

- **Tipo 1 (o pauciarticolare):** coinvolge un numero limitato di articolazioni (<5 articolazioni) e riguarda, principalmente, le grandi articolazioni, quali il ginocchio, l'anca, le spalle e il polso. Presenta una maggiore prevalenza nel caso di RCU (35%, contro il 29% nella MC) e si configura, a livello clinico, come un'inflammatione articolare acuta, asimmetrica, migrante e autolimitante, di durata inferiore alle 10 settimane. A livello radiografico, non vi sono dei reperti specifici, con edema dei tessuti molli e versamento articolare a livello delle articolazioni coinvolte. Si tratta, quindi, di un fenomeno transitorio e di lieve entità che non porta a erosioni, con l'artralgia che regredisce con la remissione di patologia a livello intestinale;

- **Tipo 2 (o poliarticolare):** coinvolge un numero superiore di articolazioni rispetto alla precedente (> 5 articolazioni coinvolte), riguardando, principalmente, le piccole articolazioni, come le articolazioni interfalangee e metacarpofalangee. Presenta una leggera predilezione per la RCU (con 24% di prevalenza rispetto al 20% per MC). L'inflammatione si configura come simmetrica e potenzialmente erosiva, con possibili danni a lungo termine. A livello radiografico, si evidenziano dattilite, entesite e osteopenia periarticolare. A livello di trattamento, l'artralgia può richiedere interventi riabilitativi, come la fisioterapia.

- **Manifestazioni muco-cutanee:** si tratta di quelle, tra tutte le manifestazioni, che risultano maggiormente correlate con l'attività di malattia a livello intestinale. Tra queste:
 - **Eritema nodoso:** ⁴⁷ si tratta di una panniculite che va a interessare principalmente il versante anteriore delle estremità inferiori del corpo (principalmente la coscia e la gamba). Si tratta della manifestazione cutanea più comune, con una prevalenza di circa 3-11% nelle MICI, più alta soprattutto nelle donne di età di 25-40 anni. Clinicamente, si manifesta come un nodulo caldo a esordio improvviso, bilaterale e simmetrico. Non è patognomonico di MICI, con diagnosi differenziale

che deve essere posta con infezioni (principalmente streptococciche), contraccettivi orali, gravidanza, tumori maligni e altre malattie autoimmuni come la sarcoidosi.



Figura 5 Eritema nodoso, multipli noduli eritematosi a livello del ginocchio e della gamba, bilaterali. Modificato da: James Heilman, «A case of erythema nodosum».

- **Pioderma gangrenoso:** si tratta di una rara manifestazione cutanea di MICI, con una prevalenza di 0.4-2%, con valori più alti nelle pazienti di sesso femminile. A livello clinico, si configura come un disturbo debilitante che si sviluppa principalmente in pazienti con malattia severa, con estesi noduli ulcerativi, con foci pustolosi a livello delle superfici estensorie delle estremità inferiori, anche se possono svilupparsi ovunque, anche a livello genitale.⁴⁶ L'eziopatogenesi della lesione riguarda una *cross-reattività* di antigeni intestinali e cutanei, con una risposta immunitaria aberrante che sfocia nella depositazione di proteine a livello vascolare cutaneo.⁴⁸ Come per le manifestazioni precedenti, regredisce dopo un adeguato trattamento dell'infiammazione intestinale della patologia.



Figura 6 Pioderma gangrenoso, nodulo ulcerativo dolente con follicolite suppurativa sovrainposta a livello della metà inferiore della gamba sinistra. Modificato da: Crohnie, «Pyoderma gangrenosum, A medical condition which the body attacks itself in painful ulcers seen in Crohn's patients. This is a picture of the lower half of the left leg».

- **Sindrome di Sweet:** si tratta di una rara manifestazione cutanea di RCU e MC inserita all'interno delle *dermatosi neutrofile*, insieme al pioderma gangrenoso e all'eritema nodoso. A livello clinico, si presenta con febbre, leucocitosi neutrofila e lo sviluppo di un rash papulare con lesioni di colore rosso e dolorose, con la presenza di un infiltrato neutrofilo a livello del derma superiore.⁵¹ Risulta maggiormente presente in caso di malattia attiva e può svilupparsi anche in seguito a terapia immunosoppressiva, rispondendo, poi, a un'intensificazione della terapia.⁵⁰



Figura 7 Sindrome di Sweet, rash papulare diffuso a livello dell'arto superiore (A), cuoio capelluto (B), base del collo (C) e collo (D).⁵⁰

- **Stomatite aftoide:** le afte sono delle ulcere superficiali di forma rotondeggiante che presentano una membrana fibrinosa centrale e un alone eritematoso (Figura 8). Le afte correlate alle MICI non presentano delle particolari caratteristiche e risultano indistinguibili da quelle comuni.⁴⁹ Lesioni di questo tipo possono trovarsi anche all'interno del quadro clinico di altre patologie, come la malattia celiaca, AIDS, la malattia di Behçet e la sindrome di Reiter.



Figura 8 Stomatite aftoide, ulcere rotondeggianti con una membrana fibrinosa centrale e un alone eritematoso.⁴⁹

- **Manifestazioni oculari:** sono manifestazioni molto comuni, con una prevalenza tra 4-12% all'interno dei pazienti con MICI. L'eziologia di queste si sviluppa parallelamente all'infiammazione a livello intestinale e si pensa che si tratti di reazioni immunopatologiche di ipersensibilità.⁵² Tra le più frequenti si ritrovano:
 - **Uveite:** all'interno dell'oftalmologia, le uveiti costituiscono un gruppo molto ampio e complesso di patologie. Tra le molteplici classificazioni all'interno delle uveiti, una prima importante riguarda la localizzazione del processo infiammatorio all'interno dell'uvea (composta da corioide, corpo ciliare e iride) dividendo:
 - **Uveite anteriore:** coinvolge la camera anteriore dell'occhio;
 - **Uveite intermedia:** coinvolge il corpo vitreo;
 - **Uveite posteriore:** coinvolge la retina e la corioide;

- **Panuveite:** coinvolge camera anteriore, corpo vitreo, retina e coroide.

In particolare, l'uveite associata a MICI si configura come ad esordio insidioso, con un decorso cronico e con una presentazione bilaterale. Si tratta, più comunemente, di uveiti anteriori, con cefalea, fotofobia e annebbiamento visivo, con i sintomi che correlano strettamente con l'attività di malattia a livello intestinale.⁴⁶



Figura 9 Immagine stilizzata di un'uveite anteriore, con iperemia congiuntivale ("occhio rosso") e ipopion (liquido denso in camera anteriore). Modificato da Fabliha A. Mukit, MD using an iPad and Procreate app.

- **Episclerite:** si tratta della manifestazione extra-intestinale delle MICI più comune nell'occhio, riguardando circa l'1,4% dei pazienti con MICI.⁵³ Si porta avanti per via dell'infiammazione all'interno dell'episclera, con irritazione oculare lieve-moderata e iperemia congiuntivale perilimbare monolaterale in uno o entrambi gli occhi, accompagnate da una sensazione di bruciore.⁵⁴ Sono assenti fotofobia e dolore oculare, permettendo una rapida diagnosi differenziale con l'uveite e con la sclerite.



Figura 10 Episclerite, iperemia oculare coinvolgente solo una parte del bulbo oculare a livello perilibbare, in assenza di secrezioni ed epifora. Modificato da: Dott. P. Marazzi, «Science Photo Library»

- **Malattie autoimmuni associate alle MICI:** un altro gruppo di manifestazioni extra-intestinali è costituito da tutta una serie di patologie che sono indipendenti dall'attività intestinale e che si portano avanti esclusivamente come conseguenza della diatesi autoimmune che contraddistingue tutti i pazienti con MICI. Tra queste:
 - **Colangite sclerosante primitiva (CSP):** si tratta di una patologia immuno-mediata cronica e progressiva che si configura come la più comune manifestazione a livello epato-biliare della RCU, con una prevalenza tra 2.4-7.5%.⁴⁶ Dall'altro lato, circa l'80% dei pazienti con CSP è affetto anche da RCU, con spesso positività ad autoanticorpi quali i *pANCA*. La patogenesi della CSP non è ancora del tutto nota, ma si presume che siano coinvolte diverse anomalie nell'immunoregolazione, insieme anche ad alterazioni nel microbiota.⁵³ A livello clinico, la patologia si accompagna a una progressiva fibrosi dei dotti biliari intra- ed extra-epatici, che porta a cirrosi epatica e insufficienza d'organo negli stati avanzati. La CSP va sospettata nel caso di pazienti con:
 - Diatesi autoimmune (soprattutto pazienti con RCU);
 - Dolore addominale a livello dell'ipocondrio destro;
 - Stanchezza cronica;
 - Ittero colestatico, con aumento della bilirubina diretta nel sangue e prurito;
 - Calo ponderale;

- Aumentati indici di colestasi (*fosfatasi alcalina e gamma-GT*) e di citolisi epatica (*AST e ALT*);
- **Positività ad autoanticorpi quali pANCA (ANCA con positività perinucleare) e SMA (anticorpi anti-muscolo liscio).**⁴⁵

A livello diagnostico, gioca un ruolo fondamentale la colangiogramma (in prima istanza), con la patologia che deve essere, poi, confermata a livello biotipico previo prelievo tissutale mediante ERCP. A livello di *imaging* sono presenti alcuni reperti tipici, tra cui la presenza di multiple stenosi a livello dell'intero albero biliare con *rami 'a corona di rosario'*, che permettono, una volta che sono state escluse le cause secondarie, l'inquadramento (quasi) inequivocabile di CSP. Si tratta di una patologia che presenta una mediana di sopravvivenza alla diagnosi in assenza di trapianto epatico di circa 10 anni, con **elevato rischio di sviluppo di colangiocarcinoma**, il quale può essere visto, indirettamente, come un'altra manifestazione extra-intestinale delle MICI e della RCU in particolare.⁵⁶

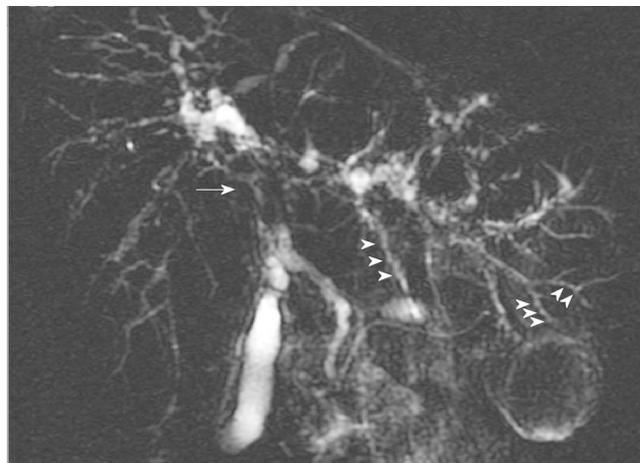


Figura 11 Quadro 'a corona di rosario' alla Colangiogramma in CSP, con stenosi del dotto epatico comune (freccia) e la presenza di dilatazioni a livello di dotti intraepatici (mezze frecce). Modificato da: Selvaraj EA, Culver EL, Bungay H, Bailey A, Chapman RW, Pavlides M. Evolving role of magnetic resonance techniques in primary sclerosing cholangitis. *World J Gastroenterol.* 2019

- **Alopecia areata (AA):** da recenti reviews sistematiche e meta-analisi, si è vista una forte associazione tra MICI e alopecia areata, in particolare il sottotipo *non-scarring alopecia areata (AA)*.⁵⁷ I motivi non sono ancora noti, ma si pensa che i meccanismi patogenetici che portano alla distruzione dell'integrità della

barriera intestinale siano gli stessi che sottendono lo sviluppo di AA. A livello clinico, la patologia si manifesta con la presenza di chiazze circolari separate da peli corti e spezzati ai margini, con aspetto simile a punti esclamativi.



Figura 12 Alopecia areata tipo 'non-scarring', con chiazze di perdita di cuoio capelluto.⁵⁷

- **Spondiloartropatie sieronegative (SpA):** si tratta di un grosso gruppo di patologie reumatologiche accumulate dalla presenza di un'inflammatione pauciarticolare (<5 articolazioni coinvolte) che interessa anche lo scheletro assile, con affezione più o meno marcata delle articolazioni periferiche.

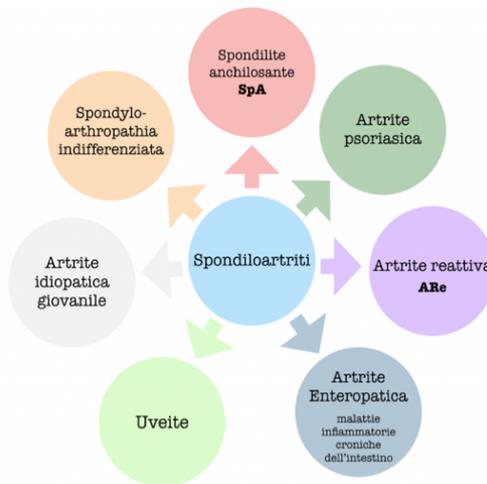


Figura 13 Visione schematica delle spondiloartriti sieronegative. Modificato da: <https://www.hopeinmotion.life/it/vivere-con-spondiloartropatia/>

Un'altra caratteristica comune a tutte le SpA è la negatività ad autoanticorpi, come importante criterio di diagnosi differenziale con altre artriti come l'artrite reumatoide. È importante distinguere, all'interno delle manifestazioni extra-intestinali delle MICI, le SpA con coinvolgimento assiale dalle artropatie periferiche, con le prime che sono indipendenti dall'attività di malattia a livello intestinale e sono più rare (3-5% dei casi)⁴⁶ e le seconde che sono dipendenti dall'attività intestinale e sono più comuni (*vedi prima*). Altre caratteristiche cliniche comuni a tutte le SpA sono la presenza di **entesiti**, ossia infiammazione dei tendini a livello periarticolare sulla loro inserzione a livello osseo, e **dattiliti**, con tumefazione 'a salsicciotto' di una o più dita delle mani e/o piedi.

Le principali SpA che possono ritrovarsi come comorbidità in pazienti con MICI sono:

- **Spondilite anchilosante (AS)**: si tratta di una tra le più comuni SpA con coinvolgimento esclusivamente assiale, portando allo sviluppo di **lombalgia di tipo infiammatorio**, che decorre lontana dall'attività fisica e con aumentata durata di *stiffness articolare* al risveglio (>30 minuti). L'infiammazione a livello del rachide porta, a lungo andare, a danni funzionali e strutturali a questo livello, con conseguente ridotta qualità di vita.⁵⁸ Il principale fattore predisponente conosciuto è la presenza dell'**aplotipo HLA-B27**. La diagnosi si basa essenzialmente sulla clinica, indagando la natura della lombalgia riportata dal paziente e il quadro radiografico del rachide, che mostra quadri variabili di anchilosi (*esito finale naturale della patologia*). Particolarmente suggestiva a livello radiografico è la presenza di sindesmofiti, i quali portano al quadro patognomonico di *colonna vertebrale a canna di bambù* (Figura 14). La stretta correlazione eziopatogenetica tra MICI a AS, sebbene abbiano un decorso indipendente tra loro, è stata dimostrata con l'efficacia del trattamento con farmaci anti-TNF- α (*tra cui Infliximab e suoi biosimilari*) per entrambe le patologie.⁵⁹

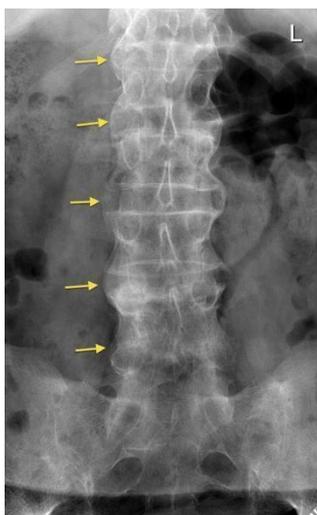


Figura 14 Quadro radiografico di colonna vertebrale 'a canna di bambù', anchilosi con presenza di sindesmofiti (frecce gialle) che formano ponti ossei che si allontanano dallo spazio articolare e che saldano le vertebre l'una all'altra.
 Modificato da: <http://www.svuhradiology.ie>. «Bamboo spine of ankylosing spondylitis»

- **Sacroileite (SI):** si tratta di una patologia strettamente correlata alla AS, con una prevalenza variabile tra 2-45.7% dei pazienti con MICI. A livello clinico, si sviluppa con **erosioni bilaterali e simmetriche a livello dell'articolazione sacroiliaca**.⁶⁰ Nella forma associata alle MICI, SI può esitare in AS nel lungo periodo, manifestandosi con lesioni ossee simmetriche e continue. Risulta molto importante diagnosticare e trattare il prima possibile la SI, in quanto può portare a diverse problematiche quali dolore cronico, astenia ingravescente e danno articolare irreversibile.⁶¹



Figura 15 Quadro radiografico di sacroileite bilaterale, con segni di erosioni, quasi totale scomparsa dello spazio articolare e sclerosi ossea subcondrale a livello dell'articolazione sacroiliaca. Modificato da www.brainspinesurgery.com/sacroiliitis/

- **Artropatie enteropatiche (EnA):** all'interno delle SpA, vi è una categoria a parte per un gruppo di patologie associate allo sviluppo delle MICI, che si ritrova in circa 1:5 pazienti.⁶² Esse si dividono in due gruppi principali:
 - **Oligoartropatia periferica,** o artropatia periferica di tipo 1 o pauciarticolare, già nominata all'interno delle *Manifestazioni extra-intestinali immuno-mediate delle MICI*;
 - **Spondilite:** il coinvolgimento è, principalmente, a livello assiale. È più comune nella MC (5-22%) rispetto alla RCU (2-6%).⁶³ Il suo decorso precede quello dell'enterite e risulta indipendente da essa.⁶⁴ In questi casi, sia la AS sia la SI possono entrare in *overlap*, con progressiva anchilosi sia del rachide (*colonna vertebrale a canna di bambù*) sia dell'articolazione sacro-iliaca.⁶⁵

PERIFERICHE			ASSIALI	
Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Sacroileite isolata	Spondilite
⇒ Pauciarticolare (<5 articolazioni coinvolte)	⇒ Poliarticolare (>5 articolazioni coinvolte)	⇒ Coinvolgimento sia assiale che periferico	⇒ Asintomatica	⇒ Di solito precede l'enterite
⇒ Coinvolgimento asimmetrico	⇒ Sintomi persistono per mesi/anni		⇒ Di solito non progressiva	⇒ Il suo decorso è indipendente dall'attività intestinale di malattia
⇒ Attacchi acuti autolimitanti (<10 settimane)	⇒ Possibili erosioni			
⇒ Correla con attività				

<p>intestinale di malattia ⇒ Principalmente arti inferiori</p>	<p>⇒ Non correla con attività intestinale di malattia ⇒ Forte associazione con uveite</p>			<p>⇒ Il suo decorso è speculare a quello della AS idiopatica ⇒ Forte associazione con uveite e HLA B-27</p>
--	---	--	--	---

Figura 16 Tabella riassuntiva delle principali caratteristiche di tutte le artropatie enteropatiche ⁶⁵

1.1.6. DIAGNOSI

La diagnosi di MICI può essere particolarmente difficile, considerando la loro profonda variabilità clinica. In generale, si parte dalla storia clinica patologica del paziente (prossima e remota) e dall'esame obiettivo generale. Una volta inquadrato il sospetto tenendo conto delle principali manifestazioni cliniche delle MICI, vi sono diverse linee d'indagine diagnostiche a cui i pazienti devono essere sottoposti per confermare la diagnosi:

- **Esami del sangue:** esame emocromocitometrico con formula, markers sierici d'infiammazione (PCR principalmente), profilo marziale, elettroliti e indici di funzionalità epatica, insieme a esami microbiologici sierologici per scongiurare l'ipotesi infettiva.⁶⁶ Trattandosi di malattie infiammatorie croniche, si possono evidenziare:
 - **Anemia da infiammazione cronica:** con emoglobina diminuita, ferritina aumentata e ferro ematico diminuito;
 - **Leucocitosi;**
 - **Piastrinosi;**
 - Aumento degli indici di citolisi epatica, con significato più o meno patologico. La prima cosa da escludere, nel caso di ipertransaminasemia, è la compresenza di CSP, che vedrebbe positività anche degli indici di colestasi, come la *fosfatasi*

alcalina e la *gamma-GT*. In generale, un'ipertransaminasemia può essere una manifestazione extra-intestinale di MICI;

- La PCR correla con l'attività di patologia, soprattutto per RCU;⁶⁷
- **Esami delle feci:** rientrano nell'obiettivo di escludere la patogenesi infettiva del quadro (soprattutto nel sospetto di colite) e confermare la natura infiammatoria del quadro clinico. Tra tutto, risulta molto utile la misurazione della **calprotectina fecale**. Essa è un enzima rilasciato dai neutrofili all'interno del lume intestinale nel caso d'infiammazione a livello locale. Per tale motivo, non si tratta di un marker patologia-specifico bensì di un marker specifico d'infiammazione a livello intestinale. Risulta particolarmente utile per distinguere problematiche di natura funzionale (tra cui IBS) da altre di natura infiammatoria (come le MICI), con la misurazione della calprotectina fecale che potrebbe far risparmiare a molti pazienti esami invasivi di secondo livello come l'endoscopia digestiva.⁶⁸ Si aggiunge, poi, un pannello microbiologico di colture e di ricerca di antigeni a livello fecale, inserito all'interno della diagnosi differenziale della *diarrea di tipo infiammatorio*, comune sia alle coliti infettive sia alle MICI. I principali patogeni che vengono ricercati a livello delle analisi microbiologiche sono:
 - *Tossine A e B del C. difficile* e profilo virologico per *CMV*, soprattutto nei flares di patologia in RCU;
 - *Campylobacter spp*;
 - *Escherichia coli 0157:H7*;
 - *Amebe e parassiti*, nel caso di storia positiva per viaggi e stili di vita a rischio.⁶⁹
- **Sierologia:** si vanno a ricercare auto-anticorpi quali il *p-ANCA* (*positivo in circa il 50-60% dei pazienti con RCU*).⁶⁹ La loro ricerca, ormai, si è limitata alla diagnosi differenziale tra RCU e MC, ma sono troppo poco sensibili perché possano essere inseriti all'interno delle indagini di routine. Allo stesso modo, si possono andare a ricercare gli *ASCA*, i quali sono maggiormente positivi nei pazienti con MC;⁶⁹
- **Indagini endoscopiche:** una volta confermata la natura infiammatoria del quadro clinico, si passa a indagini maggiormente invasive per confermare il sospetto di MICI. Tra queste spicca l'**endoscopia digestiva**. Quest'ultima si porta avanti a livello del tratto GI superiore con esofago-gastro-duodeno-scopia (EGDS) e di quello inferiore

con colonscopia. È importante sottolineare che, nel caso di colite attiva, l'indagine non può essere portata avanti per l'elevato rischio di perforazione; per tale motivo, in questo caso, può essere utile, a livello preliminare, un *RX addome diretto* per valutare alcune complicanze come il *megacolon tossico*. L'indagine endoscopica deve essere portata avanti mediante EGDS e colonscopia, con prelievi biotipici multipli. Per la RCU a livello endoscopico alla colonscopia si notano:

- Nel caso di infiammazione lieve, *eritema, congestione vascolare mucosa e perdita del reticolo vascolare visibile*;
- Nel caso di infiammazione moderata, *mucosa di aspetto granulare, erosioni e mucosa friabile (con sanguinamento al tatto)*;
- Nel caso di infiammazione severa, *sanguinamento spontaneo e ulcerazioni*;
- Nel caso di infiammazione cronica non adeguatamente trattata, si repertano *pseudopolipi, restringimento luminale e perdita delle haustre*.

Tutte queste caratteristiche sono riassunte nel *Mayo Score*, un punteggio calcolato tenendo conto delle principali caratteristiche endoscopiche, come ulcere, eritema, reticolo vascolare più o meno visibile e sanguinamenti, con punteggio da 0 a 3.

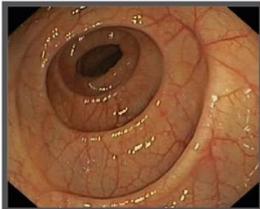
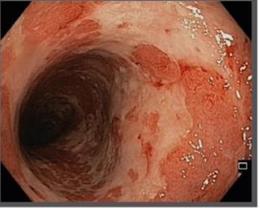
Mayo UC Endoscopic Score = 0 (normal or inactive disease)	Mayo UC Endoscopic Score = 1 (mild disease)	Mayo UC Endoscopic Score = 2 (moderate disease)	Mayo UC Endoscopic Score = 3 (severe disease)
			
			
Normal vascular pattern	Erythema, decreased vascular pattern, mild friability	Marked erythema, absent vascular pattern, friability, erosions	Spontaneous bleeding, ulcerations

Figura 17 Immagini endoscopiche di differenti gradi di infiammazione in RCU in relazione al Mayo Score, con quadri di gravità, da sinistra a destra, lieve con eritema, ridotto pattern vascolare sottomucosa e moderata friabilità (Mayo 1), moderata con marcato eritema, assenza di pattern vascolare con erosioni (Mayo 2) e severa con ulcerazioni e sanguinamento spontaneo (Mayo 3). Modificato da: Dr. Gerald Diaz, «Mayo UC Endoscopic Classification»

Per la MC, viene eseguita, anche, una EGDS per osservare l'eventuale presenza di patologia a livello del tratto gastrointestinale alto. A differenza della RCU, l'infiammazione all'interno della MC è discontinua e profonda, andando a coinvolgere anche l'intera parete. Per tali motivi, i reperti endoscopici sono più variabili e differenti rispetto a quelli della RCU. Tra i principali si ritrovano:

- **Ulcere profonde più o meno estese**, con segni di infiammazione discontinua;
- **Riduzione del lume intestinale**, conseguente a sviluppo di stenosi di tipo infiammatorio o fibrotico;
- **Evidenza di fistole**, nel caso di malattia a comportamento fistolizzante;
- **Aspetto 'a ciottolato romano' della mucosa**, segno di flogosi discontinua con aree interessate da edema mucoso e sottomucoso.

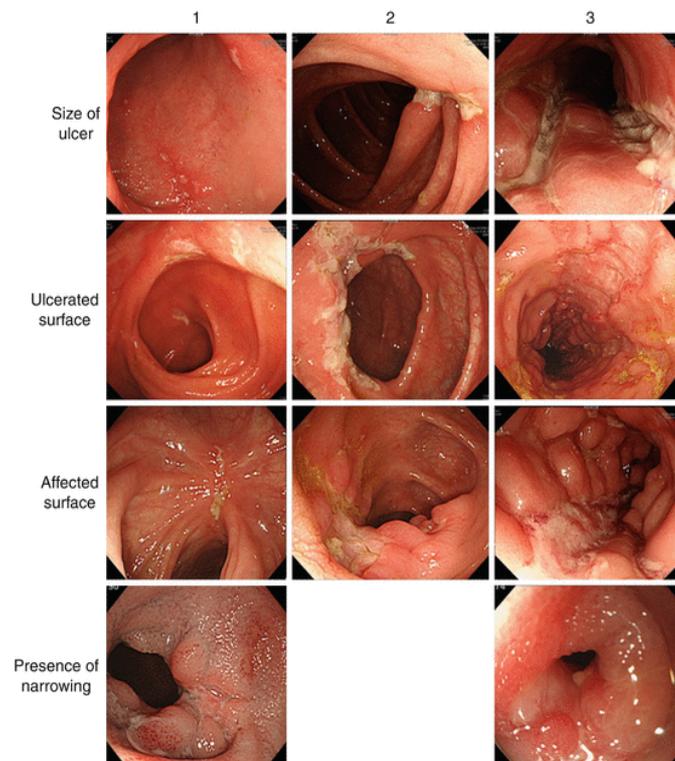


Figura 18 Immagini endoscopiche di MC, con gradi crescenti di ulcerazione, superficie infiammata e stenosi. Particolare aspetto 'a ciottolato romano' nella terza immagine a destra a partire dall'alto. La somma di questi punteggi è riassunta nell'indice SES-CD, andando ad indagare diverse zone del tratto GI alla colonscopia e all'EGDS. Modificato da: Naganuma, «Endoscopic Indices for Crohn's Disease».

All'interno delle tecniche endoscopiche, si annovera anche la **videocapsula endoscopica (VCE)**: si tratta di uno strumento non invasivo di indagine macroscopica endoscopica del piccolo intestino, in zone che sono virtualmente inaccessibili alla visualizzazione diretta.⁷⁸ La VCE, a differenza della entero-RM, risulta particolarmente rilevante nella visione delle alterazioni mucosali a livello del piccolo intestino nella MC, con eritema, ulcere aftoidi e profonde, perdita dei villi e stenosi.⁷⁹ Tutto ciò, però, non è patognomonico di patologia e i reperti della VCE possono mimare altre condizioni, tra cui l'enteropatia da FANS (per tale motivo ne viene sconsigliata l'assunzione fino a 4 settimane prima dalla procedura)⁸⁰, il linfoma del piccolo intestino, la tubercolosi intestinale, la malattia di Behçet e le infezioni opportunistiche legate ad HIV⁸¹. Non è una procedura scevra da complicanze, tra cui:

- **Ritenzione della capsula:** per definizione, la VCE non riesce a passare attraverso il tratto gastro-intestinale entro due settimane dall'introduzione. È un'evenienza maggiormente probabile nei pazienti con sospetta o conclamata MC. In una review sistematica che ha incluso 2538 VCE introdotte in pazienti con sospetta o conclamata MC, si è riportato un tasso di ritenzione del 2.6% in questo gruppo, comparato a un tasso generale di ritenzione pari all'1.4% in 22840 procedure complessive.⁸² Nel momento in cui si verifica, ci sono casi in cui la terapia della MC ha risolto la stenosi permettendo il passaggio della VCE, in altri casi, soprattutto in caso di stenosi su base fibrotica, è stata necessaria la chirurgia o l'endoscopia.
- **Perforazione intestinale**, soprattutto con concomitante ritenzione della VCE;
- **Aspirazione della VCE**, come evenienza rara (1/800 procedure)⁸³.



Figura 19 A sinistra una VCE (PillCam Crohn's). A destra immagini da 'PillCam Crohn's'. In alto, a sinistra duodenite prossimale con ulcera aftoide, a destra ulcera singola di 8 mm in ileo terminale. In basso, a sinistra stenosi a livello digiunale con un'ampia ulcera superficiale, a destra ulcera profonda di 10 mm in colon destro.⁸⁴

- **Esame istopatologico:** una volta prelevati frustoli di tessuto all'interno della seduta endoscopica, questi vengono inviati all'anatomia patologica per indagini istopatologiche, dirimenti nella diagnosi delle MICI. In generale, i principali reperti indagati dall'anatomopatologo nella visione microscopica della patologia sono:
 - **Architettura mucosale:** si ricercano, principalmente, distorsioni della morfologia delle cripte. Normalmente, queste sono dritte, parallele e si estendono dalla superficie fino quasi alla muscolaris mucosae. Nelle MICI si osservano alterazioni delle cripte come irregolari nella disposizione, dilatate, ramificate e/o accorciate. Tutto ciò si traduce in infiammazione in corso o un processo di rigenerazione;⁷⁰
 - **Cellularità sottomucosale e nella lamina propria;**
 - **Infiltrazione di granulociti neutrofili nella mucosa:** è la caratteristica principale di malattia attiva, con presenza di polimorfonucleati a livello della superficie epiteliale della superficie delle cripte, dando un quadro anche noto come *criptite*, con possibile formazione di ascessi. È un reperto sempre patologico;⁷¹

- **Anormalità epiteliali:** tra queste si nominano deplezione di mucina con la riduzione delle cellule caliciformi mucipare, cambiamenti metaplastici (come la metaplasia pseudo-pilorica nella MC ileale cronica e la metaplasia a cellule di Paneth) e danni della superficie epiteliale (come ulcerazioni, erosioni e perdite cellulari focali). Nessuna di queste si configura come patognomica né di MICI, né di MC, né di RCU.⁷²

Sebbene tutte queste caratteristiche siano molto utili nella diagnosi di MICI, non sono caratteristiche di nessuna delle due patologie e, in alcuni casi, la diagnosi differenziale può essere complessa. In generale, è possibile delineare alcune caratteristiche microscopiche che permettono la distinzione delle due patologie, tra cui:

- Per la RCU, i reperti patologici possono essere rinvenuti solo a livello della mucosa e, a volte, a livello della sottomucosa superficiale. Inoltre, l'infiammazione è continua e i cambiamenti risultano essere particolarmente evidenti a livello del retto e del colon distale. A livello delle cripte, sono maggiormente comuni gli ascessi e alla loro base è possibile cogliere, in alcuni casi, degli aggregati linfoidi o centri germinativi.⁷³ Un'altra caratteristica peculiare è la presenza di plasmacellule a livello della lamina propria, che prende il nome di *plasmacitosi basale*.

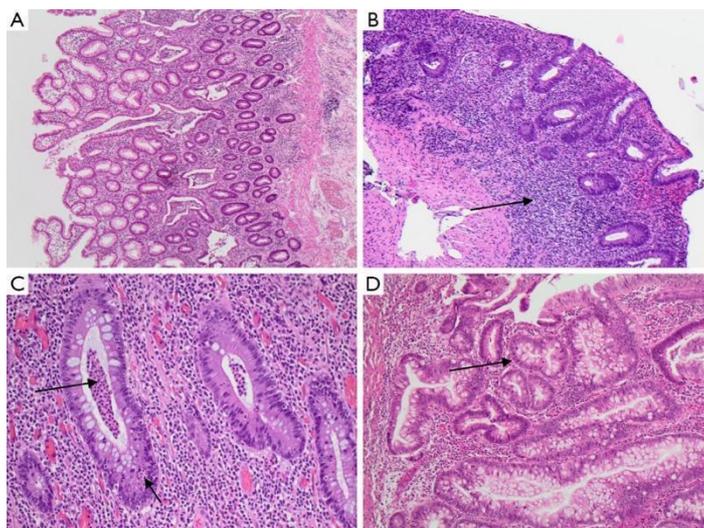


Figura 20 Istopatologia della RCU (colorazione H&E). (A) Distorsione delle cripte e plasmacitosi basale. (B) Denso infiltrato infiammatorio alla base delle cripte. (C) Malattia attiva, con criptite e infiltrazione di neutrofili nella mucosa. (D)

- Per la MC la flogosi è segmentaria, con variabilità del quadro infiammatorio sia a livello della singola biopsia sia tra biopsie dello stesso segmento intestinale. Per tale motivo, la presenza di distorsioni focali delle cripte è suggestiva di MC piuttosto che RCU.⁷⁴ Inoltre, il fenomeno infiammatorio è transmurale e le cellule infiammatorie invadono la parete intestinale oltre la sottomucosa, portando a ulcere profonde, stenosi e fistole. Si configura come patognomonico di MC la presenza di almeno un **granuloma non caseoso, in presenza di alterazione delle cripte**.⁷⁴

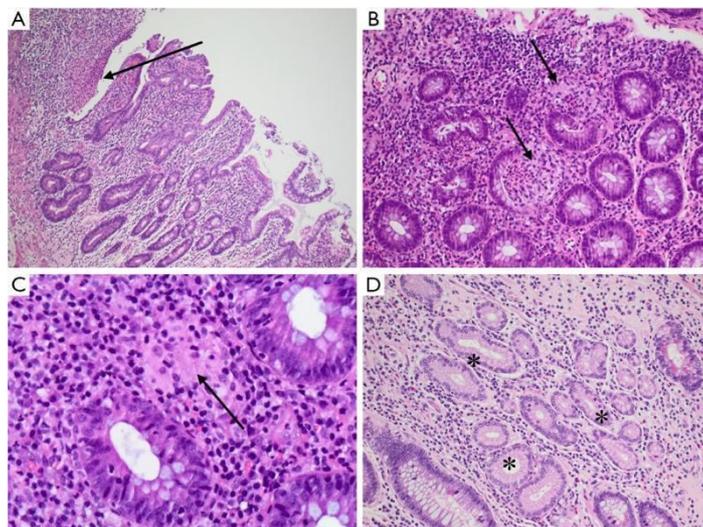


Figura 21 Istopatologia di MC (colorazione H&E). (A) Flogosi segmentaria, con ulcere profonde. (B) Granulomi in presenza di cripte distorte (reperto non specifico di MC). (C) Granuloma non caseoso (freccia). (D) Metaplasia pseudopilorica (tipica di MC cronica). Modificato da: Kellermann e Riis, «A Close View on Histopathological Changes in Inflammatory Bowel Disease, a Narrative Review»

- **Indagini radiografiche:** sono particolarmente rilevanti soprattutto nello studio della MC nel piccolo intestino, non indagabile interamente tramite endoscopia. Tra queste:
 - **Entero-risonanza magnetica (Entero-RM):** *gold-standard diagnostico* per osservare il piccolo intestino, molto importante per determinare l'estensione della MC e le complicanze a essa correlate.⁷⁵ Trattandosi della tecnica di *imaging* con la più alta risoluzione di contrasto, l'entero-RM risulta particolarmente precisa nell'evidenziare la presenza di fluidi e di edema sottomucoso, su piani diversi e utilizzando diversi parametri funzionali (come motilità, perfusione, diffusione) senza l'impiego di radiazioni ionizzanti,

rendendola la metodica di scelta di analisi del piccolo intestino soprattutto nella popolazione più giovane affetta da MC.⁷⁶ Tra le principali indicazioni alla entero-RM sono incluse:

- **Analisi anatomica del piccolo intestino, della localizzazione di malattia e dell'estensione segmentale;**
 - Valutazione morfologica del piccolo intestino (parete, mesentere, irrorazione vascolare e linfonodi);
 - **Valutazione dinamica (neoangiogenesi e attività di malattia);**
 - Determinazione del parametro B della classificazione di Montreal per MC, evidenziando la presenza di eventuali stenosi o fistole;

 - Follow-up dei pazienti con MC;
 - **Sospetta riaccensione di malattia, malattia stenotante e/o complicanze extra-luminali;**
 - **Monitoraggio della risposta terapeutica o del suo fallimento;**
 - Pianificazione della chirurgia.⁷⁷
- **Ecografia intestinale transaddominale:** recentemente, l'ecografia intestinale transaddominale è diventata uno degli esami strumentali di prima linea sia nella diagnosi sia nel follow-up della MC, raggiungendo valori di sensibilità tra l'84-93%. Tra tutto, risulta particolarmente utile nell'identificare precocemente alcune complicanze, come la stenosi, flemmoni, ascessi e fistole.⁸⁵ I reperti ecografici risultano, però, meno specifici e, per tale motivo, si tratta di una metodica particolarmente utile nel follow-up del paziente già noto con MC. Mediante l'ausilio di tecniche come il *color* e il *power Doppler* e l'impiego di mezzi di contrasto è possibile analizzare:
- **Aumento dello spessore di parete e ipervascolarizzazione delle aree infiammate;**
 - **Fistole;**
 - Ascessi;
 - Stenosi;
 - Linfadenopatie mesenteriche.

In definitiva, sebbene l'endoscopia si configuri come il gold-standard nella diagnosi delle MICI e della MC, le tecniche di imaging (come la entero-RM e l'ecografia) possono fornire informazioni non solo sul versante luminale della parete intestinale bensì anche delle strutture sierose e periferiche. La entero-RM ha la più elevata risoluzione di contrasto, con il contro dato principalmente dal costo; mentre l'ecografia è economica, ripetibile e di pronto utilizzo, con il contro dato principalmente dalla risoluzione che è estremamente operatore-specifica.⁸⁵

1.1.7. TERAPIA

Oggi, la terapia delle MICI ha come obiettivo principale quello di indurre e mantenere il paziente in remissione, migliorando e prevenendo le complicanze secondarie. I **glucocorticoidi**, gli **aminosalicilati** e alcuni **agenti immunosoppressori** come l'*azatioprina* sono usati di routine.⁸⁶

Il principale obiettivo della diagnosi e del trattamento della RCU è quello di ridurre i sintomi e migliorare la salute del paziente, allo scopo di mantenere la malattia a uno stadio fisso ed evitare il trattamento chirurgico.⁸⁷ Prima dell'inizio del trattamento, inoltre, è necessario determinare il tipo di patologia, mediante un iter diagnostico preciso e mirato, per capire lo stato della malattia e la sua estensione. È importante, poi, capire la risposta del paziente ai trattamenti, in quanto può essere trattata con trattamenti medici e cambiamenti dello stile di vita.⁸⁸

Per il trattamento della MC, questo risulta gravato dal fatto che è una patologia con un'estrema variabilità clinica sia in termini di comportamento (parametro *B* della classificazione di Montreal) sia in termini di localizzazione (dalla bocca all'ano). Per tale motivo, i principali obiettivi della terapia sono:

- Trattamento clinico e miglioramento della condizione clinica individuale;
- Riduzione e prevenzione delle complicanze della patologia per il paziente;

- Miglioramento della qualità di vita;
- Ridotta tossicità del trattamento;
- Supporto nutrizionale per il paziente;
- Evitare il più possibile la necessità alla chirurgia.⁸⁸

Il primo passo nel trattamento delle MICI è la terapia farmacologica. La pratica clinica prevede, di solito, la prescrizione di farmaci per gradi. All'inizio, si parte con quelli meno dannosi e, se questi non funzionano, si passa a farmaci più tossici. In generale, vengono prescritti **corticosteroidi, aminosalicilati, antibiotici, farmaci di supporto e farmaci immunosoppressori**. Da linee-guida di vari Stati, gli aminosalicilati possono essere usati nel trattamento di patologia di gravità lieve-moderata, con la loro efficacia che dipende strettamente dal dosaggio impiegato.^{89,90} I corticosteroidi entrano, poi, in gioco in caso di malattia moderata-severa per migliorare i sintomi. In sintesi, lo stadio iniziale della terapia delle MICI consiste nella somministrazione di agenti anti-infiammatori e/o immunosoppressori.

Tra gli **amino-salicilati** principalmente impiegati si trovano:

- Sulfasalazina (*Salazopyrin* ®): è un farmaco che, una volta assunto per via orale, viene metabolizzato dai batteri della flora intestinale, con produzione di *sulfapiridina* (ad azione antibatterica) e di *acido 5-aminosalicilico* (noto anche come *mesalazina*) della classe dei FANS. È la *mesalazina* che, poi, abbassa l'infiammazione e assurge alle funzioni a scopo terapeutico;
- Mesalazina (*Mesavancol* ®, *Pentasa* ®, *Pentacol* ®, *Asacol* ®): simile al precedente, con la differenza che se il primo è un profarmaco che lo contiene, questo è un farmaco già in forma attiva. In entrambi i casi, l'aspetto principale è che il farmaco svolge la sua azione anti-infiammatoria principalmente a livello della mucosa gastro-intestinale. Appartenendo, comunque, alla classe dei FANS, vi sono diverse controindicazioni che devono essere tenute in considerazione nella sua prescrizione:

- Allergia/intolleranza ai salicilati in senso lato (tra cui la mesalazina);
- Pazienti con grave insufficienza renale;
- Pazienti con storia di ulcera gastrica o duodenale;
- Pazienti con diatesi emorragica;
- **Pancreatite**, sebbene molto rara, è molto importante tenere d'occhio gli indici ematici di *lipasi* e *amilasi* perché può essere potenzialmente molto grave.

Si aggiungono, poi, i **corticosteroidi**, i quali hanno un'azione sia anti-infiammatoria sia immuno-soppressoria. Tra i principali si riportano il *prednisone* (o *Deltacortene* ®) e la *budesonide* (o *Intesticort* ®) o la *budesonide dipropionato* (*Clipper* ®), con questi due ultimi che sono dei *glucocorticoidi a bassa biodisponibilità orale*, esplicando la loro azione terapeutica principalmente a livello del tratto gastroenterico. In generale, si configura come il principale *tool* terapeutico soprattutto in corso di acuzie data l'assenza di latenza dell'azione del farmaco e la presenza di bassa tossicità acuta. Come tutte le patologie croniche, anche le MICI possono trasformarsi in steroideo-resistenti, richiedendo altri presidi terapeutici in corso di acuzie di malattia. Tra i vantaggi dei corticosteroidi nel trattamento delle MICI si inseriscono:

- Possibilità di formulazioni farmaceutiche che riducono l'assorbimento sistemico: ne sono esempi il *Clipper* ® e l'*Intesticort* ®, i quali si configurano come particolarmente efficaci soprattutto nelle forme di malattia lieve-moderata, con il vantaggio di ridurre gli effetti avversi sistemici dei corticosteroidi;
- Rapidità di azione: se somministrati per endovena e a dosi adeguate, possono spegnere la risposta auto-immune e impedire lo sviluppo di complicanze potenzialmente letali come il *megacolon tossico* per la RCU e la perforazione intestinale per MC. Ciò risulta particolarmente rilevante in contesti intra-ospedalieri, con pazienti che possono presentare episodi di riaccensione particolarmente importanti e clinicamente rilevanti;

- Ridotta tossicità acuta, con particolare attenzione, però, ai soggetti *diabetici* o *intolleranti al glucosio* e ai soggetti *gravemente ipertesi*, in quanto l'innalzamento della glicemia e della pressione arteriosa sistemica possono essere importanti e rapidamente progressivi in soggetti predisposti.

Tra gli svantaggi principali si ritrova, senza dubbio, un ampio quadro di **effetti avversi**, che devono essere conosciuti e prevenuti il più possibile soprattutto nei pazienti che hanno usufruito della terapia steroidea per molto tempo. Tra le principali complicanze della terapia a lungo termine, si ricordino:

- **Osteoporosi e rischio di necrosi avascolare della testa del femore:** soprattutto in pazienti anziani che presentano già osteoporosi e un elevato rischio di frattura, questo può essere un fattore precipitante e portare a fratture patologiche potenzialmente molto gravi;
- **Intolleranza glucidica e iperglicemia:** sono considerati farmaci *diabetogeni* perché riducono la sensibilità insulinica a livello sistemico, causando un aumento dei livelli di glicemia;
- **Aumentata suscettibilità allo sviluppo di infezioni:** questo è un aspetto da tenere in considerazione soprattutto a dosi immunosoppressive elevate, inducendo una riduzione importante dei linfociti con un'azione anti-linfoblastica;
- **Cataratta e glaucoma:** soprattutto la cataratta, è un problema particolarmente rilevante soprattutto in pazienti anziani che, di per sé, sono maggiormente a rischio di cataratta, con un rischio relativo che si innalza considerevolmente in caso di pregressa terapia con corticosteroidi;
- **Tossicità gastrointestinale:** la tossicità gastrointestinale degli steroidi può essere sovrapposta a quella dei FANS, con i due effetti che possono andare in sinergia l'uno con l'altro. La tossicità è principalmente a livello del tratto GI superiore (al di sopra della flessura duodeno-digiunale), con maggiore rischio di **gastrite acuta e ulcera peptica**, insieme a **dispepsia e nausea/vomito**. Per tale motivo, è molto importante

mettere in diagnosi differenziale alcuni sintomi delle MICI (della MC in particolare) con la tossicità correlata all'utilizzo degli steroidi.

Per quanto riguarda l'uso di **antibiotici**, essi hanno principalmente un ruolo profilattico all'interno delle possibili complicanze dell'infiammazione a livello dell'apparato gastrointestinale associata alle MICI. Sebbene, teoricamente, possa essere un potenziale trattamento della patologia, la quale vede una risposta aberrante del sistema immunitario verso la flora intestinale, le evidenze oggi sono troppo poche perché ciò possa essere confermato.⁹¹ Le evidenze, oggi, di efficacia della terapia antibiotica nel trattamento si limitano a poche forme specifiche di malattia, come:⁹¹

- la malattia perianale all'interno della MC, la quale beneficia della *ciprofloxacina* (con o senza il *metronidazolo*) come adiuvante della terapia immuno-modulatoria;
- le forme lievi-moderate di MC possono essere trattate con antibiotici vari (come *metronidazolo*, *ciprofloxacina* e *rifaximina*), con miglioramento dei sintomi e riduzione del rischio di riacutizzazione;
- nella RCU, il ruolo è ancora dibattuto e, oggi, si limita esclusivamente ai casi gravi complicati, come la colite fulminante, riducendo il rischio di progressione e di coinvolgimento settico della flora residente conseguente all'infiammazione della parete colica.

L'uso deve essere, comunque, giudizioso e basato sul singolo paziente e sulla specifica forma di malattia che ella/egli presenta, con l'obiettivo di ridurre al minimo il rischio di antibiotico-resistenza e lo sviluppo di ceppi multi-resistenti.

In ultima battuta, si annoverano gli **agenti immunomodulatori**, tra i quali spiccano le *tiopurine* (*azatioprina* e la *6-mercaptopurina*). Esse si configurano come *antimetaboliti* che inibiscono la sintesi delle purine, ostacolando l'espansione clonale dei linfociti e il mantenimento e l'accrescimento della risposta immunitaria. Al giorno d'oggi, sono ampiamente usate nel trattamento delle MICI e, principalmente, nel mantenimento della remissione nelle forme di malattia steroideo-dipendenti e nel trattamento delle forme severe di RCU insieme alla ciclosporina. Ci sono anche evidenze, poi, di un suo ruolo nella riduzione del rischio di recidiva post-chirurgica soprattutto nella MC. Si calcola che circa il 30-40% non risponde al trattamento

e che il 10-20% dei pazienti sviluppa reazioni avverse, tra cui la temibile *pancreatite acuta*, particolarmente grave e da tenere sempre in considerazione. La maggior parte degli **effetti avversi** è su base idiosincrasica, tra cui:

- pancreatite acuta;
- artralgie;
- febbre e rash cutaneo;
- epatotossicità.

Per aumentare il profilo di sicurezza e ridurre al minimo le dosi efficaci e il rischio di sviluppo di effetti avversi dose-dipendenti (come la *mielotossicità* del farmaco) risulta particolarmente utile e *cost-effective* la determinazione dell'attività enzimatica della tiopurina metil-transferasi (TPMT) che presenta un'alta variabilità a livello della popolazione generale con i suoi molteplici polimorfismi. Nel caso di polimorfismi dell'enzima per cui l'attività metabolica risulta assente o limitata, sarà presente o una controindicazione alla terapia (per via della sua aumentata tossicità) o un'indicazione ad un dosaggio più basso. Nel caso in cui l'attività enzimatica è normale, la terapia può essere iniziata a dosaggio standard per il trattamento delle MICI, ossia *2.5 mg/kg/die* per l'azatioprina e *1.5 mg/kg/die* per la mercaptopurina. Come per tutte le terapie immunosoppressive, aumenta il rischio di sviluppo di neoplasie per la perdita della sorveglianza immunitaria; in particolare per le tiopurine si è visto un aumento del rischio di sviluppo di neoplasie ematopoietiche come i linfomi e di neoplasie solide come il *non-melanoma skin cancer* e i carcinomi del tratto genito-urinario.⁹²

Una trattazione a parte viene riservata ai **farmaci biologici**, che si configurano come i principali protagonisti nel panorama terapeutico attuale delle MICI dal momento che hanno migliorato considerevolmente la storia e la prognosi della malattia. I farmaci biologici impiegati nel trattamento delle MICI sono, essenzialmente, anticorpi monoclonali diretti contro diverse vie molecolari che alimentano il processo infiammatorio insito nella patologia. Tra questi:

- **anticorpi monoclonali contro il *TNF α*** : sono i farmaci che hanno maggiormente rivoluzionato la terapia delle MICI e tra questi si ritrovano *Infliximab*, *Adalimumab*,

Certolizumab pegol e *Golimumab*. Sebbene agiscano sullo stesso target, sono farmaci differenti sotto diversi punti di vista, tra cui la struttura (alcuni sono chimerici, altri umanizzati, altri umani) e l'emivita (in media intorno ai 10 giorni). Il principale aspetto da tenere in considerazione nell'impiego di questi trattamenti è l'aumentato rischio di infezioni, sia comuni sia opportunistiche. C'è da sottolineare che, comunque, spesso i pazienti con MICI ricevono la terapia con anti-TNF α insieme ad altri farmaci come i corticosteroidi e/o le tiopurine/metotrexato, con un'immunosoppressione conseguente che può essere particolarmente importante. Circa il rischio infettivo di contrarre infezioni gravi a livello clinico, sono stati raccolti dati in alcuni registri soprattutto per la sicurezza a lungo termine della terapia in 6.237 pazienti statunitensi con MICI (3.440 trattati con *Infliximab* e 2.833 trattati senza *Infliximab*). Il registro in cui sono stati inviati i dati è il *TREAT (Therapy, Resource, Evaluation, and Assessment Tool Registry)* e sono stati riportati 2.15 eventi per 100 persone l'anno nei pazienti trattati con *Infliximab*, contro il tasso di incidenza di 0.86 eventi per persone l'anno nel gruppo non trattato con *Infliximab*, con un rischio relativo di 2.46 (95% CI 1.80-3.36).⁹⁴ Tra le principali infezioni riportate in corso di trattamento con anti-TNF-alpha si ritrovano: infezioni polmonari (24.2%), tratto gastro-intestinale (22.5%) e della pelle (17.2%); le più comuni infezioni opportunistiche sono quelle virali.⁹⁵ La riattivazione della tubercolosi in stato latente è un rischio noto della terapia con anti-TNF α , sebbene numerosi studi abbiano dimostrato, comunque, una bassa incidenza di infezione. All'interno dello stesso registro TREAT, l'incidenza riportata è stata di 0.01 ogni 100 persone l'anno e solo due casi riportati all'interno nel gruppo con trattamento con *Infliximab*.⁹⁴ Insieme alla tubercolosi, un altro rischio risiede nell'infezione da HBV, con rischio particolarmente aumentato nei pazienti che presentano positività all'HBsAg prima della terapia. In ultima analisi, risulta rilevante l'aumentato rischio di sviluppo di neoplasie maligne. Da numerosi studi si è visto un rischio *non* maggiore rispetto alla popolazione generale nel caso di monoterapia con anti-TNF α , ad eccezione di alcune neoplasie ematopoietiche quali i linfomi. Per quanto riguarda il melanoma, la correlazione con le MICI è nota e risulta particolarmente difficile stabilire se l'aumentato rischio di sviluppo di melanoma sia associato alla patologia di per sé o alla terapia con anti-TNF α , con risultati da studi contrastanti.⁹⁶ Stando allo stesso registro *TREAT*, il rischio di sviluppo di neoplasie maligne nei pazienti in monoterapia con anti-TNF α non risulta particolarmente aumentato rispetto a quello dei pazienti che ricevono una terapia convenzionale (RR 0.8; 95% CI 0.66-1.19).⁹⁴ In sintesi, quindi, multipli

studi e registri clinici hanno valutato la sicurezza a lungo termine delle terapie anti-TNF- α , riportando un aumentato rischio di infezioni opportunistiche. A livello oncologico, la terapia risulta rischiosa nello sviluppo di neoplasie oncoematologiche come i linfomi. La correlazione con altre neoplasie come il melanoma risulta, ancora, non chiara.⁹³

	Infliximab	Adalimumab	Golimumab	Certolizumab
Structure	Chimeric mAb	Human mAb produced by phage display	Human mAb produced in Transgenic mouse	PEGylated Fab mAb fragment
Molecular weight (kDa)	150	150	150	~95
Half life	8–10 days	10–20 days	7–20 days	~14 days
Ligands	sTNF, tmTNF	sTNF, tmTNF	sTNF, tmTNF	sTNF, tmTNF
Neutralisation potency for sTNF	+++	+++	+++	+++

Figura 22 Visione schematica dei principali anticorpi monoclonali contro il TNF α , con informazioni sulla farmacocinetica (half life) e sulla farmacodinamica (ligandi e potenza di neutralizzazione del TNF sierico).

- **Anticorpi monoclonali anti-integrine:** gli unici farmaci che bloccano l'azione delle integrine di membrana approvati, ad oggi, nel trattamento delle MICI sono il *Natalizumab* e il *Vedolizumab (VDZ)*. *Natalizumab* è stato il primo ad essere approvato nel trattamento della MC ed ha come target l' $\alpha4$ -integrina che si lega al recettore della VCAM a livello di tutto l'endotelio vascolare, incluso il cervello, permettendo la diapedesi dei leucociti dal torrente sanguigno. Per tale motivo, il suo rischio principale risiede nella riattivazione di infezioni a livello cerebrale come quella da *JCV*, con rischio di leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML) ad esso associata. Dall'altro lato, *VDZ* è un anticorpo monoclonale intestino-selettivo, in quanto si lega all'integrina $\alpha4\beta7$, che si lega alla molecola di adesione MAdCAM, presente esclusivamente a livello dell'endotelio vascolare mucosale intestinale. Data questa specificità, manca dell'effetto a livello cerebrale come *Natalizumab* ed è stato approvato nel trattamento della MC e della RCU moderato-severa. I dati sulla sicurezza del *VDZ* sono stati inseriti all'interno di analisi integrate di numerosi trials clinici come il *GEMINI*, che ha riportato gli eventi avversi del farmaco durante l'osservazione di un

totale di 2830 pazienti sotto trattamento per quattro anni. I tassi di incidenza di infezione sono stati inferiori all'interno dei pazienti sotto *VDZ* rispetto al placebo, con valori di 63.5 ogni 100 pazienti l'anno (95% CI 59.6-67.3) per il primo gruppo contro 82.9 per 100 pazienti l'anno (95% CI 68.3-97.5) per il secondo.⁹⁸ Come per le altre terapie biologiche, sono stati aggiunti dati sul rischio di sviluppo di neoplasie maligne, con circa 18 pazienti che hanno sviluppato neoplasie gastrointestinali e dermatologiche. Tutti questi pazienti avevano già ricevuto precedentemente terapie con tiopurine e almeno un'altra terapia biologica precedentemente a *VDZ*.⁹⁸ I risultati in quest'ultimo aspetto non sono stati del tutto dissimili a quelli all'interno del gruppo trattato con placebo (0.6% vs 0.2%). In sintesi, il *VDZ* è un farmaco anti-integrina intestino-selettivo efficace nel trattamento delle MICI e con un buon profilo di sicurezza.

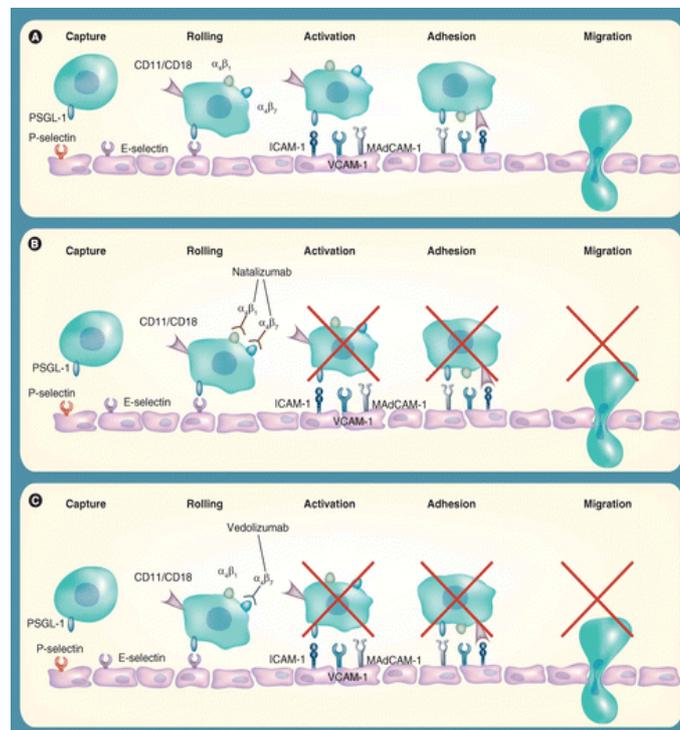


Figura 23 Immagine schematica del meccanismo d'azione di Vedolizumab: il farmaco va a bloccare il processo di diapedesi dei leucociti attraverso l'endotelio vascolare mucoso intestinale, riducendo l'infiammazione e i sintomi del paziente.⁹⁸

- **Anticorpi monoclonali anti-interleuchine-12/23:** si tratta della classe più innovativa di farmaci biologici impiegati nel trattamento delle MICI, di cui l'unico approvato, ad oggi, è *Ustekinumab (USK)*. *USK* blocca il rilascio di citochine legando la subunità *p40* della *IL-12* e della *IL-23*. Il farmaco è stato approvato nel 2016 nel trattamento della MC moderato-severa e nel 2019 per la RCU moderato-severa.⁹³ I dati sulla sicurezza

del farmaco sono stati riportati nel registro *PSOLAR*, in cui sono stati inseriti pazienti con psoriasi trattati con farmaci biologici e con terapie non biologiche. Sono emersi dati per cui l'incidenza di gravi infezioni è stata di 0.83 per 100 pazienti l'anno (95% CI 0.61-1.09) per il gruppo trattato con *USK* e 1.28 per 100 pazienti l'anno (95% CI 0.73-2.09) per il gruppo trattato con terapia non biologica. All'interno dello stesso registro, non è stato riportato un aumento significativo del rischio di sviluppo di neoplasie maligne.⁹⁹ In definitiva, *USK* risulta un importante *tool* terapeutico nel trattamento delle MICI, con un profilo di sicurezza consolidato nel panorama sia delle MICI sia della psoriasi.

- **Inibitori della *Janus Chinasi* (JAK-inibitori):** sono farmaci impiegati nel trattamento della RCU moderato-severa e sono le prime *small molecules* a somministrazione orale approvate nel trattamento delle MICI. Ad oggi, l'unico approvato è il *Tofacitinib*, il quale ha come target diverse citochine, modulando diverse vie infiammatorie, e diversi messaggeri che veicolano la leucogenesi, con un'importante immunosoppressione conseguente alla sua somministrazione.¹⁰⁰ Una recente review sistematica e metanalisi di 82 studi (con un totale di 66.159 pazienti) ha valutato la sicurezza dei Jak inibitori nelle MICI e in altre patologie immuno-mediate. In particolare, è stata riportata un'incidenza di effetti avversi di 42.65 per 100 persone l'anno e un'incidenza di eventi avversi gravi di 9.88 per 100 persone l'anno.¹⁰¹ Nei vari trials effettuati con l'impiego di *Tofacitinib* nel trattamento della RCU il rischio infettivo riportato è risultato dose-dipendente (39.8% con dose di 10 mg, 35.9% con 5 mg e 24.2% nel braccio del placebo).¹⁰² Tra queste infezioni, quella (se non l'unica) particolarmente rilevante è quella da *Herpes Zoster*, con un rischio relativo di sviluppo di 1.57 (95% CI 1.04-2.37).¹⁰¹

Più del 25% circa dei pazienti nei trials *OCTAVE* hanno presentato profili ematici di dislipidemia con aumento del colesterolo totale, delle LDL e con abbassamento delle HDL.¹⁰¹ In una recente meta-analisi, solo il 4.8% dei pazienti sotto *Tofacitinib* ha richiesto una terapia ipolipemizzante e solo l'1.5% ha richiesto un aumento della dose della terapia già presente in precedenza.¹⁰³

Negli stessi trials, l'incidenza per 100 persone l'anno di eventi cardiovascolari maggiori è stata di 0.24 (95% CI 0.07-0.62) e, confrontandola con altri trials con *anti-TNF* con una simile coorte, in quest'ultimi è stata 0.51 (95% CI 0.31-0.79).^{101,103} Il rischio di eventi venosi tromboembolici è stato valutato in pazienti con artrite reumatoide di età

avanzata con noto rischio cardiovascolare pre-esistente con *Tofacitinib* (un primo braccio di pazienti) e con un *anti-TNF* (un secondo braccio di pazienti). Il trial è ancora in corso, ma l'analisi dei dati ad ora ottenuti ha suggerito un potenziale aumento del rischio di eventi cardiovascolari e tromboembolici che è dose-dipendente. Ciò ha portato al divieto della terapia da 10 mg e alla necessità di un precedente fallimento con altri agenti anti-TNF perché possa essere somministrata.^{104,105,106} Considerato che i pazienti con MICI presentano un rischio intrinseco di eventi tromboembolici come manifestazione extra-intestinale dell'infiammazione sistemica, è molto importante la valutazione del profilo di rischio dei pazienti con RCU che vengono candidati a tale trattamento. I dati sono, comunque, recenti e sono necessari dati prospettici a lungo termine per valutare adeguatamente il profilo di sicurezza del farmaco.

Cytokine signaling via JAK isoforms and their inhibitors

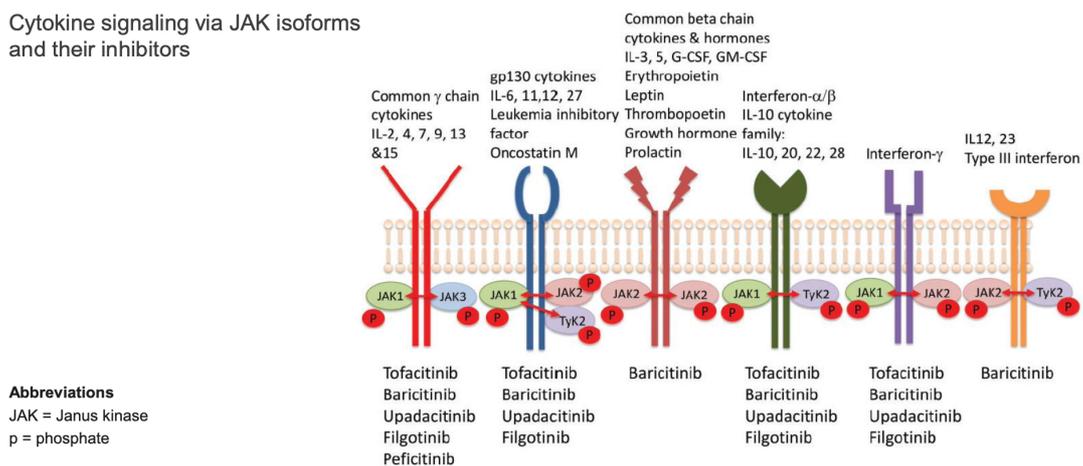


Figura 24 Principali vie di signalling delle citochine che coinvolgono Jak: Tofacitinib agisce nell'inibizione del signalling di numerose citochine infiammatorie (tra cui interleuchine e IFN- γ). Modificato da Ernest H. Choy, «Rheumatology 2018».

In conclusione, all'interno del complesso e variegato panorama terapeutico delle MICI, è molto importante un esame attento della severità di malattia del paziente e delle comorbidità di quest'ultimo, con una decisione che deve essere condivisa riguardo gli obiettivi del trattamento. La consapevolezza dei fattori di rischio per ogni classe di farmaci è essenziale nella discussione con il paziente e nel *decision-making*.⁹³ Dal momento che gli studi sull'efficacia e sui profili di sicurezza di molti farmaci sono ancora in corso e richiedono studi prospettici a lungo termine per arrivare a conclusioni rilevanti, è essenziale l'aggiornamento costante del clinico per un adeguato consenso informato da parte del paziente e per una compliance ottimale alla terapia.

1.1.8. PROGNOSI

La prognosi delle MICI (sia MC sia RCU) dipende strettamente dall'estensione di patologia e dalla risposta o meno alla terapia. Comunque, i pazienti con MICI hanno una mortalità maggiore rispetto alla popolazione generale, con le principali cause di morte che includono la malattia di per sé, le infezioni e le malattie respiratorie. Tra queste, la malattia cardiovascolare è esclusa. Infine, le morbidità in ambito psicologico e psichiatrico sono molteplici e la qualità di vita può essere, a volte, molto scarsa.³

Una sorveglianza continua per lesioni pre-cancerose è centrale nella RCU di lunga data, con un rischio cumulativo di carcinoma colo-rettale che si attesta intorno al 30% per i pazienti con patologia da 30 anni o più. A tutto ciò, si aggiungono le manifestazioni extra-intestinali, che possono essere particolarmente gravi, come la colangite sclerosante primitiva, associata ad un elevato rischio di *liver failure* e cirrosi, oltre al rischio di sviluppo di colangiocarcinoma.^{107,108}

1.2. STUDIO DELLA PERMEABILITÀ INTESTINALE E “LEAKY GUT”

1.2.1 LA STRUTTURA E LE FUNZIONI DELLA BARRIERA INTESTINALE

La mucosa gastrointestinale presenta una barriera epiteliale che rende, fisiologicamente, il tubo digerente selettivamente permeabile a specifiche sostanze. Queste ultime dal lume intestinale penetrano internamente attraverso, essenzialmente, quattro modalità (*Figura 25*):

- la **via transcellulare**: è caratterizzata da un processo di diffusione passiva tra le cellule da parte di molecole idrofiliche di piccole dimensioni e composti lipofili. Tale passaggio transepiteliale avviene secondo gradiente senza dispendio di energia. Tuttavia, per il passaggio di nutrienti quali gli zuccheri, gli aminoacidi e le vitamine, è richiesto un trasporto attivo con dispendio di energia, modulato da specifici trasportatori, per entrare all'interno della cellula. Infine, per grandi peptidi e componenti batteriche o batteri, che non riescono ad attraversare la membrana liberamente, entrano per endocitosi attraverso l'invaginazione della membrana plasmatica, seguita da formazione di vescicole che attivamente vengono trasportate a livello citoplasmatico per transitosi;
- la **via paracellulare**: è caratterizzata dal passaggio tra le cellule di ioni, acqua e grandi molecole idrofiliche di dimensioni dai 400-600 fino ai 10-20 kDa tramite la presenza di *tight junctions (TJs)*, strutture-chiave che regolano l'integrità della barriera epiteliale e degli spazi intercellulari.

Le TJs modulano il passaggio tramite la formazione di due classi di pori:

- pori con elevata capacità e permeabili a piccoli ioni ed a piccole molecole prive di carica, che passano attraverso il cosiddetto *pore pathway* regolato dalle molecole della famiglia delle *claudine* (*Figura 24*);
- pori con ridotta capacità e permeabili a ioni di dimensioni maggiori e a molecole più grandi indipendentemente dalla carica, passando attraverso il cosiddetto

leak pathway e regolato dalla famiglia di proteine della *zonula occludens* (ZO) quali l'*occludina* (Figura 24).

In sintesi, il ruolo delle TJs in questa via è quello di regolare la diffusione paracellulare di sostanze, consentendo il passaggio solo a determinate molecole. In più, regolano la polarità della cellula epiteliale, evitando la diffusione libera di proteine e lipidi tra il dominio apicale e il dominio baso-laterale della membrana plasmatica;

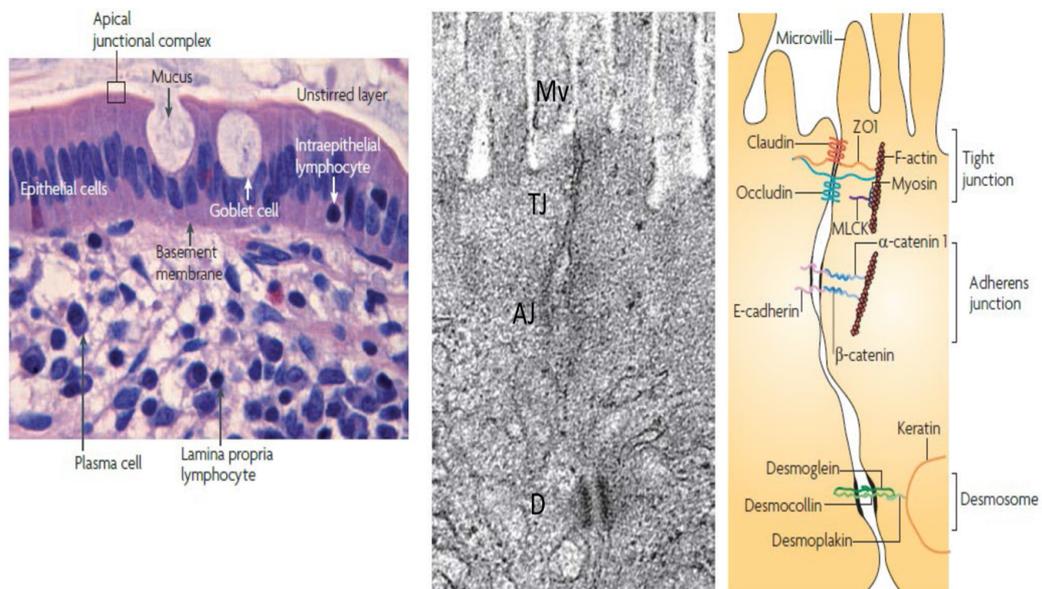


Figura 24 Anatomia della barriera mucosale: a sinistra zoom di istologia di mucosa intestinale, formata da un epitelio monostratificato di tipo ghiandolare non vascolarizzato, separato dalla lamina propria sottostante dalla membrana basale. Al centro, immagine al microscopio elettronico che evidenzia i rapporti tra le cellule epiteliali e le strutture coinvolte, stilizzate nell'immagine a destra. Gli elementi-chiave delle TJs sono le claudine, la Zonula Occludens-1 (ZO-1), occludina e l'F-actina, tutti collegati tra loro strettamente al di sotto dei microvilli. Altre strutture coinvolte nel mantenimento della polarità cellulare sono le giunzioni aderenti (formate da proteine come l'E-caderina e la β -catenina) e i desmosomi (formate da proteine come desmogleina, desmocollina e desmoplachina, ancorate alle fibre di cheratina). La chinasi della catena leggera della miosina (MLCK) è associata alle strutture actomiosiniche, a loro volta collegate alle proteine della ZO-1 e all'occludina. In generale, il passaggio di sostanze attraverso queste strutture è strettamente regolato da trasportatori e richiede energia, tranne nel caso delle claudine e l'occludina in cui si sviluppa un passaggio per diffusione passiva (pore and leak pathways).¹²⁴

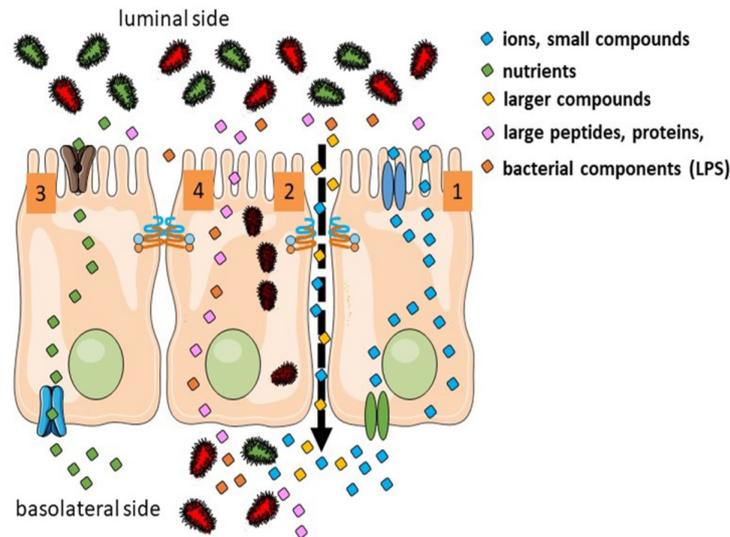


Figura 25 Rappresentazione schematica delle vie che regolano la permeabilità intestinale: 1) il trasporto transcellulare di ioni è mediato da trasportatori sui versanti apicale e baso-laterale, 2) Ioni, acqua e altre molecole idrofiliche più grandi passano attraverso la via paracellulare. 3) Zuccheri, aminoacidi e vitamine entrano per trasporto attivo. 4) Endocitosi mediante vescicole di componenti batteriche e batteri interi.¹³¹

1.2.2 LA PERMEABILITÀ INTESTINALE: MECCANISMI PATOFISIOLOGICI E METODI DI ANALISI

I principali fattori coinvolti nell'alterazione della permeabilità intestinale e, di conseguenza, in grado di alterare l'architettura della barriera epiteliale intestinale sono:

- **Dieta e stile di vita:** il cibo e i nutrienti modulano il microbiota intestinale che, a sua volta, modula la funzione della barriera intestinale.¹³⁸ Tra i nutrienti, un ruolo importante sembra essere svolto dalla vitamina D (VD) che risulta, da recenti studi, protettiva sulla permeabilità intestinale stimolando l'espressione delle proteine ZO-1 e claudina-1 all'interno delle TJs. In modelli murini *knock-out* per il recettore della VD è stato osservato lo sviluppo di coliti severe, suggerendo un effetto protettivo della VD sulla barriera mucosale.¹³⁹ La dieta povera di fibre è stata evidenziata, invece, come un *trigger* per l'espansione di colonie di batteri degradanti il muco (come *Akkermansia muciniphila* e *Bacteroides caccae*).¹⁴⁰ La degradazione del muco rende la barriera intestinale meno spessa, in quanto viene a mancare il film protettivo posto tra il lume e l'epitelio, con un rischio maggiore di contrarre coliti infettive.¹⁴⁰ Anche abitudini di vita, quali il consumo cronico di alcol, risultano coinvolte nell'alterazione della barriera

epiteliale, comportando alterazioni del microbiota intestinale e la traslocazione del LPS batterico. Sia nell'uomo sia nel topo, è stato dimostrato che il consumo cronico di alcol è responsabile della distruzione della barriera intestinale tramite il coinvolgimento della via del TNF-alpha prodotto dai monociti/macrofagi dell'intestino, con successiva attivazione della chinasi della catena leggera della miosina (MLCK)¹⁴⁴ che altera il citoscheletro della membrana epiteliale. La permeabilità intestinale risulta sempre più correlata alla dieta e allo stile di vita, tuttavia con meccanismi non del tutto noti;

- **Stress:** tale fattore può comportare alterazioni del microbiota e della barriera intestinale, le quali inducono una traslocazione batterica riducendo maggiormente l'integrità della barriera intestinale per richiamo di cellule infiammatorie. Una condizione di stress che porta ad un aumento della permeabilità intestinale è la malattia da **ustioni**, caratterizzata da un'aumentata attività della *MLCK*,^{141,142} con una conseguente alterazione del citoscheletro della cellula epiteliale alterando l'integrità della membrana epiteliale e delle giunzioni intercellulari. In modelli murini di malattia da ustione, inoltre, sono stati osservati ridotti livelli di butirato fecale prodotto dalla flora residente, indice di traslocazione transmucosale da parte di alcuni batteri aerobici Gram negativi, con conseguente flogosi intestinale e colite.¹⁴³
- **Infezioni:** l'infezione gastrica da *Helicobacter Pylori* è l'alterazione più comune dell'epitelio mucosale. Molteplici studi evidenziano come il batterio sia responsabile dell'aumento della permeabilità intestinale causando un'alterazione dell'architettura delle TJs tramite l'interazione con la proteina *ZO-1*.^{145,146}

Quindi, tutti questi fattori possono, potenzialmente, portare ad un'alterazione della barriera intestinale e della flora batterica, con conseguente traslocazione di batteri e con attivazione della risposta immunitaria, che porta, a sua volta, ad infiammazione locale e danno/disfunzione d'organo.

Negli ultimi anni, viste le crescenti evidenze sul ruolo di un'alterata permeabilità intestinale in molte malattie gastrointestinali e non solo^{158,168}, sono state sviluppate diverse tecniche di analisi per valutare l'integrità della barriera intestinale, sia *ex vivo* mediante colture cellulari epiteliali intestinali sia *in vivo* mediante test effettuati direttamente sul paziente.

Le metodiche *in vivo* si basano sulla misurazione dell'escrezione urinaria di sostanze somministrate per via orale. Tra queste sostanze si trovano il *polietilenglicole (PEG)* a diversi pesi molecolari (PM)⁵¹, il *51-acido cromo-etilendiamminotetraacetico (⁵¹CrEDTA)* e zuccheri a diverso peso molecolare, come il *saccarosio*, *sucralosio*, *lattulosio*, *mannitolo* e *ramnosio*. Una sostanza, per essere utilizzata per lo studio della permeabilità intestinale, deve essere: i) assorbita esclusivamente mediante la via paracellulare; ii) metabolicamente inerte; iii) filtrata liberamente a livello del glomerulo renale, senza essere riassorbita a livello tubulare.¹¹⁹ I tests più comunemente usati valutano la diversa escrezione urinaria del lattulosio (un disaccaride) e il mannitolo (uno zucchero semplice alcolico). In particolare, il lattulosio è un disaccaride inerte dal peso molecolare di 342 Da (molecola relativamente grande) che viene assorbito attraverso la via paracellulare (*leak pathway*) solo nel momento in cui la membrana epiteliale risulta maggiormente permeabile e, quindi, danneggiata.¹⁶⁰ Dall'altro lato, il mannitolo è un monosaccaride dal peso molecolare di 182 Da (molecola più piccola) che viene assorbito mediante la via transcellulare, indipendentemente dall'integrità delle giunzioni intercellulari, valutando l'area di superficie ¹⁶¹. Per tale motivo, danni a livello mucosale e a livello delle *TJs* sono associati ad un assorbimento aberrante degli zuccheri, che risulta aumentato per il lattulosio e un ridotto per il mannitolo.¹⁶¹ Da molto tempo, viene utilizzato il rapporto dell'escrezione urinaria tra il lattulosio e il mannitolo (*lactulose to mannitol ratio, LMR*) 2 ore dopo l'assunzione degli stessi come misura della permeabilità del piccolo intestino.¹²⁰ Ciò è stato dimostrato in studi con radio-isotopi che hanno evidenziato un'elevata concentrazione di questi due zuccheri, nell'intervallo delle 2 ore dall'ingestione, a livello del piccolo intestino, i quali si riversano, poi, nelle urine, come risultato di un'alterata permeabilità.¹²¹ Teoricamente, la raccolta delle urine fino alle 8-24 ore potrebbe fornire indicazioni a riguardo della permeabilità colica; tuttavia il lattulosio e il mannitolo vengono degradati dal microbiota colico, pertanto non sono utilizzabili per tale valutazione. Dunque, *LMR* può essere impiegato esclusivamente nello studio della permeabilità del piccolo intestino (Figura 26).¹²² Altre sostanze, invece, resistenti alla fermentazione da parte della flora batterica colica possono essere utilizzate nello studio della permeabilità del colon come il *sucralosio*, il *PEG*, e il ⁵¹*CrEDTA* e impiegate nello studio della permeabilità dell'intero tratto gastroenterico nel momento in cui le urine vengono raccolte fino alle 24h.¹²² Per quanto riguarda il saccarosio, questo viene rapidamente idrolizzato a livello del piccolo intestino in fruttosio e glucosio, perciò la sua escrezione urinaria correla con la permeabilità di parete a livello dello stomaco e del duodeno prossimale.¹²³ Pertanto, zuccheri diversi possono essere impiegati per valutare la

permeabilità intestinale a livello di differenti porzioni del tratto GI, in relazione alle loro caratteristiche molecolari e al loro metabolismo.

Nonostante i numerosi impieghi dei test agli zuccheri, non si conosce, ad oggi, ancora del tutto il meccanismo di assorbimento di questi, lasciando spazio a diverse teorie. Ad ogni modo, le evidenze a supporto di queste ipotesi sono scarse, con controversie sulla validità e, specialmente, sull'interpretazione del *LMR*.¹²⁴

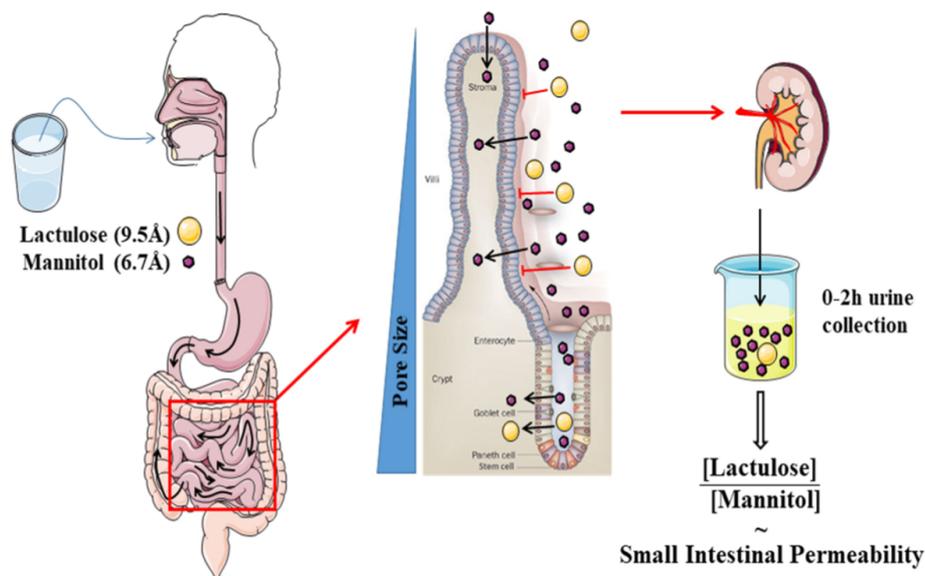


Figura 26 Visione schematica del test ai due zuccheri (mannitolo e lattulosio): l'assorbimento dei due zuccheri, con dimensioni differenti, dipende dalla grandezza dei pori nella via paracellulare.¹³¹

Dall'altro lato, i metodi *ex vivo* valutano la permeabilità intestinale in colture cellulari, tessuti animali o tessuti umani, quali pezzi operatori o biopsie endoscopiche. Gli epitelii, *ex vivo*, sviluppano una differenza di potenziale per due principali caratteristiche: la polarità e la rigida struttura. Quest'ultima è modulata dalle TJs, che mantengono il contatto tra le cellule e selettivamente regolano il passaggio paracellulare di ioni; mentre il tessuto è polarizzato grazie alla presenza di canali ionici, pompe e trasportatori che si trovano a livello del versante apicale e del versante basolaterale. In particolare, negli enterociti, a livello apicale si ritrovano i canali *CFTR* e *ENaC*, mentre a livello basale si ritrova la *pompa sodio-potassio* (Na^+-K^+ ATPasi). Pertanto, si instaura un potenziale di base nel tessuto epiteliale che può essere misurato attraverso elettrodi inseriti all'interno della *camera di Ussing*. In particolare, viene misurata la *TEER* (*resistenza elettrica transepiteliale/endoteliale*) in seguito all'applicazione di un

costante flusso di corrente elettrica che genera nuove differenze di potenziale. Una bassa TEER è, perciò, associata ad un'aumentata permeabilità intestinale per via di una disfunzione a livello della polarità cellulare epiteliale. La TEER misura il flusso di tutti gli ioni (cationi e anioni) attraverso l'intero epitelio, evidenziando la resistenza che l'epitelio esercita contro gli ioni per passare dal versante luminale a quello basolaterale. Di conseguenza, la TEER non va a discriminare la via paracellulare (ossia la *leak pathway* e la *pore pathway*) da quella transcellulare. La permeabilità paracellulare può essere, nello specifico, valutata *ex vivo* misurando il flusso di molecole dal lato luminale al lato basolaterale (come EDTA, mannitolo, saccarosio, inulina e PEG o molecole di destrano di dimensioni variabili da 4 a 20 KDa).¹³¹ Infine, la permeabilità transcellulare, modulata attraverso la via endocitica tramite vescicole, può essere valutata tramite *Ussing Chambers* mediante l'utilizzo o di markers ad alto peso molecolare o proteine batteriche incorporate con markers tipo la fluoresceina o, eventualmente, batteri uccisi marcati.¹³¹

Metodo	Descrizione	Applicazione	Vantaggi (V) e Svantaggi (S)
Escrezione urinaria di diversi zuccheri somministrati per via orale (es. lattulosio, mannitolo, ramnosio, saccarosio e sucralosio)	<ul style="list-style-type: none"> - misura, <i>in vivo</i>, la permeabilità a livello paracellulare dell'epitelio intestinale dopo aver bevuto un mix di zuccheri; - l'escrezione del saccarosio misura la permeabilità paracellulare della <u>regione gastroduodenale</u>; - il rapporto lattulosio/mannitolo (LMR) nelle urine 	L'analisi della permeabilità intestinale viene estrapolata misurando l'escrezione urinaria dei substrati somministrati per os.	<p>V: bassi costi del test, con diversi pazienti che possono essere inclusi;</p> <p>S: si ha la misurazione della sola permeabilità paracellulare;</p> <p>S: richiede tempo e lavoro per essere portato avanti.</p>

	<p>discrimina la permeabilità del <u>piccolo intestino</u> (distalmente al duodeno prossimale);</p> <ul style="list-style-type: none"> - l'escrezione di sucralosio misura la permeabilità <u>dell'intero tratto gastrointestinale e del colon.</u> 		
Camera di Ussing	<ul style="list-style-type: none"> - misura, <i>ex vivo</i>, la permeabilità intestinale mediante TEER, ossia la resistenza opposta dalla membrana epiteliale mucosale; - misura la permeabilità intestinale a molecole di differente peso molecolare, valutando le vie paracellulare e transcellulare 	Utilizzato per valutare differenti segmenti del tratto gastrointestinale mediante biopsie	<p><i>V</i>: metodo <i>gold-standard</i>, dotato di elevate sensibilità e specificità nella valutazione della permeabilità intestinale;</p> <p><i>S</i>: è un metodo costoso e richiede un team di esperti per essere portato avanti.</p>

Tabella I Schema riassuntivo delle caratteristiche dei principali metodi di valutazione della permeabilità intestinale.¹³¹

1.2.3 BIOMARKERS NELLA VALUTAZIONE DELLA PERMEABILITÀ INTESTINALE

I test *ex vivo* e *in vivo* sono dispendiosi in termini sia di tempo sia di lavoro, inoltre non sono disponibili in tutti i laboratori. Per tale motivo, la ricerca sta indagando potenziali *biomarkers* in grado di valutare la permeabilità intestinale. Principalmente, sono state valutate molecole che, a causa di un'alterata struttura e di un'alterata funzione della barriera intestinale epiteliale, si riversano nel sangue o in altri materiali biologici in condizioni patologiche, configurandosi come potenziali *biomarkers*. I principali biomarkers che sono stati studiati sono:

- **Lipopolisaccaride batterico (LPS):** è una proteina di 10-20 kDa localizzata nella membrana esterna dei batteri Gram-, che viene trasportata attraverso l'epitelio per trasporto transcellulare.¹²⁵ Sebbene non sia un parametro che indica la permeabilità paracellulare, un recente studio ha evidenziato elevati livelli di LPS sierico in accordo con il LMR in persone normopeso e obese.¹²⁶ Inoltre, elevati livelli di LPS sono stati riscontrati, come segno di alterata permeabilità intestinale, in numerose condizioni patologiche tra cui la cirrosi¹²⁷, le MICI¹²⁸ e la variante diarroica della IBS (IBS-D)¹²⁹.
- **Zonulina:** è una proteina costitutiva delle TJs che contribuisce a modulare la permeabilità intestinale. Studi recenti hanno evidenziato come zonulina sia in grado di traslocare reversibilmente dalle TJs attraverso una via mediata dall'attivazione di due recettori, che sono il PAR2 (*Protease-Activated Receptor 2*) e l'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) rendendo lasse le TJs.¹³⁰ Elevati livelli di tale biomarker sono stati evidenziati in stati patologici quali la celiachia, le MICI, il diabete mellito di tipo I e l'obesità. Tuttavia, l'utilizzo di questo marker per l'analisi della permeabilità intestinale deve essere estremamente attento in quanto non sono presenti studi in letteratura sufficienti a confermare una sua correlazione con l'alterazione della permeabilità intestinale, oltre anche ad un'estrema variabilità nelle diverse tecniche di misurazione del marker nel sangue.¹³¹
- **Fatty Acid Binding Protein (FABP):** si tratta di proteine citosoliche che trasportano e si legano agli acidi grassi. Sono presenti diverse isoforme proteiche; a livello degli enterociti si ritrovano soprattutto a livello della zona assorbente dell'epitelio nei villi

intestinali, dove sono espresse sia le isoforme epatiche (*L-FABP*) sia le *Intestinal - Fatty Acid Binding Proteins (I-FABP)*.¹⁴⁸ Diversi studi hanno evidenziato, in condizioni di ischemia intestinale o di patologie che coinvolgono il piccolo intestino, come le *I-FABP*, fisiologicamente presenti a livello del citosol, si riversino nel torrente sanguigno configurandosi come potenziali biomarker.¹⁴⁹ Inoltre, sono stati evidenziati elevati livelli sierici di *I-FABP* nei pazienti con variante diarroica di IBS in accordo con un aumentato LMR ai test di permeabilità *in vivo*, emergendo come un possibile marker di aumentata permeabilità intestinale.¹⁵⁰

- **Citrullina:** si tratta di un aminoacido non essenziale prodotto dagli enterociti del piccolo intestino a partire dall'arginina.¹⁵¹ Per tale motivo, si è presupposto che la citrullina fosse un marker dell'attività e dell'integrità della barriera epiteliale del piccolo intestino. Una recente review sistematica ha evidenziato come i livelli di citrullina correlano negativamente con la severità di malattia in enteropatie come la MC o la malattia celiaca.¹⁵² Trattandosi di un aminoacido non essenziale, i livelli di citrullina nel plasma sono strettamente correlati all'introito con la dieta. Alcuni studi però, riportano che seguendo diete con cibi ricchi di citrullina (come l'anguria) i livelli plasmatici non aumentano.¹⁵³ Inoltre, in alcune patologie autoimmuni, sono presenti peptidi citrullinati dovuti a modifiche post-traduzionali dei residui di arginina, riportando livelli di citrullina libera falsamente normali o diminuiti. Per tale motivo, nelle patologie autoimmuni l'interpretazione dei livelli di citrullina come markers di alterata permeabilità intestinale deve essere effettuato in modo molto attento.¹⁵⁴
- **Marcatori fecali:** sono molteplici, tra questi vi è la *alpha1-antitripsina (AAT)* prodotta principalmente nel fegato, ma anche a livello dei macrofagi e degli enterociti¹⁵⁵, che ha la funzione principale di proteggere i tessuti dall'azione proteolitica di enzimi rilasciati dalle cellule infiammatorie. In condizioni in cui vi è un'aumentata permeabilità intestinale dovuta ad una distruzione della barriera mucosale, come, per esempio, nelle MICI, AAT passa dalla circolazione sanguigna verso il lume intestinale. Vista la sua resistenza alla degradazione agli enzimi digestivi, i livelli di AAT nelle feci vengono utilizzati per indagare la permeabilità intestinale e correlano con altri marker di infiammazione quale la calprotectina e la mieloperossidasi.¹⁵⁶

- **FGF-19 (Fattore di Crescita dei Fibroblasti-19):** è un ormone della grande famiglia dei FGFs che modula il metabolismo degli acidi biliari, la sintesi di proteine e glicogeno e la gluconeogenesi.¹⁷⁴ Tale ormone è espresso nel piccolo intestino sotto il controllo trascrizionale del Recettore Nucleare Farnesoide (*FXR*) in risposta alla presenza di acidi biliari a livello del lume intestinale (Figura 27); successivamente escreto nella circolazione portale, raggiunge il fegato e si lega al recettore 4 del fattore di crescita dei fibroblasti *FGFR4/β-Klotho* complesso.¹⁷⁵ Fisiologicamente, l'ormone è responsabile di inibire la sintesi di acidi biliari e la gluconeogenesi a livello epatico, inducendo, anche, un riempimento e un rilassamento della parete della colecisti.¹⁷⁰ Un alterato metabolismo degli acidi biliari è stato associato a diverse malattie croniche, comprese malattie metaboliche¹⁷⁶, epatiche¹⁷⁷ e intestinali¹⁷⁸. Studi recenti sull'uomo hanno evidenziato significative correlazioni tra i livelli di FGF19, i livelli di sintesi di acidi biliari e i disturbi intestinali,^{179,180,181} inclusa l'infiammazione intestinale. Gli acidi biliari presentano un potente effetto secretorio a livello della mucosa colica, pertanto, quando un eccesso di acidi biliari raggiunge l'intestino tenue, la capacità ileale di assorbimento degli stessi va incontro a saturazione ed essi si riversano, così, nel lume del colon accelerando il transito.¹⁸² Di conseguenza, la motilità e la secrezione del colon vengono stimulate e si evidenzia una condizione di diarrea persistente. Infatti, pazienti che soffrono di malassorbimento da acidi biliari e diarrea spesso presentano livelli aumentati di C4 (un marker della sintesi epatica di acidi biliari, vedi Figura 27) e livelli ridotti di FGF19.^{183,184}

In conclusione, bassi livelli di FGF-19 sono associati ad aumentati livelli di acidi biliari nel lume intestinale, i quali svolgono una funzione secretoria e detergente a livello della membrana plasmatica degli enterociti, inducendo un aumento della permeabilità intestinale.¹³¹ Ciò è stato confermato in studi *in vivo* in pazienti con IBS-D, i quali presentavano elevati livelli di acidi biliari nelle feci, associati ad un'aumentata permeabilità mucosale rispetto al gruppo di controllo sano.¹⁷¹ Pertanto, FGF-19 sembra essere un potenziale biomarker dell'omeostasi degli acidi biliari e indicatore dello stato di infiammazione locale intestinale e dell'integrità della barriera mucosale intestinale.¹⁸²

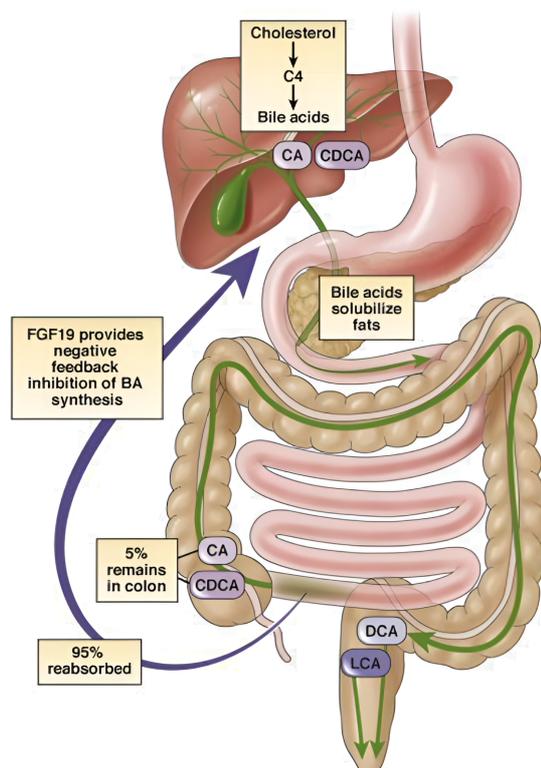


Figura 27 Immagine schematica del ricircolo enteroepatico e dell'azione del FGF19: C4 è l'intermedio nella via metabolica di sintesi degli acidi biliari, come CA (acido colico) e CDCA (acido chenodesossicolico), riversati poi nel piccolo intestino a partire dal duodeno. Una volta assorbiti nell'ileo, questi stimolano la sintesi di FGF19, il quale blocca la sintesi di acidi biliari dal fegato, come segnale di un adeguato ricircolo enteroepatico e di ridotto transito di sostanze emulsionanti potenzialmente tossiche all'interno del lume intestinale. CA e CDCA si portano in minima parte nel colon (5%), con trasformazione da parte della flora residente in LCA (acido litocolico) e DCA (acido deossicolico), espulsi normalmente nelle feci. Bassi livelli di FGF19 ed aumentati acidi biliari nelle feci sono associati a diarrea da acidi biliari ed aumento della permeabilità intestinale.¹⁷⁰

In sintesi, molteplici sono gli studi che hanno analizzato potenziali biomarkers sierici e/o fecali specifici per valutare l'integrità della membrana epiteliale intestinale e la permeabilità intestinale, in associazione a diversi metodi di analisi della barriera intestinale (come il test *in vivo* agli zuccheri e il sistema *ex vivo* di *Ussing Chambers*); tuttavia i dati non sono completamente chiari e necessitano di ulteriori conferme.¹⁵⁷ In diverse patologie è stata dimostrata una maggiore permeabilità intestinale, tuttavia è ancora da definire se la disfunzione della barriera sia un evento primario nella fisiopatologia o una conseguenza della malattia.

1.2.4 IL CONCETTO DI “LEAKY GUT”

Il termine *Leaky Gut* indica una condizione di aumentata permeabilità intestinale associata ad una disfunzione anatomico-funzionale a livello della barriera epiteliale intestinale. Negli ultimi anni, c'è stato un aumentato interesse sul ruolo del “Leaky Gut” in molteplici patologie. Le ragioni sono diverse; per esempio, in alcune patologie funzionali gastrointestinali, caratterizzate da dolore addominale, diarrea e meteorismo senza una problematica organica evidente, una possibile causa alla base di questi sintomi sembra essere il *leaky gut*. In tali condizioni, infatti, molteplici studi scientifici hanno documentato alterazioni della barriera intestinale¹³² e hanno evidenziato una correlazione, soprattutto, con il sintomo del dolore addominale in soggetti che soffrono di IBS.¹³⁶

Un'alterata funzione della barriera epiteliale intestinale è stata indagata in condizioni patologiche organiche come le MICI¹³³, la malattia celiaca e in pazienti che presentano infezioni intestinali¹³⁴, per valutare il potenziale ruolo nella patogenesi e nel decorso clinico della patologia stessa. Tra queste, la **malattia celiaca**, un'enteropatia immuno-mediata caratterizzata dal glutine come *trigger*, presenta un'aumentata permeabilità intestinale alla base della patologia. Il glutine, per tale condizione, supera maggiormente la barriera intestinale andando ad attivare le cellule immunitarie e scatenando un importante processo infiammatorio. In diversi studi che indagano la permeabilità intestinale in numerosi pazienti con malattia celiaca, sono stati riscontrati, da analisi di biologia molecolare, ridotti livelli delle *claudine-3,-5 e -7* e un aumento delle proteine formanti pori (come la *claudina-2*) a livello duodenale.¹⁰⁹ Perciò, diversi studi hanno evidenziato la capacità della gliadina di determinare di per sé un immediato e transiente calo dell'adesività paracellulare, associato ad un'alterata polarità a livello dell'epitelio intestinale. Inoltre, è stato ipotizzato che la diarrea nella malattia celiaca sia dovuta ad un aumentato flusso di ioni e acqua all'interno della via paracellulare.¹¹⁰ Oltre alla via paracellulare, sono stati descritti anche dei meccanismi di trasporto transcellulare in grado di veicolare i residui di gliadina a livello della lamina propria.¹⁸⁵ Per esempio, alcuni studi hanno dimostrato che il danno all'epitelio intestinale che caratterizza la fase acuta della malattia celiaca porta ad un anomalo aumento dell'espressione del recettore della transferrina CD71 sul versante luminale degli enterociti, sebbene normalmente espresso a livello basolaterale;¹⁸⁶ ciò determina l'innescò di una retrotranscitosi apico-basale dei frammenti di gliadina, che vengono complessati alle IgA e trasportati alla lamina propria senza andare

incontro alla degradazione lisosomiale.¹⁸⁷ In questo modo, l'arrivo dei peptidi dannosi va a incrementare ulteriormente il processo infiammatorio intestinale, innescato in prima istanza dal transito paracellulare di tali segmenti peptidici.

Un altro gruppo di patologie gastrointestinali in cui si è studiata la permeabilità intestinale sono le **MICI**. I primi studi svolti che valutano la permeabilità intestinale nelle MICI risalgono agli anni '70 del secolo scorso attraverso la somministrazione rettale di albumina radio-iodata e successiva misurazione delle concentrazioni plasmatiche del composto radioattivo in pazienti affetti da RCU e in pazienti sani come gruppo di controllo.¹¹² Successivamente, dopo le prime evidenze, sono stati condotti diversi studi su gruppi di pazienti più ampi, in particolare due studi hanno evidenziato risultati particolarmente rilevanti. Nello studio di Casellas et al., la permeabilità dell'intero tratto gastrointestinale è stata studiata mediante la somministrazione orale di ^{99m}Tc-DTPA, composto radioattivo del sodio pertecnetato, ed è risultata aumentata sia in pazienti affetti da RCU sia da MC, indipendentemente dall'attività di malattia. In particolare, è stato evidenziato che il grado dell'infiammazione intestinale è correlato al grado di permeabilità.¹¹³ Inoltre, uno studio di Jenkins et al. ha dimostrato che la permeabilità, valutata tramite la somministrazione di ⁵¹Cr-EDTA, è risultata aumentata in pazienti affetti da MICI con localizzazione di malattia a livello sia del piccolo intestino sia del colon. Inoltre, solo i pazienti con malattia a livello del colon presentano un'aumentata permeabilità nel momento in cui ⁵¹Cr-EDTA veniva somministrato per via rettale. Da ciò si può dedurre che il colon infiammato sia la sede dell'aumentata permeabilità intestinale.¹¹⁴ Tuttavia, studi condotti su larga scala hanno evidenziato talvolta risultati discordanti, probabilmente dovuti ai diversi metodi usati per l'analisi della permeabilità.¹¹⁵

Recenti studi hanno dimostrato che nella MC ileo-colica attiva vi è una disregolazione sia del *pore pathway* sia del *leak pathway*, associata ad un'aumentata permeabilità transcellulare e paracellulare con conseguente passaggio di antigeni proteici e interi batteri attraverso la membrana epiteliale.^{116,117} Ciò è stato supportato dalla presenza di aumentati livelli ematici di LPS nei pazienti con MC.¹¹⁸

In aggiunta, studi longitudinali in pazienti con MICI hanno evidenziato che un'aumentata permeabilità intestinale è stata rinvenuta prima di una recidiva della MC, suggerendo un ruolo patogenetico dell'alterazione della barriera epiteliale nell'infiammazione intestinale.¹³⁵ In linea con questi dati, nella MC in condizioni di remissione clinica ed endoscopica in seguito a terapia convenzionale o biologica sono stati evidenziati livelli di lattulosio e di ⁵¹Cr-EDTA ridotti rispetto ai livelli prima del trattamento farmacologico.^{158,159}

Anche in numerose altre patologie extraintestinali sono state evidenziate potenziali associazioni eziopatogenetiche della disbiosi intestinale e delle disfunzioni epiteliali intestinali. Tra queste si ritrovano diverse patologie, come la **malattia d'Alzheimer**, l'**autismo**, il **canro** e numerose **patologie reumatologiche** e **autoimmuni**.¹⁶² Sono sempre più numerose le evidenze che correlano la traslocazione batterica attraverso la barriera epiteliale intestinale con la patogenesi di numerose patologie autoimmuni, come il lupus eritematoso sistemico (*LES*). Il LES è una patologia autoimmune caratterizzata dalla presenza di un'inflammatione severa e persistente che sviluppa danni in numerosi organi. Ad alimentare il processo infiammatorio del LES si è visto che gioca un ruolo importante la traslocazione del LPS batterico dalla flora intestinale del colon, che attraversa la barriera intestinale verso il circolo sanguigno, portandosi, così, all'interno di vari tessuti.¹⁶³ Questo dato è stato evidenziato misurando i livelli di CD14 solubile a livello sierico, che risulta aumentato nei pazienti con LES.¹⁶⁴ Nello specifico, tale proteina viene rilasciata dai monociti/macrofagi in seguito alla stimolazione dei recettori della famiglia dei *Toll-like Receptors (TLRs)* da parte del LPS, in particolare del recettore TLR4 che risulta iperstimolato, anche, in modelli murini con LES.^{164,165} In generale, quindi, sembra che una stimolazione eccessiva dei TLRs giochi un contributo molto rilevante nella patogenesi del lupus, correlato alla traslocazione di LPS da parte del microbiota intestinale, a sua volta associato alla presenza di un *leaky gut*.

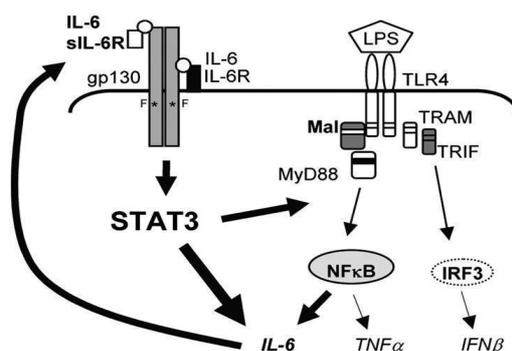


Figura 28 Immagine schematica del pathway di signalling molecolare del LPS: via TLR4 con attivazione di MyD88, il quale attiva il fattore di trascrizione NFκB, responsabile della sintesi di citochine infiammatorie come TNFα e IL-6. Quest'ultime sono centrali nella patogenesi e nella terapia biologica come targets all'interno di numerose patologie autoimmuni (come le MICI e l'artrite reumatoide).¹⁶⁴

Considerando, quindi, il contributo del *leaky gut* e, di conseguenza, di un'aumentata traslocazione batterica in uno stato infiammatorio presente in numerose patologie autoimmuni, il suo trattamento può apparire come una potenziale strategia terapeutica nell'attenuare il danno

d'organo. Recenti studi riportano come prebiotici e probiotici, sembrano essere utili nel ristabilire una corretta permeabilità intestinale.¹⁶⁶ Diverse specie probiotiche sono state scoperte come protettive della barriera intestinale, tra cui il *Bacteroides fragilis*.¹⁶⁷ Studi a riguardo sono stati condotti in modelli murini di disturbi dello spettro autistico, in cui è stata evidenziata, oltre ad uno stato di disbiosi del microbiota intestinale, una disfunzione della barriera intestinale ed elevati livelli di *4-etilfenilsolfato (4EPS)*, composto prodotto dalla flora residente che si porta, così, a livello del torrente sanguigno.¹⁴⁷ A tal proposito, il trattamento con il probiotico, *B. fragilis*, ha ridotto i livelli di 4EPS sierico nei topi, con un marcato miglioramento dello spettro di comportamento di questi.¹⁴⁷ Gli effetti terapeutici del *B. fragilis* sembrano essere dovuti, essenzialmente, alla sua capacità di ristabilire un microbiota intestinale benefico e di aumentare la funzione di barriera nell'intestino.¹⁶⁷ Inoltre, *B. fragilis* presenta un'attività immunoregulatoria mediata dal *polisaccaride A (PSA)*, il quale attiva *Foxp3+* all'interno dei precursori dei linfociti T regolatori, modulando una funzione immunosoppressoria.¹⁶⁸ Per tale motivo, *B. fragilis* e *PSA* sono stati evidenziati efficaci nel trattamento di alcune patologie autoimmuni, come la RCU e l'encefalite autoimmune.¹⁶⁹

In conclusione, gli studi sulla permeabilità intestinale e sul *leaky gut* sono molteplici ma con risultati discordanti, pertanto le terapie potenzialmente impiegabili per ristabilire l'integrità funzionale ed anatomica della barriera intestinale non sono state ancora approvate. Sono necessarie ulteriori ricerche per indagare meglio il ruolo e i meccanismi della permeabilità intestinale nel controllo dell'infiammazione di numerose patologie autoimmuni gastrointestinali ed extraintestinali.

2. SCOPO DELLO STUDIO

La barriera intestinale si sviluppa su una superficie di circa 400 mq e previene la perdita di acqua ed elettroliti e l'ingresso di antigeni e microrganismi nel circolo sistemico, consentendo lo scambio di molecole tra ospite e ambiente e l'assorbimento dei nutrienti nella dieta.¹⁸⁸ Inoltre, svolge due funzioni apparentemente opposte: in primo luogo, consente una pacifica convivenza con la microflora simbiotica intestinale (senza provocare infiammazione cronica) e, in secondo luogo, fornisce una risposta infiammatoria e difensiva nei confronti di potenziali patogeni.^{189,190} Pertanto, si tratta di un complesso sistema multistrato, costituito da una barriera "fisica" esterna e da una barriera immunologica "funzionale" interna. L'interazione di queste due barriere consente di mantenere una condizione di equilibrata permeabilità.¹⁹¹ Quindi, la permeabilità intestinale è una caratteristica della barriera epiteliale, strettamente legata al microbiota commensale intestinale e agli elementi del sistema immunitario della mucosa. Molti fattori possono alterare la permeabilità intestinale, come le modifiche del microbiota intestinale, le alterazioni dello strato di muco e il danno epiteliale, con conseguente traslocazione del contenuto luminale negli strati interni della parete intestinale.¹⁹² Inoltre, lo stile di vita e fattori dietetici (come l'alcool e i cibi grassi) possono aumentare la permeabilità intestinale.^{193,194}

Nel corso degli ultimi anni, sono apparse nelle riviste scientifiche molteplici pubblicazioni a riguardo e, sebbene negli ultimi dieci anni si sia osservato come alterazioni della barriera intestinale siano associate a un'ampia gamma di patologie, i meccanismi non sono stati compresi con precisione.¹⁹²

La disfunzione della barriera intestinale è una caratteristica principale delle MICI e rappresenta una parte integrante dell'eziopatogenesi delle stesse, sviluppandosi in seguito ad un'alterata interazione tra il microbiota e l'ospite. I test di permeabilità intestinale nei pazienti con MICI hanno mostrato evidenze sia di un aumento dei flussi intestinali di molecole con cambiamenti nell'espressione delle proteine delle TJ, sia di alterazioni a carico dello strato di muco.^{195,196} Tuttavia, i risultati degli studi che evidenziano la proporzione di pazienti MICI con valori di permeabilità aumentati dipendono, in gran parte, dalla metodologia dello studio, dal tipo di pazienti, dai *cut-off* utilizzati e dall'attività della malattia. Inoltre, la maggior parte delle metodiche utilizzate per la determinazione della permeabilità intestinale sono disponibili in un setting di ricerca e difficilmente impiegabili in pratica clinica.

Pertanto, lo scopo di questo studio è stato quello di impiegare una metodologia facilmente disponibile in un *setting* ambulatoriale per valutare: i) la permeabilità intestinale nei differenti siti del tratto gastrointestinale in una coorte di pazienti con MICI e in una coorte di controlli sani; ii) le correlazioni tra le alterazioni della permeabilità intestinale, le condizioni psicologiche e la qualità di vita.

3. MATERIALI E METODI

Lo studio condotto è di tipo prospettico longitudinale svolto in collaborazione con *IRCCS* Azienda Ospedaliera Universitaria di Bologna. Sono stati selezionati 36 pazienti con diagnosi di MICI afferenti al centro regionale per le Malattie Infiammatorie Croniche Intestinali presso l'Unità Operativa Complessa di Gastroenterologia dell'Azienda Ospedale Università di Padova. Di questi, 18/36 sono stati diagnosticati precedentemente con RCU e 18/36 con MC. Il gruppo di controllo con soggetti sani asintomatici è stato arruolato presso l'Azienda Ospedaliera Universitaria di Bologna, per un totale di 17 pazienti reclutati.

I criteri di inclusione principali sono stati:

- per il gruppo MICI: diagnosi confermata di MICI, attività clinica e/o endoscopica da lieve/moderata a severa;
- per il gruppo dei controlli sani asintomatici: nessuna patologia né organica né funzionale del tratto gastrointestinale.

I criteri di esclusione per il gruppo delle MICI sono stati l'assenza di attività di malattia, confermata dalla negatività a livello obiettivo/anamnestico e/o agli esami ematochimici e strumentali/endoscopici e, per entrambi i gruppi, la presenza di un $BMI \geq 30$, in quanto l'obesità predispone, di per sé ad un'aumentata permeabilità intestinale.²⁰⁸

Al momento dell'arruolamento (baseline), sono stati raccolti i seguenti dati per ciascun paziente: età, sesso, età alla diagnosi, tipo di malattia, durata di malattia, localizzazione e fenotipo della malattia, manifestazioni extra intestinali ed eventuali terapie chirurgiche pregresse. Inoltre, è stata registrata l'attività clinica, endoscopica e parametri bioumorali al

baseline. Gli *scores* clinici utilizzati sono stati: l'*Harvey-Bradshaw Index (HBI)*, Tabella II) per i pazienti con MC, e il *Partial Mayo Score (pMayo)*, Tabella III) per i pazienti con RCU. L'attività endoscopica è stata valutata con lo *score di Rutgeerts* per i pazienti con MC sottoposti a resezione chirurgica e il *Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease (SES-CD)* per i restanti; mentre nella RCU è stato utilizzato il *Mayo Endoscopico*.

Parametro	Input e punteggio
Benessere del paziente (giorno precedente)	0 = buono 1 = leggermente inferiore alla norma 2 = scarso 3 = molto scarso 4 = pessimo
Dolore addominale (giorno precedente)	0 = assente 1 = lieve 2 = moderato 3 = severo
Numero di evacuazioni liquide o molli (giorno precedente)	possibilità di indicare un numero intero da 1 a 25
Massa addominale	0 = assente 1 = dubbia 2 = definita 3 = definita e sensibile alla palpazione
Presenza di complicanze	0 = nessuna 1 = per ogni complicazione, se presente, tra queste: <ul style="list-style-type: none"> - artralgia - uveite - eritema nodoso - ulcera aftoide - pioderma gangrenoso - fissurazione anale - comparsa di nuova fistola - ascesso

Tabella II: i 5 parametri presi in considerazione nel calcolo dell'HBI nella valutazione clinica della MC: un punteggio totale inferiore a 5 viene considerato come remissione clinica.¹⁷²

Parametro	Valutazione Clinica	Score
Frequenza evacuazioni/die	<ul style="list-style-type: none"> - normale frequenza - 1-2 in più della norma - 3-4 in più della norma - ≥ 5 in più della norma 	0 1 2 3
Sanguinamento rettale (indicare l'episodio più grave della giornata)	<ul style="list-style-type: none"> - assente - feci striate di sangue in meno della metà dei casi - sangue evidente nelle feci nella maggior parte dei casi - sanguinamento in assenza di feci 	0 1 2 3
Giudizio complessivo del Medico	<ul style="list-style-type: none"> - Normale - Attività lieve - Attività moderata - Attività grave 	0 1 2 3

Tabella III: i 3 parametri presi in considerazione nel calcolo del pMayo nella valutazione clinica della RCU: un punteggio totale inferiore a 2 viene considerato come remissione clinica, tra 2 e 4 indica attività lieve, tra 5 e 7 attività moderata e >7 attività severa.¹⁹⁸

A tutti i pazienti che hanno fornito il consenso informato allo studio è stato esaustivamente spiegato e, successivamente, consegnato il kit per la valutazione della permeabilità intestinale in studio fornito dalla ditta AB Analitica s.r.l. - *Mass-Q GASTROPACK®*. Tale kit veniva fornito al paziente con all'interno un libretto completo di istruzioni che descrive ampiamente l'utilizzo del kit prelievo e l'esecuzione del test. Il kit conteneva:

- N 1 Barattolo raccolta urina BASE: contenitore per la raccolta dell'urina (BASE), volume 120 ml, con tappo GIALLO, dotato di dispositivo di prelievo campione da provetta sottovuoto;
- N 1 Tanica raccolta urina POST: tanica per la raccolta delle urine nelle 24h, volume 2000 ml, con tappo BIANCO, dotato di dispositivo di prelievo campione da provetta sottovuoto;

- N 1 Adattatore raccolta urina: imbuto universale per tanica raccolta urine nelle 24 ore. Permette la raccolta dei liquidi biologici;
- N 1 Provetta stabilizzante: provetta da 2 ml per la conservazione del campione;
- N 2 Provette campionamento urina BASE: provetta sottovuoto, volume 8 ml, tappo GIALLO;
- N 2 Provette campionamento urina POST: provetta sottovuoto, volume 9 ml, tappo BIANCO;
- N 4 Contenitori contenenti i quattro diversi zuccheri (*mannitolo* 1000 mg, *saccarosio* 20.000 mg, *lattulosio* 5000 mg e *sucralosio* 1000 mg).

Il test è stato svolto o a domicilio dal paziente o durante il ricovero presso la UOC Gastroenterologia dell'Azienda Ospedale Università di Padova. Previa cena del giorno prima priva di carboidrati semplici o complessi, il test iniziava la mattina a digiuno, con le seconde urine della mattina che venivano raccolte all'interno del barattolo raccolta urina BASE. Dopodiché i quattro zuccheri venivano fatti sciogliere insieme in un bicchiere d'acqua minerale con successiva assunzione per via orale. Da quel momento, iniziava la raccolta delle urine nelle 6 ore successive, a digiuno di cibo, all'interno della tanica raccolta urina POST. Finite le 6 ore e dopo aver raccolto almeno 600 mL di urine nella tanica, il test si è concluso e al paziente è stato chiesto di riportare in un foglio fornito nel kit le quantità di urina prodotte nel barattolo BASE e nella tanica POST, necessarie per il calcolo delle quantità escrete degli zuccheri urinari rispetto alla quantità somministrata.

Il paziente, dopo aver svolto il test, consegnava le provette di raccolta delle urine BASE e POST agli Ambulatori della Gastroenterologia dell'Azienda Ospedale Università di Padova e il personale dedicato allo studio procedeva con l'anonimizzazione del paziente prima dell'invio dei campioni al Laboratorio Analisi presso l'*Istituto Diagnostico Varelli srl* – Napoli. Quest'ultimo ha provveduto all'analisi delle concentrazioni urinarie degli zuccheri - mannitolo, saccarosio, sucralosio e lattulosio - mediante la metodica della cromatografia liquida ad alta prestazione accoppiata ad un sistema di spettrometria di massa (*HPLC-MS*).

La concentrazione di zucchero nella provetta analizzata è stata moltiplicata per il volume di urina escreta, ricavando la misura assoluta dello zucchero che ha superato la barriera intestinale e ha raggiunto il circolo sistemico, riversandosi, quindi, nelle urine. Tutti i dati riferiti alle quantità di zuccheri escreti (Figura 30) sono stati inseriti all'interno di un documento

elettronico in cui sono stati aggiunti i valori assoluti degli zuccheri nelle urine (colonna *POST* (mg) in figura) e relativi (in percentuale) rispetto alla quantità ingerita.

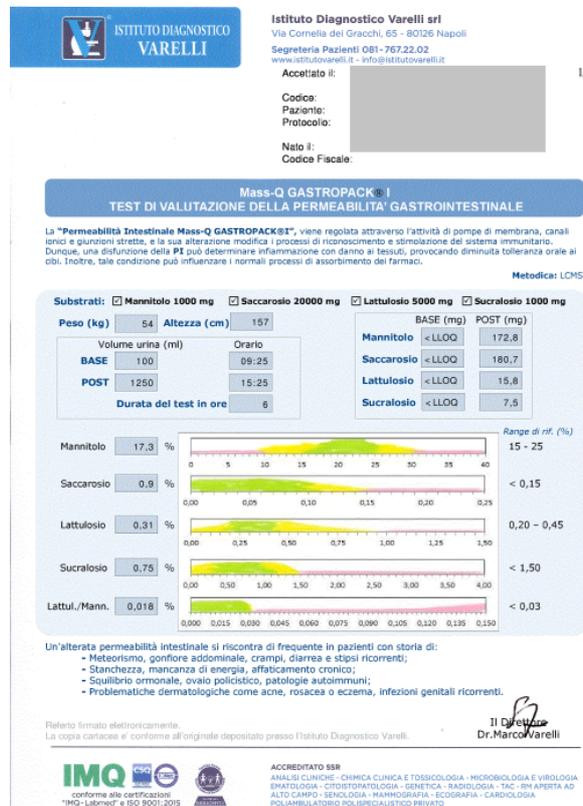


Figura 30 Fac-simile di referto del test di permeabilità intestinale ai quattro zuccheri inviato dall'Istituto Varelli: riportate in alto le quantità dei singoli zuccheri nelle urine in milligrammi; in basso, le relative rispetto alla quantità ingerita. Sulla colonna "BASE (mg)" in alto riportata la quantità di zuccheri nell'urina BASE come controllo; perché il test sia valido essa deve essere LLOQ ('Lower Limit of Quantification'), ossia sotto la minima quantità misurabile.

In aggiunta, sono stati valutati i livelli circolanti di *FGF-19*, come marker potenziale della permeabilità intestinale. L'identificazione di tale marker è stata eseguita mediante metodica *ELISA* presso il Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche dell'Università degli Studi di Bologna. Il kit *ELISA* impiegato è stato lo *Human FGF-19 Quantikine ELISA* della ditta Bio-Techne, una metodica *ELISA sandwich* disegnata per misurare il *FGF-19* umano all'interno di colture cellulari, plasma e siero.¹⁷³ Il prelievo di sangue del singolo paziente è avvenuto al momento dell'arruolamento in concomitanza della consegna del kit e solo 32/36 pazienti hanno acconsentito alla procedura.

Infine, per la valutazione del benessere psico-fisico dei pazienti arruolati sono stati dispensati tre diversi questionari:

- *Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS)*: è un questionario validato per valutare gli stati di depressione e ansia in pazienti affetti da patologia organica²⁰⁰ e presenta una versione validata italiana¹⁹⁹. È un questionario di 14 elementi che si compone di 2 scale, una che valuta l'ansia (HADS-A) e una che valuta la depressione (HADS-D). Ogni scala è formata da 7 *items* ed a ciascun *item* viene assegnato un punteggio che varia da 0 a 3. Il punteggio finale è dato dalla somma dei vari punteggi. Un valore uguale o inferiore a 7 indica l'assenza di ansia o depressione. Un punteggio tra 8 e 10 indica invece una situazione *borderline*, mentre valori uguali o superiori ad 11 stanno per indicare la presenza di ansia o depressione;

- *Short Form Health Survey a 36 items (SF-36)*: valuta la qualità di vita nelle malattie croniche. È costituito da otto scale: funzionamento fisico, limitazioni di ruolo dovute alla salute fisica, limitazioni di ruolo dovute a problemi emotivi, energia/astenia, benessere emotivo, funzionamento sociale, dolore e salute generale. Ciascuna scala è costituita da due a dieci domande con una valutazione a singolo quesito sul cambiamento delle condizioni di salute, la quale non viene impiegata per l'attribuzione del punteggio in nessuna delle otto scale.^{203,204} I quesiti e le sottoscale dell'SF-36 sono organizzati in modo tale che tanto più è elevato il punteggio tanto migliore è lo stato di salute del soggetto. Gli algoritmi relativi alle fasi di attribuzione dei punteggi sono fissati da procedure matematiche standardizzate. L'SF-36 è, senza dubbio, uno dei questionari più usati nella pratica clinica e rappresenta uno strumento validato ed affidabile per misurare la *Health-Related Quality of Life (HR-QoL)* e lo stato di salute generale dei pazienti;

- Questionario sui sintomi digestivi: è un questionario di autosomministrazione che permette la differenziazione tra la dispepsia non ulcerativa, la sindrome dell'intestino irritabile, le malattie gastrointestinali organiche e uno stato di salute.²⁰¹ La versione utilizzata è quella italiana, ormai ben validata e già largamente utilizzata in una serie di studi che vanno ad analizzare la sintomatologia intestinale nei disturbi funzionali gastrointestinali (tra cui IBS)²⁰². Il questionario contiene 46 *items* che vanno ad indagare, in termini di severità e frequenza, i seguenti sintomi: bruciore al petto, dolore retrosternale, rigurgito, disfagia, dolore allo stomaco, bruciore allo stomaco, dolore alla bocca dello stomaco, bruciore alla bocca dello stomaco, ripienezza post-prandiale,

sazietà precoce, distensione dello stomaco, nausea, vomito, dolore addominale, gonfiore addominale e distensione addominale. Infine, viene indagata l'eventuale correlazione dei sintomi addominali con l'evacuazione di feci, insieme alla consistenza di quest'ultime e alla frequenza alvina, e la presenza di ulteriori sintomi quali: eruttazione, tosse al risveglio, raucedine, necessità di schiarirsi la voce, muco nelle feci, urgenza alla defecazione, tenesmo, flatulenza, borborigmi e dismenorrea (nelle donne). Si è dimostrato particolarmente utile nel discriminare disturbi organici e funzionali, con una sensibilità del 75% e una specificità del 72%.²⁰¹

Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il software *STATA11*. I risultati sono stati considerati statisticamente significativi a fronte di un $p\text{-value} \leq 0.05$. Le variabili continue sono state riportate come medie con deviazioni standard (DS), mentre per le variabili categoriche come mediana e scarto interquartile o frequenze. I test statistici utilizzati sono non parametrici, in particolare il test di *Kruskal-Wallis (K-W test)* ed il test di *Mann-Whitney (M-W test)*. In questi ultimi test di ipotesi, si calcola il $p\text{-value}$ dell'ipotesi nulla per cui 2+ gruppi indipendenti appartengano alla stessa popolazione (*K-W test*) e per cui 2 gruppi indipendenti appartengano alla stessa popolazione (*M-W test*).

4. RISULTATI

4.1 CARATTERISTICHE SOCIO-DEMOGRAFICHE E CLINICHE DELLA POPOLAZIONE IN STUDIO

La popolazione studiata è composta da 36 pazienti con diagnosi pregressa di MICI, di cui 18 (50%) con diagnosi di RCU e 18 (50%) con diagnosi di MC. Le principali caratteristiche demografiche della popolazione sono riassunte nella Tabella IV. I pazienti affetti da MC erano per il 61.1% maschi, mentre i pazienti affetti da RCU per il 67.7%. L'età media alla diagnosi era rispettivamente 31.2 anni e 36.8 anni per i pazienti con MC e RCU. I pazienti con MC presentavano una durata media di malattia di 13.3 anni, mentre i pazienti con RCU di 36.8 anni. Per quanto riguarda i pazienti affetti da MC, la localizzazione di malattia era ileale per il 50% di essi, colica per l'11.1% e ileocolica per il 38.9%, con un'aggiunta di un'affezione del tratto GI superiore per il 16.7%. Negli stessi, il fenotipo di malattia era infiammatorio per il 50%, stenosante per il 38.9% e fistolizzante per l'11.1%.

Per i pazienti affetti da RCU, il 27.8% presentava localizzazione rettale di malattia, il 27.8% a livello del colon sinistro e il 44.4% in tutto il colon.

A riguardo delle manifestazioni extra-intestinali (*MEI*), solo in 4 pazienti erano presenti al momento della diagnosi. In particolare, tra i pazienti con MC, 2 pazienti (11.1%) presentavano *MEI* a livello oculare; mentre, a livello dei pazienti con RCU, 1 paziente (5.55%) presentava *MEI* a livello articolare e 1 paziente (5.56%) presentava *MEI* a livello sistemico.

Per quanto riguarda la chirurgia, solo 8 pazienti con MC (44.4%) sono stati sottoposti precedentemente a procedure chirurgiche, tra cui:

- Resezione Ileale: 8 (44.4%);
- Colectomia Subtotale: 5 (27.8%);
- Stricturoplastica: 2 (11.1%);
- Chirurgia delle Fistole Perianali (*fistulectomia/fistulotomia*): 3 (16.7%).

CARATTERISTICHE DEMOGRAFICHE DELLA POPOLAZIONE	
Numero di pazienti	
MC - n (%)	18 (50%)
RCU - n (%)	18 (50%)
Sesso (maschi)	
MC - n (%)	11 (61.1%)
RCU - n (%)	12 (66.7%)
Età alla diagnosi	
MC media±DS	31.2 ± 18.7 anni
RCU media±DS	36.8 ± 14.9 anni
Durata di Malattia	
MC media±DS	13.3 ± 10.8 anni
RCU media±DS	10.7 ± 8.7 anni
Localizzazione MC	
ileale - n (%)	9 (50%)
colica - n (%)	2 (11.1%)
ileocolica - n (%)	7 (38.9%)
tratto GI superiore - n (%)	3 (16.7%) in aggiunta
Fenotipo MC	
Infiammatoria - n (%)	9 (50%)
Stenosante - n (%)	7 (38.9%)
Fistolizzante - n (%)	2 (11.1%)
Localizzazione RCU	
Proctite - n (%)	5 (27.8%)
Colite sinistra - n (%)	5 (27.8%)
Pancolite - n (%)	8 (44.4%)
Manifestazioni Extra-Intestinali MC	
assenti - n (%)	16 (88.9%)
presenti - n (%)	2 (11.1%)
Manifestazioni Extra-Intestinali RCU	
assenti - n (%)	16 (88.9%)
presenti - n (%)	2 (11.1%)

Tabella IV: Principali caratteristiche demografiche della popolazione in esame, divisa per pazienti con RCU e pazienti con MC.

In Tabella V, sono state riportate le caratteristiche cliniche al *baseline* nel momento del reclutamento. L'età media nel gruppo MC era di 43.8 anni, mentre per RCU era di 47.4 anni. Il valore medio di BMI dei due gruppi era 23.1 e 23.7, rispettivamente per MC e RCU.

Dal punto di vista clinico, l'11.1% dell'intera coorte di pazienti con MICI presentava malattia in fase di remissione, il 27.8% di grado lieve, il 38.9% di grado moderato e il 22.2% di grado severo.

Dal punto di vista endoscopico, il 32.4% dell'intera coorte di pazienti con MICI presentava malattia in fase di remissione, l'8.8% di grado lieve, il 14.7% di grado moderato e il 44.1% di grado severo.

Infine, il 55.6% della coorte al momento del test era sotto terapia con aminosalicilati (comprendenti *sulfasalazina* e *mesalazina*, in tutte le loro modalità di somministrazione), l'8.3% sotto immunosoppressori (*tiopurine*), il 47.2% sotto corticosteroidi (sia a bassa biodisponibilità orale sia sistemici) e il 50% sotto farmaci biologici (*anticorpi monoclonali anti-TNF, anti-IL-12/23, anti-integrine*).

CARATTERISTICHE CLINICO-ENDOSCOPICHE AL MOMENTO DELL'ARRUOLAMENTO	
Età all'Arruolamento	
MC media±DS	43.8 ± 18.1 anni
RCU media±DS	47.4 ± 15.2 anni
BMI	
MC media±DS	23.1 ± 3.9
RCU media±DS	23.7 ± 3.7
Attività Clinica di Malattia	
remissione n (%)	4 (11.1%)
lieve n (%)	10 (27.8%)
moderata n (%)	14 (38.9%)
severa n (%)	8 (22.2%)
Attività Endoscopica di Malattia	
remissione	11 (32.4%)
lieve	3 (8.8%)
moderata	5 (14.7%)
severa	15 (44.1%)
Terapia Farmacologica	
aminosalicilati	20 (55.6%)
immunosoppressori	3 (8.3%)
corticosteroidi	17 (47.2%)
farmaci biologici	18 (50%)

Tabella V: Principali caratteristiche clinico-endoscopiche della popolazione in esame, i dati in percentuale sono espressi rispetto all'intera coorte di pazienti con MICI.

4.2 VALUTAZIONE DELLA PERMEABILITÀ INTESTINALE TRAMITE TEST *IN VIVO* AI QUATTRO ZUCCHERI

I valori dell'escrezione urinaria dei quattro zuccheri somministrati nei pazienti reclutati (*UC* per RCU, *CD* per MC e *AC* per i controlli asintomatici) sono stati confrontati, per singolo zucchero, tra i vari gruppi in esame.

I valori di mannitolo escreto nelle urine sono risultati significativamente ridotti nel gruppo MC rispetto ai controlli sani ($p=0.0018$), mentre non sono state evidenziate differenze con pazienti RCU (Figura 31).

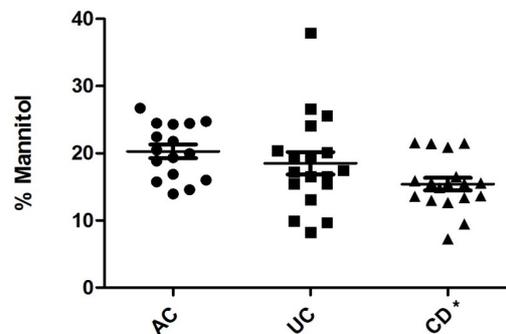


Figura 31 Scatter Plot dei dati di escrezione urinaria del mannitolo (espressi in % sull'asse dell'ordinate) rispetto ai tre gruppi in studio (riportati sull'asse delle ascisse). * $p=0.0018$ AC vs CD

Per il lattulosio, i valori dello zucchero escreto nelle urine non sono risultati aumentati rispetto al gruppo AC né nel gruppo MC né nel gruppo RCU, con risultati omogenei all'interno dei tre (Figura 32).

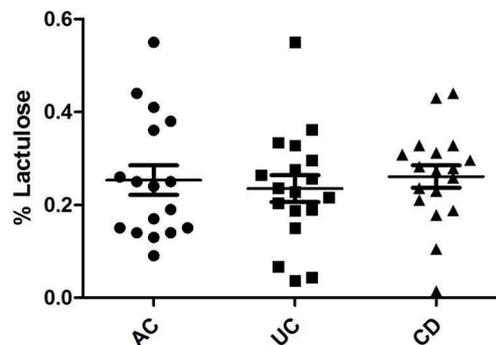


Figura 32 Scatter Plot dei dati di escrezione urinaria del lattulosio (espressi in % sull'asse dell'ordinate) rispetto ai tre gruppi indipendenti (riportati sull'asse delle ascisse).

Dai singoli valori di %lattulosio e di %mannitolo, si è ricavato il *LMR* come numero puro, e si è confrontato tra i vari gruppi. In particolare, sono stati rilevati risultati significativamente aumentati nel gruppo MC rispetto ai controlli sani ($p=0.05$), mentre non sono state evidenziate differenze con i pazienti RCU (Figura 33).

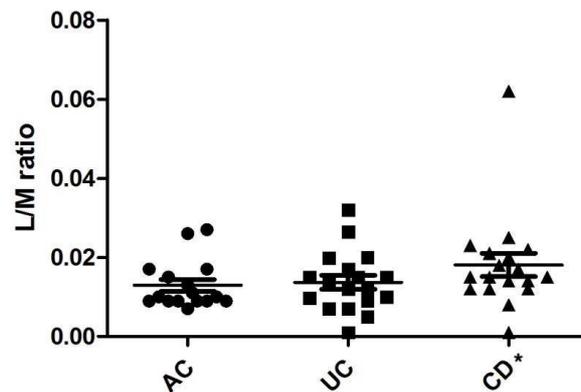


Figura 33 Scatter Plot dei dati del *LMR* (sull'asse dell'ordinate) rispetto ai tre gruppi indipendenti (riportati sull'asse delle ascisse). * $p=0.05$ AC vs CD

I valori di saccarosio escreto nelle urine sono risultati significativamente aumentati sia nel gruppo MC rispetto ai controlli asintomatici ($p<0.001$) sia nel gruppo RCU rispetto ad AC ($p=0.008$) sia in tutti e tre i gruppi ($p=0,0015$) (Figura 34).

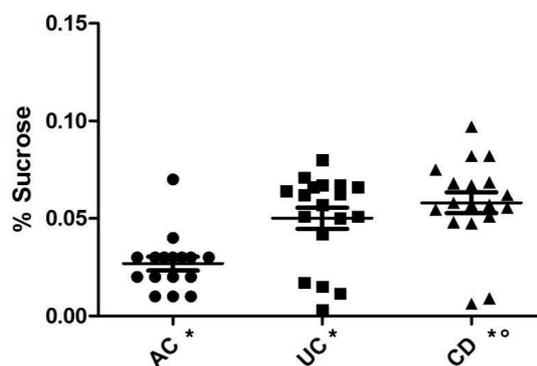


Figura 34 Scatter Plot dei dati di escrezione urinaria del saccarosio (espressi in % sull'asse dell'ordinate) rispetto ai tre gruppi indipendenti (riportati sull'asse delle ascisse). * $p=0.008$ AC vs UC vs CD; ° $p<0.001$ AC vs CD

Infine, i dati dell'escrezione urinaria di sucralosio sono risultati significativamente aumentati solo nel gruppo MC rispetto al gruppo AC ($p=0,048$), con somiglianza del dato tra quello di quest'ultimo e quello del gruppo RCU (Figura 35).

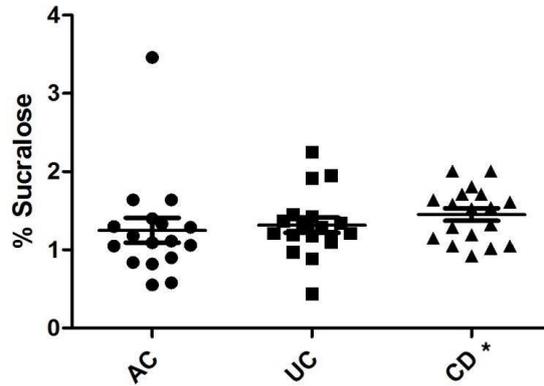


Figura 35 Scatter Plot dei dati di escrezione urinaria del sucralosio (espressi in % sull'asse dell'ordinate) rispetto ai tre gruppi indipendenti (riportati sull'asse delle ascisse). * $p=0,048$ AC vs CD

4.3 DETERMINAZIONE DEL MARKER FGF-19

La permeabilità intestinale è stata indagata, anche, attraverso un potenziale nuovo marker sierico, il *FGF19*, nei pazienti inclusi nello studio mediante analisi ELISA. Confrontando i livelli di *FGF19* nei tre gruppi esaminati, sono stati riscontrati livelli di *FGF19* significativamente ridotti nei gruppi dei pazienti affetti da MICI rispetto al gruppo dei controlli sani ($p=0.05$), nel gruppo dei pazienti MC rispetto al gruppo dei AC ($p=0.023$) e nel gruppo RCU rispetto al gruppo dei AC ($p=0.05$). (Figura 36).

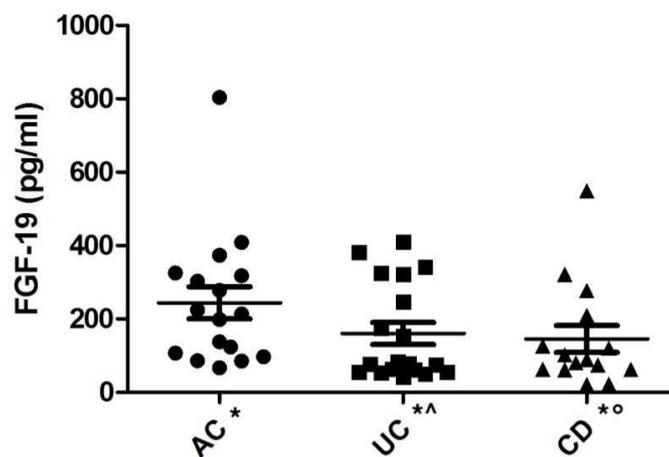


Figura 36 Scatter Plot dei dati di FGF19 sierico (espressi in pg/mL sull'asse dell'ordinate) rispetto ai tre gruppi indipendenti (riportati sull'asse delle ascisse). * $p=0,05$ AC vs UC vs CD; $^{\circ}p=0,0235$ AC vs CD; $^{\wedge}p=0.05$ AC vs UC

4.4 DESCRIZIONE DELLA QUALITA' DI VITA, SINTOMI DEPRESSIVI E DIGESTIVI DELLA POPOLAZIONE IN STUDIO

Dei 36 pazienti della coorte in studio, si è riusciti a raccogliere informazioni dalla compilazione dei questionari solo di 12/18 pazienti con RCU e di 11/18 pazienti con MC, in quanto i restanti non hanno acconsentito alla procedura. I risultati ottenuti sono riassunti in Tabella VI e quelli di RCU e MC sono stati confrontati tra loro e, singolarmente, con quelli di AC.

All'interno dei questionari somministrati, sono stati valutati, nello specifico nell'analisi dei questionari sui sintomi digestivi, solo i risultati sui sintomi del dolore addominale (con uno *score da 0-4*) e del gonfiore addominale (con uno *score da 0-4*), in quanto i restanti sono stati ritenuti non informativi sulla patologia in studio. In particolare, per il dolore addominale si sono visti, in termini di severità, degli *scores* medi di 1.75 per RCU e di 0.9 per MC, con differenze nei risultati significative in RCU rispetto ad AC ($p=0,049$). In termini di severità, invece, lo *score* medio era di 1.67 e 0.8 per RCU e MC rispettivamente. Per quanto riguarda, poi, il gonfiore addominale, si sono visti *scores* medi per la severità di 1.5 e 1.3 per RCU e MC, mentre per la frequenza di 2.08 e 1.6 per RCU e MC rispettivamente. Si sono osservate, in particolare, delle differenze statisticamente significative tra i tre campioni nella frequenza del gonfiore ($p<001$).

Il questionario *HADS* (diviso in *HADS-A* e *HADS-D*) ha restituito come *scores* medi, rispettivamente per RCU e MC, di 6.54 e 6.69 per la parte sull'ansia, e di 7 e 2 per la parte sulla depressione. Aumenti significativi si sono notati, sia per *HADS-A* ($p=0.001$) sia per l'*HADS-D* ($p<0.001$), tra il gruppo RCU e il gruppo AC.

Il questionario SF-36 ha restituito, come *score* medio sul benessere fisico, 77.08 per RCU e 78.64 per MC, con *scores* ridotti significativamente per entrambi i gruppi rispetto ad AC ($p<0.001$). Le limitazioni a causa del malessere fisico si sono dimostrate significativamente maggiori per entrambi i gruppi (valori medi di *scores* di 20.82 per RCU e 68.18 per MC) con valori della $p\leq 0.001$. Anche le limitazioni associate al malessere emotivo si sono dimostrate maggiori sia per RCU sia per MC rispetto ad AC ($p\leq 0.001$), con valori medi di 41.67 e 48.8 rispettivamente. Il benessere emotivo (*scores* medi: 43.33 e 40 per RCU e MC) e la vitalità (*scores* medi: 58 e 54.55 per RCU e MC) nella vita quotidiana erano significativamente ridotti

nelle MICI rispetto ad AC ($p < 0.001$). Oltre a ciò, le capacità sociali apparivano ridotte significativamente nei pazienti con RCU rispetto agli AC ($p < 0.001$), con *scores* medi di 52.08 per RCU e 73.86 per MC. Infine, il dolore percepito risultava maggiore in entrambe le patologie rispetto ad AC (*scores* medi: 52.08 e 73.86 per RCU e MC) con una $p \leq 0.001$ e la salute generale risultava fortemente diminuita nei pazienti con MICI rispetto agli AC ($p \leq 0.002$; *scores* medi: 38.75 e 44.09 per RCU e MC).

	AC	UC	CD	<i>p-value</i>
Abdominal Pain Score (0-4)				
Severity	17; 1.06 ± 0.24; 1 (1; 1)	12; 1.75 ± 1.29; 2 (0.5; 2.5)	10; 0.9 ± 0.99 0.5 (0; 2)	AC vs UC: 0.049 AC vs CD: 0.521 UC vs CD: 0.107
Frequency	17; 1.06 ± 0.24; 1 (1; 1)	12; 1.67 ± 1.56; 1 (0.5; 3)	10; 0.8 ± 1.03; 0.5 (0; 1)	AC vs UC: 0.449 AC vs CD: 0.086 UC vs CD: 0.158
Bloating Score (0-4)				
Severity	17; 1.41 ± 0.62; 1 (1; 2)	12; 1.5 ± 1.09; 2 (0.5; 2)	10; 1.3 ± 0.95; 2 (0; 2)	AC vs UC: 0.652 AC vs CD: 0.935 UC vs CD: 0.643
Frequency	17; 1.41 ± 0.62; 1 (1; 2)	12; 2.08 ± 1.62; 2 (0.5; 4)	10; 1.6 ± 1.26; 2 (0; 3)	AC vs UC: 0.233 AC vs CD: 0.574 UC vs CD: 0.497 Overall: <0.001*
Anxiety Score (HADS-A)	17; 2.06 ± 2.41; 2 (0; 3)	13; 6.54 ± 3.57; 6 (5; 9)	13; 6.69 ± 6.03; 6 (0; 11)	AC vs UC: 0.001* AC vs CD: 0.066 UC vs CD: 0.979
Depression Score (HADS-D)	17; 1.12 ± 1.27; 1 (0; 2)	13; 7 ± 5.07; 7 (3; 9)	13; 4.77 ± 5.43; 2 (0; 7)	AC vs UC: <0.001* AC vs CD: 0.077 UC vs CD: 0.156
Health Related Quality of Life (SF-36 Questionnaire)				

Physical functioning	17; 98.82 ± 4.85; 100 (100; 100)	12; 77.08 ± 15.59; 75 (65; 90)	11; 78.64 ± 23.35; 90 (70; 100)	AC vs UC: <0.001* AC vs CD: <0.001* UC vs CD: 0.494
Role limitations due to physical health	17; 100 ± 0; 100 (100; 100)	12; 20.83 ± 38.19; 0 (0; 37.5)	11; 68.18 ± 41.97; 100 (25; 100)	AC vs UC: <0.001* AC vs CD: 0.003* UC vs CD: 0.008*
Role limitations due to emotional problems	17; 98.04 ± 8.08; 100 (100; 100)	12; 41.67 ± 51.49; 0 (0; 100)	11; 48.48 ± 40.46; 33.3 (0; 100)	AC vs UC: 0.001* AC vs CD: <0.001* UC vs CD: 0.599
Emotional well-being	17; 76.18 ± 12.81; 70 (65; 90)	12; 43.33 ± 20.15; 50 (30; 57.5)	11; 40 ± 23.13; 45 (20; 50)	AC vs UC: <0.001* AC vs CD: <0.001* UC vs CD: 0.535
Vitality	17; 84.00 ± 13.42; 88 (80; 92)	12; 58 ± 15.05; 62 (48; 68)	11; 54.55 ± 20.42; 52 (36; 68)	AC vs UC: <0.001* AC vs CD: <0.001* UC vs CD: 0.665
Social functioning	17; 91.18 ± 13.08; 100.0 (87.5; 100.0)	12; 52.08 ± 31.46; 56.25 (25; 81.25)	11; 73.86 ± 24.66; 75 (50; 100)	AC vs UC: <0.001* AC vs CD: 0.062 UC vs CD: 0.093
Pain	17; 96.18 ± 13.41; 100 (100; 100)	12; 52.08 ± 31.46; 56.25 (25; 81.25)	11; 73.86 ± 24.66; 75 (50; 100)	AC vs UC: <0.001* AC vs CD: 0.001* UC vs CD: 0.731
General health	17; 80.29 ± 14.73; 80 (70; 95)	12; 38.75 ± 21.44; 30 (22.5; 55)	11; 44.09 ± 28.18; 40 (15; 70)	AC vs UC: <0.001* AC vs CD: 0.002* UC vs CD: 0.578

Tabella VI: Risultati ottenuti dalla compilazione dei tre questionari da parte della coorte in studio. In alto il numero di partecipanti, in basso l'intervallo media ± SD e la mediana con scarto interquartile tra parentesi.

5. DISCUSSIONE

Lo studio della permeabilità intestinale all'interno di patologie organiche come le MICI si pone come obiettivo quello di aumentare le nostre conoscenze sulla patogenesi di malattie che sono, molto spesso, eterogenee e complesse, e di studiare eventuali *markers* che possano correlare con i sintomi e con la severità di malattia. Gli studi precedentemente effettuati hanno dato risultati contrastanti, con questi ultimi che si sono dimostrati strettamente dipendenti dal tipo di test impiegato e dalla severità di malattia.¹¹⁵

Questo studio si propone, a livello pionieristico, di valutare le differenze che intercorrono tra il paziente sano e quello affetto da MICI nei risultati del test di permeabilità ai quattro zuccheri e nel dosaggio dei livelli sierici di *FGF-19*, come potenziale *biomarker* di permeabilità non ancora validato. Fino ad adesso, la stragrande maggioranza dei test di permeabilità agli zuccheri che sono stati utilizzati prevedevano la somministrazione solo di due/tre zuccheri. Nel nostro studio, abbiamo provato a testare contemporaneamente la permeabilità di tutti i segmenti dell'intero tratto GI (dall'esofago al duodeno con il *saccarosio*, il piccolo intestino con il *lattulosio*, il *mannitolo* e il *LMR* e il colon e l'intero tratto GI con il *sucralosio*). Inoltre, non sono ancora noti in letteratura studi che abbiano valutato il ruolo di *FGF-19* all'interno delle MICI, soprattutto per quanto riguarda il sintomo della diarrea e l'alterata permeabilità intestinale conseguenti all'aumentata produzione e all'aumentata permanenza degli acidi biliari all'interno del lume colico indotte dalla ridotta azione dell'ormone.

In generale, si sono visti differenti livelli di escrezione urinaria degli zuccheri somministrati nel gruppo MICI rispetto al gruppo AC. In particolare, il mannitolo ($p=0.001$), il LMR ($p=0.05$), il saccarosio ($p<0.001$) e il sucralosio ($p=0.047$) si sono visti alterati nella MC rispetto ai controlli, con la permeabilità intestinale che si è vista aumentata in tutti i segmenti dell'apparato gastroenterico. Per la RCU, invece, la permeabilità si è dimostrata, tutto sommato, conservata, a eccezione di un aumento significativo della permeabilità al saccarosio ($p=0.008$) rispetto ai AC. In conclusione, nei limiti dell'accuratezza del test e della metodica di analisi, il test ai quattro zuccheri sembra essere di maggiore rilevanza clinica all'interno della MC rispetto alla RCU, come era in parte prevedibile vista la diversa localizzazione di malattia delle due patologie specifiche.

Per quanto riguarda il *FGF-19*, i livelli sierici si sono dimostrati significativamente ridotti sia in MC ($p=0.023$) sia in RCU ($p=0.05$) rispetto ai AC. Il dato si traduce, a livello patofisiologico, in una conseguente maggiore secrezione e una prolungata permanenza di acidi biliari a livello dell'intestino tenue, con effetti a livello dell'alterazione dell'architettura della barriera epiteliale per la loro azione detergente a livello della membrana plasmatica degli enterociti.¹³¹ Pertanto, il *FGF-19* si può configurare come un potenziale marker di alterata permeabilità, in quanto gli stessi pazienti presentano, allo stesso tempo, un'aumentata permeabilità testata *in vivo* con il test ai quattro zuccheri.

Infine, il benessere psicofisico si è visto fortemente ridotto nei pazienti con MICI rispetto ai controlli, con la permeabilità intestinale che potrebbe giocare un ruolo a tal proposito. Da studi, si è visto che si sono riscontrati aumentati livelli di *zonulina*, *LPS* e *FABP* (segni di aumentata permeabilità intestinale) in pazienti con disturbi dell'umore.²⁰⁸ In accordo con questo, gli stessi pazienti con MICI del nostro studio, che presentano livelli significativamente aumentati di zuccheri escreti con le urine e significativamente ridotti di *FGF-19* nel sangue rispetto ai controlli, presentano un benessere psichico (sotto vari aspetti) fortemente diminuito rispetto ai controlli sani. Pertanto, sembra essere confermata una potenziale associazione tra il *leaky gut* e lo sviluppo di disturbi psicologici. Tuttavia, essendo nota la correlazione tra i disturbi ansioso-depressivi e le patologie croniche²⁰⁹, potrebbe risultare molto complesso stabilire un rapporto causale tra il *leaky gut* e i disturbi dell'umore all'interno delle MICI, senza considerare il peso della patologia organica cronica di per sé.

Come principale criticità, si trova il fatto che il test è stato eseguito senza supervisione, con i risultati che potrebbero essere stati influenzati da eventuale assunzione di zuccheri dalla dieta o da eventuale bassa *compliance* nella procedura. Come aspetto a favore dell'accuratezza del dato, tutti i controlli nell'urina escreta prima dell'assunzione degli zuccheri sono risultati negativi, con livelli di zuccheri non individuabili entro i limiti di risoluzione della *HPLC-MS* utilizzata. Inoltre, i test statistici impiegati sono non parametrici in quanto i gruppi analizzati non presentano una numerosità sufficientemente elevata da assumere la distribuzione dei dati come normale; per tale motivo, sono state possibili solo analisi qualitative sui dati. Al fine di avere dati quantitativi, con calcolo di intervalli di confidenza che possano aiutare nell'individuazione di un *range* patologico di escrezione degli zuccheri e di concentrazioni sieriche di *FGF-19*, sono necessari campioni più numerosi e un'analisi prospettica dei dati a lungo termine.

6. CONCLUSIONE

I pazienti con MICI reclutati nello studio presentano un'aumentata permeabilità intestinale rispetto ai controlli sani asintomatici, confermata da un'aumentata escrezione urinaria degli zuccheri somministrati e da ridotti livelli sierici di *FGF-19*. Per quanto riguarda i dati di escrezione urinaria degli zuccheri somministrati, all'interno del gruppo MICI, il gruppo MC presenta una maggiore variabilità rispetto al gruppo dei controlli. Pertanto, la rilevanza clinica del dato sembra appannaggio della MC rispetto alla RCU. I livelli sierici di *FGF-19*, invece, risultano significativamente diminuiti rispetto al gruppo dei controlli, nel gruppo RCU sia nel gruppo MC. Gli studi sulla rilevanza clinica dell'impiego dei test ai quattro zuccheri e del dosaggio sierico di *FGF-19* nelle MICI, come parametri di valutazione della permeabilità intestinale, sono ancora troppo pochi perché questi strumenti possano essere validati all'interno dell'*iter* diagnostico e terapeutico. Servirebbero studi più ampi e più a lungo termine per ottenere risultati quantitativi, allo scopo di determinare la sensibilità e la specificità dei test.

Il benessere psicofisico si è visto fortemente ridotto sia nella MC sia nella RCU rispetto ai controlli. Risulta, però, difficile stabilire un rapporto causale tra il *leaky gut* e lo sviluppo di disturbi psicofisici, non considerando il peso della patologia organica cronica di per sé.

7. BIBLIOGRAFIA

1. McDowell C, Farooq U, Haseeb M. Inflammatory Bowel Disease. 2021 Aug 31. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–. PMID: 29262182;
2. Mak, W. Y., Zhao, M., Ng, S. C., and Burisch, J. (2020) The epidemiology of inflammatory bowel disease: East meets west. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 35: 380– 389;
3. Ananthakrishnan, A. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 12, 205–217 (2015);
4. Tsertsvadze A, Gurung T, Court R, Clarke A, Sutcliffe P. Clinical effectiveness and cost-effectiveness of elemental nutrition for the maintenance of remission in Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *Health Technol Assess.* 2015 Mar;19(26):1-138. doi: 10.3310/hta19260. PMID: 25831484; PMCID: PMC4781042;
5. Teahon K, Smethurst P, Pearson M, Levi AJ, Bjarnason I. The effect of elemental diet on intestinal permeability and inflammation in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1991;101:84–89;
6. Wyatt J, Vogelsang H, Hubl W, Waldhoer T, Lochs H. Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. *Lancet* 1993;341:1437–1439;
7. Yacyshyn BR, Meddings JB. CD45RO expression on circulating CD19⁺ B cells in Crohn's disease correlates with intestinal permeability. *Gastroenterology* 1995;108:132–137;
8. Farmer RG, Michener WM. Association of inflammatory bowel disease in families. *Front Gastrointest Res* 1986;
9. Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sorensen TIA, Binder V. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N.Engl J Med* 1991;
10. Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G, Floderus-Myrhed B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in unselected population of monozygotic and dizygotic twins: a study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 1988;
11. Bayless TM, Tokayer AZ, Polito JM, Quaskey SA, Millits ED, Harris ML. Crohn's disease: concordance for site and clinical type in affected family members—potential hereditary influences. *Gastroenterology* 1996;111:573–579;

12. Kett K, Rognum TO, Brandtzaeg P. Mucosal subclass distribution of immunoglobulin G-producing cells is different in ulcerative colitis and Crohn's disease of the colon. *Gastroenterology* 1987;93:919–924;
13. Das KM, Vecchi M, Sakamaki S. A shared and unique epitope(s) on human colon, skin, and biliary epithelium detected by a monoclonal antibody. *Gastroenterology* 1990;98:464–469;
14. Bhagat S, Das KM. A shared and unique epitope in the human colon, eye and joint detected by a monoclonal antibody. *Gastroenterology* 1994;107:103–108;
15. Das KM, Dasgupta A, Mandal A, Geng X. Autoimmunity to cytoskeletal protein tropomyosin. A clue to the pathogenetic mechanisms for ulcerative colitis. *J Immunol* 1993;150:2487–2493;
16. Takahashi F, Das KM. Isolation and characterization of a colonic autoantigen specifically recognized by colon tissue-bound immunoglobulin G from idiopathic ulcerative colitis. *J Clin Invest* 1985;76:311–318;
17. Duerr RH, Targan SR, Landers CJ, LaRusso NF, Lindsay KL, Wiesner RH, Shanahan F. Neutrophil cytoplasmic antibodies: a link between sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1991;100:1385–1391;
18. Shanahan F, Duerr RH, Rotter JJ, Yang H, Sutherland LR, McElree C, Landers CJ, Targan SR. Neutrophil autoantibodies in ulcerative colitis: familial aggregation and genetic heterogeneity. *Gastroenterology* 1992;103:456–461;
19. Vecchi M, Binchi MB, Sinico RA, Radice A, Meucci G, Torgano G, Omodei P, Forzenigo L, Landoni M, Arrigoni M, Pozzi C, De Franchis R. Antibodies to neutrophil cytoplasm in Italian patients with ulcerative colitis: sensitivity, specificity and recognition of putative antigens. *Digestion* 1994;55:34–39;
20. Sandborn WJ, Landers CJ, Tremaine WJ, Targan SR. Antineutrophil cytoplasmic antibody correlates with chronic pouchitis after ileal pouch-anal anastomosis. *Am J Gastroenterol* 1995;90:740–747;
21. Matsuura T, West GA, Youngman KR, Klein JS, Fiocchi C. Immune activation genes in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1993;104:448–458;
22. Sparano JA, Brandt LJ, Dutcher JP, DuBois JS, Atkins MB. Symptomatic exacerbation of Crohn disease after treatment with high-dose interleukin-2. *Ann Intern Med* 1993;118:617–618;
23. Fais S, Capobianchi MR, Pallone F, DiMarco P, Boirivant M, Dianzani F, Torsoli A. Spontaneous release of interferon-gamma by intestinal lamina propria lymphocytes in

- Crohn's disease. Kinetics of in vitro response to interferon-gamma inducers. *Gut* 1991;32: 403–407;
24. Breese E, Braegger CP, Corrigan CJ, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Interleukin-2- and interferon-gamma-secreting T cells in normal and diseased human intestinal mucosa. *Immunology* 1993;78:127–131;
 25. Braegger CP, Nicholls S, Murch SH, Stephens S, MacDonald TT. Tumour necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation. *Lancet*. 1992;339(8785):89-9;
 26. Breese EJ, Michie CA, Nicholls SW, Murch SH, Williams CB, Domizio P, et al. Tumor necrosis factor alpha-producing cells in the intestinal mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1994;106(6):1455-1466;
 27. Maeda M, Watanabe N, Neda H, Yamauchi N, Okamoto T, Sasaki H, et al. Serum tumor necrosis factor activity in inflammatory bowel disease. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 1992;14(3):451-461;
 28. de Silva DG, Mendis LN, Sheron N, Alexander GJ, Candy DC, Chart H, et al. TNF alpha in stool as marker of intestinal inflammation. *Lancet*. 1992;340(8815):372;
 29. Hyams JS, Treem WR, Eddy E, Wyzga N, Moore RE. Tumor necrosis factor-alpha is not elevated in children with inflammatory bowel disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 1991;12(2):233-236;
 30. Derkx B, Taminau J, Radema S, Stronkhorst A, Wortel C, Tytgat G, et al. Tumour-necrosis-factor antibody treatment in Crohn's disease. *Lancet*. 1993;342(8864):173-174;
 31. Kontoyiannis D, Pasparakis M, Pizarro TT, Cominelli F, Kollias G. Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: Implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity*. 1999;10(3):387-398;
 32. Bamias G, Corridoni D, Pizarro TT, Cominelli F. New insights into the dichotomous role of innate cytokines in gut homeostasis and inflammation. *Cytokine*. 2012;59(3):451-459;
 33. Kollias G, Douni E, Kassiotis G, Kontoyiannis D. The function of tumour necrosis factor and receptors in models of multi-organ inflammation, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1999;58(Suppl 1):I32-I39;
 34. Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2003;3:521–533;

35. McGovern D, Powrie F. The IL23 axis plays a key role in the pathogenesis of IBD. *Gut*. 2007;56(10):1333-1336. doi:10.1136/gut.2006.115402;
36. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut*. 2006;55(6):749-753. doi:10.1136/gut.2005.082909;
37. Skomorochow E, Pico J. Toxic Megacolon. 2021 Jul 10. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. PMID: 31613459;
38. Truelove SC, Witts LJ. Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial. *Br Med J*. 1955;2:1041-8;
39. Ferrer Márquez M, Hernández Martínez Á, Reina Duarte Á, Rosado Cobián R. Estado actual del tratamiento de la colitis fulminante. *Cir Esp*. 2015;93:276-282;
40. Safar B, Sands D. Perianal Crohn's disease. *Clin Colon Rectal Surg*. 2007;20(4):282-293. doi:10.1055/s-2007-991027;
41. Sands BE. From symptom to diagnosis: clinical distinctions among various forms of intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2004; 126:1518;
42. <https://www.crohnsandcolitis.org.uk/about-crohns-and-colitis/publications/fistulas#:~:text=Fistulas%20are%20more%20common%20if,out%20a%20chamber%20or%20hole;>
43. Schwartz DA, Loftus EV Jr, Tremaine WJ, et al. The natural history of fistulizing Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota. *Gastroenterology* 2002; 122:875;
44. Sange AH, Srinivas N, Sarnaik MK, et al. Extra-Intestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease. *Cureus*. 2021;13(8):e17187. Published 2021 Aug 15. doi:10.7759/cureus.17187;
45. Olpin JD, Sjoberg BP, Stilwill SE, Jensen LE, Rezvani M, Shaaban AM. Beyond the bowel: extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Radiographics*. 2017;37:1135-1160;
46. Vavricka SR, Schoepfer A, Scharl M, Lakatos PL, Navarini A, Rogler G. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21:1982-1992;
47. Requena L, Requena C. Erythema nodosum. <https://doi.org/10.5070/D34829t6rn> *Dermatol Online J*. 2002;8:4;
48. Wollina U. Pyoderma gangrenosum - a review. *Orphanet J Rare Dis*. 2007;2:19;
49. Gregory B, Ho VC. Cutaneous manifestations of gastrointestinal disorders. Part II. *J Am Acad Dermatol* 1992;26:371-83;

50. Ali M, Duerksen DR. Ulcerative colitis and Sweet's syndrome: a case report and review of the literature. *Can J Gastroenterol.* 2008;22(3):296-298;
51. Ytting H, Vind I, Bang D, Munkholm P. Sweet's syndrome – an extraintestinal manifestation in inflammatory bowel disease. *Digestion.* 2005;72:195–200;
52. Olpin JD, Sjoberg BP, Stilwill SE, Jensen LE, Rezvani M, Shaaban AM. Beyond the bowel: extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Radiographics.* 2017;37:1135–1160;
53. Cloché V, Buisson A, Tréchet F, et al. Ocular symptoms are not predictive of ophthalmologic inflammation in inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis.* 2013;45:195–199;
54. Troncoso LL, Biancardi AL, de Moraes HV Jr, Zaltman C. Ophthalmic manifestations in patients with inflammatory bowel disease: a review. *World J Gastroenterol.* 2017;23:5836–5848;
55. Hepatobiliary manifestations and complications in inflammatory bowel disease: a review. Fousekis FS, Theopistos VI, Katsanos KH, Tsianos EV, Christodoulou DK. *Gastroenterology Res.* 2018;11:83–94;
56. Rawla P, Samant H. Primary Sclerosing Cholangitis. 2021 Dec 12. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–. PMID: 30725866;
57. Maghfour J, Olson J, Conic RRZ, Mesinkovska NA. The Association between Alopecia and Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Dermatology.* 2021;237(4):658-672. doi: 10.1159/000512747. Epub 2021 Jan 13. PMID: 33440387;
58. Ankylosing spondylitis. An update. Golder V, Schachna L. <https://www.racgp.org.au/afp/2013/november/ankylosing-spondylitis/> *Aust Fam Physician.* 2013;42:780–784;
59. Treatment of ankylosing spondylitis. Clegg DO. <https://www.jrheum.org/content/78/24.long> *J Rheumatol.* 2006;1:24–31;
60. The prevalence and clinical associations of subclinical sacroiliitis in inflammatory bowel disease. Kelly OB, Li N, Smith M, Chan J, Inman RD, Silverberg MS. *Inflamm Bowel Dis.* 2019;25:1066–1071;
61. The prevalence and clinical associations of subclinical sacroiliitis in inflammatory bowel disease. Kelly OB, Li N, Smith M, Chan J, Inman RD, Silverberg MS. *Inflamm Bowel Dis.* 2019;25:1066–1071;
62. <https://spondylitis.org/about-spondylitis/types-of-spondylitis/enteropathic-arthritis>;

63. Salvarani C, Fries W. Clinical features and epidemiology of spondyloarthritides associated with inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*. 2009;15(20):2449–2455;
64. Rothfuss KS, Stange EF, Herrlinger KR. Extraintestinal manifestations and complications in inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastroenterology*. 2006;12(30):4819–4831;
65. Peluso R, Di Minno MN, Iervolino S, et al. Enteropathic spondyloarthritis: from diagnosis to treatment. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:631408. doi:10.1155/2013/631408;
66. Travis S.P.L. Jewell D.P. Ulcerative colitis: clinical presentation and diagnosis Satsangi J. Sutherland L.R. *Inflammatory bowel diseases 2003* Churchill Livingstone London 169–181;
67. Rodgers A.D. Cummins A.G. CRP correlates with clinical score in ulcerative colitis but not in Crohn's disease *Dig Dis Sci* 52 2007 2063–2068;
68. Waugh N, Cummins E, Royle P, Kandala NB, Shyangdan D, Arasaradnam R, Clar C, Johnston R. Faecal calprotectin testing for differentiating amongst inflammatory and non-inflammatory bowel diseases: systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess*. 2013 Nov;17(55):xv-xix, 1-211;
69. E.F. Stange, S.P.L. Travis, S. Vermeire, W. Reinisch, K. Geboes, A. Barakauskiene, R. Feakins, J.F. Fléjou, H. Herfarth, D.W. Hommes, L. Kupcinskis, P.L. Lakatos, G.J. Mantzaris, S. Schreiber, V. Villanacci, B.F. Warren, for the European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO), European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Definitions and diagnosis, *Journal of Crohn's and Colitis*, Volume 2, Issue 1, March 2008, Pages 1–23;
70. Langner C, Magro F, Driessen A, et al. The histopathological approach to inflammatory bowel disease: A practice guide. *Virchows Arch* 2014;464:511-27;
71. Magro F, Doherty G, Peyrin-Biroulet L, et al. ECCO Position Paper: Harmonization of the Approach to Ulcerative Colitis Histopathology. *J Crohns Colitis* 2020;14:1503-11;
72. Magro F, Langner C, Driessen A, et al. European consensus on the histopathology of inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 2013;7:827-51;
73. Patil DT, Greenson JK, Odze RD. Inflammatory Disorders of the Large Intestine. In: Goldblum R, Odze J. editors. *Surgical Pathology of the GI Tract Liver Biliary Tract and Pancreas*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2014:433-511;

74. Langner C, Magro F, Driessen A, et al. The histopathological approach to inflammatory bowel disease: A practice guide. *Virchows Arch* 2014;464:511-27;
75. Mantarro A, Scalise P, Guidi E, Neri E. Magnetic resonance enterography in Crohn's disease: How we do it and common imaging findings. *World J Radiol.* 2017;9(2):46-54. doi:10.4329/wjr.v9.i2.46;
76. Leyendecker JR, Bloomfeld RS, DiSantis DJ, Waters GS, Mott R, Bechtold RE. MR enterography in the management of patients with Crohn disease. *Radiographics.* 2009;29:1827–1846;
77. Furukawa A, Saotome T, Yamasaki M, Maeda K, Nitta N, Takahashi M, Tsujikawa T, Fujiyama Y, Murata K, Sakamoto T. Cross-sectional imaging in Crohn disease. *Radiographics.* 2004;24:689–702;
78. Collins PD. Video capsule endoscopy in inflammatory bowel disease. *World J Gastrointest Endosc.* 2016;8(14):477-488;
79. Bourreille A, Ignjatovic A, Aabakken L, Loftus EV, Eliakim R, Pennazio M, Bouhnik Y, Seidman E, Keuchel M, Albert JG, et al. Role of small-bowel endoscopy in the management of patients with inflammatory bowel disease: an international OMED-ECCO consensus. *Endoscopy.* 2009;41:618–637;
80. Pennazio M, Spada C, Eliakim R, Keuchel M, May A, Mulder CJ, Rondonotti E, Adler SN, Albert J, Baltés P, et al. Small-bowel capsule endoscopy and device-assisted enteroscopy for diagnosis and treatment of small-bowel disorders: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Clinical Guideline. *Endoscopy.* 2015;47:352–376;
81. Bar-Meir S. Review article: capsule endoscopy - are all small intestinal lesions Crohn's disease? *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;24 Suppl 3:19–21;
82. Liao Z, Gao R, Xu C, Li ZS. Indications and detection, completion, and retention rates of small-bowel capsule endoscopy: a systematic review. *Gastrointest Endosc.* 2010;71:280–286;
83. Lucendo AJ, González-Castillo S, Fernández-Fuente M, De Rezende LC. Tracheal aspiration of a capsule endoscope: a new case report and literature compilation of an increasingly reported complication. *Dig Dis Sci.* 2011;56:2758–2762;
84. Tontini, G.E., Rizzello, F., Cavallaro, F. et al. Usefulness of panoramic 344°-viewing in Crohn's disease capsule endoscopy: a proof of concept pilot study with the novel PillCam™ Crohn's system. *BMC Gastroenterol* 20, 97 (2020);

85. Carnevale Maffè G, Brunetti L, Formagnana P, Corazza GR. Ultrasonographic findings in Crohn's disease. *J Ultrasound*. 2014;18(1):37-49. Published 2014 May 24. doi:10.1007/s40477-014-0096-3;
86. Hanauer SB, Baert F: Medical therapy of inflammatory bowel disease. *Med Clin North Am*, 1994,78,1413-1426;
87. Ng SC, Kamm MA. Therapeutic strategies for the management of ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2008;
88. Seyedian SS, Nokhostin F, Malamir MD. A review of the diagnosis, prevention, and treatment methods of inflammatory bowel disease. *J Med Life*. 2019;12(2):113-122. doi:10.25122/jml-2018-0075;
89. Ford AC, Achkar J-P, Khan KJ, Kane SV, Talley NJ, Marshall JK, et al. Efficacy of 5-aminosalicylates in ulcerative colitis: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2011;106(4):601;
90. Hanauer SB, Stromberg U. Oral Pentasa in the treatment of active Crohn's disease: a meta-analysis of doubleblind, placebo-controlled trials. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2004;2:379–88;
91. Oren Ledder, MD, Dan Turner, MD, Antibiotics in IBD: Still a Role in the Biological Era?, *Inflammatory Bowel Diseases*, Volume 24, Issue 8, August 2018, Pages 1676–1688;
92. Fernando Bermejo, Mariam Aguas, María Chaparro, Eugeni Domènech, Ana Echarri, Esther García-Planella, Iván Guerra, Javier P. Gisbert, Antonio López-Sanromán: Recommendations of the Spanish Working Group on Crohn's Disease and Ulcerative Colitis on the use of thiopurines in inflammatory bowel disease, *Gastroenterología y Hepatología (English Edition)*, Volume 41, Issue 3, 2018, Pages 205-221;
93. Sattler, L., Hanauer, S.B. & Malter, L. Immunomodulatory Agents for Treatment of Patients with Inflammatory Bowel Disease (Review safety of anti-TNF, Anti-Integrin, Anti IL-12/23, JAK Inhibition, Sphingosine 1-Phosphate Receptor Modulator, Azathioprine / 6-MP and Methotrexate). *Curr Gastroenterol Rep* 23, 30 (2021);
94. Lichtenstein GR, Feagan BG, Cohen RD, Salzberg BA, Safdi M, Popp JW Jr, et al. Infliximab for Crohn's Disease: More Than 13 Years of Real-world Experience. *Inflamm Bowel Dis*. 2018;24(3):490–501;
95. Lemaitre M, Kirchgesner J, Rudnichi A, Carrat F, Zureik M, Carbonnel F, et al. Association Between Use of Thiopurines or Tumor Necrosis Factor Antagonists Alone

- or in Combination and Risk of Lymphoma in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *JAMA*. 2017;318(17):1679–86;
96. Colombel JF, Loftus EV Jr, Tremaine WJ, Egan LJ, Harmsen WS, Schleck CD, et al. The safety profile of infliximab in patients with Crohn's disease: the Mayo clinic experience in 500 patients. *Gastroenterology*. 2004;126(1):19–31;
97. Feagan BG, Rutgeerts P, Sands BE, Hanauer S, Colombel JF, Sandborn WJ, et al. Vedolizumab as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med*. 2013;369(8):699–710;
98. Colombel JF, Sands BE, Rutgeerts P, Sandborn W, Danese S, D'Haens G, et al. The safety of vedolizumab for ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut*. 2017;66(5):839–51;
99. Kalb RE, Fiorentino DF, Lebwohl MG, Toole J, Poulin Y, Cohen AD, et al. Risk of Serious Infection With Biologic and Systemic Treatment of Psoriasis: Results From the Psoriasis Longitudinal Assessment and Registry (PSOLAR). *JAMA Dermatol*. 2015;151(9):961–9;
100. Danese S, Grisham M, Hodge J, Telliez JB. JAK inhibition using tofacitinib for inflammatory bowel disease treatment: a hub for multiple inflammatory cytokines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2016;310(3):G155–62;
101. Olivera P, Lasa J, Bonovas S, Danese S, Peyrin-Biroulet L. Safety of Janus Kinase Inhibitors in Patients with Inflammatory Bowel Diseases or Other Immune-mediated Diseases: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology*. 2020;
102. Sandborn WJ, Su C, Sands BE, D'Haens GR, Vermeire S, Schreiber S, et al. Tofacitinib as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. *N Engl J Med*. 2017;376(18):1723–36;
103. Sands BE, Taub PR, Armuzzi A, Friedman GS, Moscariello M, Lawendy N, et al. Tofacitinib Treatment Is Associated With Modest and Reversible Increases in Serum Lipids in Patients With Ulcerative Colitis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2020;18(1):123–32 e3;
104. Communication FDS. FDA approves Boxed Warning about increased risk of blood clots and death with higher dose of arthritis and ulcerative colitis medicine tofacitinib (Xeljanz, Xeljanz XR). In: Administration UFaD, editor. 2019;
105. Mease P, Charles-Schoeman C, Cohen S, Fallon L, Woolcott J, Yun H, et al. Incidence of venous and arterial thromboembolic events reported in the tofacitinib

- rheumatoid arthritis, psoriasis and psoriatic arthritis development programmes and from real-world data. *Ann Rheum Dis.* 2020;79(11):1400–13;
106. Administration UFaD. Drug Alerts and Statements. 2021;
 107. Yang SK. How Does the Epidemiology of Inflammatory Bowel Disease Differ between East and West? A Korean Perspective. *Inflamm Intest Dis.* 2017 Nov;2(2):95-101;
 108. Kobayashi T, Hisamatsu T, Suzuki Y, Ogata H, Andoh A, Araki T, Hokari R, Iijima H, Ikeuchi H, Ishiguro Y, Kato S, Kunisaki R, Matsumoto T, Motoya S, Nagahori M, Nakamura S, Nakase H, Tsujikawa T, Sasaki M, Yokoyama K, Yoshimura N, Watanabe K, Katafuchi M, Watanabe M, Hibi T. Predicting outcomes to optimize disease management in inflammatory bowel disease in Japan: their differences and similarities to Western countries. *Intest Res.* 2018 Apr;16(2):168-177;
 109. Schumann M, Gunzel D, Buergel N, Richter JF, Troeger H, May C, et al. Cell polarity-determining proteins Par-3 and PP-1 are involved in epithelial tight junction defects in coeliac disease. *Gut.* (2012) 61:220– 8. doi: 10.1136/gutjnl-2011-300123;
 110. Schumann M, Siegmund B, Schulzke JD, Fromm M. Celiac disease: role of the epithelial barrier. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* (2017) 3:150– 62. doi: 10.1016/j.jcmgh.2016.12.006;
 111. Lebreton C, Menard S, Abed J, Moura IC, Coppo R, Dugave C, et al. Interactions among secretory immunoglobulin A, CD71, and transglutaminase-2 affect permeability of intestinal epithelial cells to gliadin peptides. *Gastroenterology.* (2012) 143:698–707;
 112. Dalmark M. Plasma radioactivity after rectal instillation of radioiodine-labelled human albumin in normal subjects and in patients with ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol.* (1968);
 113. Casellas F, Aguade S, Soriano B, Accarino A, Molero J, Guarner L. Intestinal permeability to ^{99m}Tc-diethylenetriaminopentaacetic acid in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* (1986) 81:767–70;
 114. Jenkins RT, Ramage JK, Jones DB, Collins SM, Goodacre RL, Hunt RH. Small bowel and colonic permeability to ⁵¹Cr-EDTA in patients with active inflammatory bowel disease. *Clin Invest Med.* (1988) 11:151–5;
 115. Howden CW, Robertson C, Duncan A, Morris AJ, Russell RI. Comparison of different measurements of intestinal permeability in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* (1991) 86:1445–9;

116. Soderholm JD, Streutker C, Yang PC, Paterson C, Singh PK, McKay DM, et al. Increased epithelial uptake of protein antigens in the ileum of Crohn's disease mediated by tumour necrosis factor alpha. *Gut*. (2004) 53:1817;
117. Keita AV, Soderholm JD. Barrier dysfunction and bacterial uptake in the follicle-associated epithelium of ileal Crohn's disease. *Ann N Y Acad Sci*. (2012) 1258:125–34;
118. Pastor Rojo O, Lopez San Roman A, Albeniz Arbizu E, de la Hera Martinez A, Ripoll Sevillano E, Albillos Martinez A. Serum lipopolysaccharide-binding protein in endotoxemic patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. (2007) 13:269–77;
119. Bjarnason I, MacPherson A, Hollander D. Intestinal permeability: an overview. *Gastroenterology*. (1995) 108:1566– 81. doi: 10.1016/0016-5085(95)90708-4;
120. Odenwald MA, Turner JR. Intestinal permeability defects: is it time to treat? *Clin Gastroenterol Hepatol*. (2013) 11:1075– 83. doi: 10.1016/j.cgh.2013.07.001;
121. Odenwald MA, Turner JR. Intestinal permeability defects: is it time to treat? *Clin Gastroenterol Hepatol*. (2013) 11:1075– 83. doi: 10.1016/j.cgh.2013.07.001;
122. Meddings JB, Gibbons I. Discrimination of site-specific alterations in gastrointestinal permeability in the rat. *Gastroenterology*. (1998) 114:83– 92;
123. Smecuol E, Bai JC, Sugai E, Vazquez H, Niveloni S, Pedreira S, et al. Acute gastrointestinal permeability responses to different non-steroidal anti- inflammatory drugs. *Gut*. (2001) 49:650–5;
124. Camilleri M. Leaky gut: mechanisms, measurement and clinical implications in humans. *Gut*. (2019) 68:1516–26;
125. Drewe J, Beglinger C, Fricker G. Effect of ischemia on intestinal permeability of lipopolysaccharides. *Eur J Clin Invest*. (2001) 31:138– 44;
126. Seethaler B, Basrai M, Neyrinck AM, Nazare JA, Walter J, Delzenne NM, et al. Biomarkers for assessment of intestinal permeability in clinical practice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. (2021) 321:G11– G17;
127. Du Plessis J, Vanheel H, Janssen CE, Roos L, Slavik T, Stivaktas PI, et al. Activated intestinal macrophages in patients with cirrhosis release NO and IL-6 that may disrupt intestinal barrier function. *J Hepatol*. (2013) 58:1125–32;
128. Pastor Rojo O, Lopez San Roman A, Albeniz Arbizu E, de la Hera Martinez A, Ripoll Sevillano E, Albillos Martinez A. Serum lipopolysaccharide-binding protein in

- endotoxemic patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* (2007) 13:269–77;
129. Dlugosz A, Nowak P, D’Amato M, Mohammadian Kermani G, Nystrom J, Abdurahman S, et al. Increased serum levels of lipopolysaccharide and anti-flagellin antibodies in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil.* (2015) 27:1747–54;
130. Clemente MG, De Virgiliis S, Kang JS, Macatagney R, Musu MP, Di Pierro MR, et al. Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. *Gut.* (2003) 52:218–23;
131. Vanuytsel T, Tack J and Farre R (2021) The Role of Intestinal Permeability in Gastrointestinal Disorders and Current Methods of Evaluation. *Front. Nutr.* 8:717925;
132. Camilleri M. *Gut* 2019;68:1516–1526;
133. Hollander D, Vadheim CM, Brettholz E, et al. Increased intestinal permeability in Crohn’s patients and their relatives: an etiological factor. *Ann Intern Med* 1986;105:883–5;
134. Odenwald MA, Turner JR. Intestinal permeability defects: is it time to treat? *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013;11:1075–83;
135. D’Inca R, et al. Intestinal permeability test as a predictor of clinical course in Crohn’s disease. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2956–60;
136. Camilleri M, Lasch K, Zhou W. Irritable bowel syndrome: methods, mechanisms, and pathophysiology. The confluence of increased permeability, inflammation, and pain in irritable bowel syndrome. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012;303:G775–G785;
137. Aguas M, Garrigues V, Bastida G, et al. Prevalence of irritable bowel syndrome (IBS) in first-degree relatives of patients with inflammatory bowel disease (IBD). *Crohns Colitis* 2011;5:227–33;
138. Suzuki T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci* (2013) 70(4):631–59;
139. Kong J, Zhang Z, Musch MW, Ning G, Sun J, Hart J, et al. Novel role of the vitamin D receptor in maintaining the integrity of the intestinal mucosal barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2008) 294(1):G208–16;
140. Desai MS, Seekatz AM, Koropatkin NM, Kamada N, Hickey CA, Wolter M, et al. A dietary fiber-deprived gut microbiota degrades the colonic mucus barrier and enhances pathogen susceptibility. *Cell* (2016) 167(5):1339–53 e21;

141. Chen C, Wang P, Su Q, Wang S, Wang F. Myosin light chain kinase mediates intestinal barrier disruption following burn injury. *PLoS One* (2012) 7(4):e34946;
142. Earley ZM, Akhtar S, Green SJ, Naqib A, Khan O, Cannon AR, et al. Burn injury alters the intestinal microbiome and increases gut permeability and bacterial translocation. *PLoS One* (2015) 10(7):e0129996;
143. Kuethe JW, Armocida SM, Midura EF, Rice TC, Hildeman DA, Healy DP, et al. Fecal microbiota transplant restores mucosal integrity in a murine model of burn injury. *Shock* (2016) 45(6):647–52;
144. Chen P, Starkel P, Turner JR, Ho SB, Schnabl B. Dysbiosis-induced intestinal inflammation activates tumor necrosis factor receptor I and mediates alcoholic liver disease in mice. *Hepatology* (2015) 61(3):883–94;
145. Amieva MR, Vogelmann R, Covacci A, Tompkins LS, Nelson WJ, Falkow S. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science* (2003);
146. Fedwick JP, Lapointe TK, Meddings JB, Sherman PM, Buret AG. *Helicobacter pylori* activates myosin light-chain kinase to disrupt claudin-4 and claudin-5 and increase epithelial permeability. *Infect Immun* (2005) 73(12):7844–52;
147. Mu Q, Kirby J, Reilly CM and Luo XM (2017) Leaky Gut As a Danger Signal for Autoimmune Diseases. *Front. Immunol.* 8:598;
148. Gajda, A.M.; Storch, J. Enterocyte fatty acid-binding proteins (FABPs): Different functions of liver and intestinal FABPs in the intestine. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 2015, 93, 9-16
149. Gajda, A.M.; Storch, J. Enterocyte fatty acid-binding proteins (FABPs): Different functions of liver and intestinal FABPs in the intestine. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 2015, 93, 9-16;
150. Gajda, A.M.; Storch, J. Enterocyte fatty acid-binding proteins (FABPs): Different functions of liver and intestinal FABPs in the intestine. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 2015, 93, 9-16;
151. Van de Poll, M.C.G.; Ligthart Melis, G.C.; Boelens, P.G.; Deutz, N.E.P.; vanLeeuwen, P.A.M.; Dejong, C.H.C. Intestinal and hepatic metabolism of glutamine and citrulline in humans. *J. Physiol.* 2007, 581, 819-827;
152. Fragkos, K.C.; Forbes, A. Citrulline as a marker of intestinal function and absorption in clinical settings: A systematic review and meta-analysis. *United Eur. Gastroenterol. J.* 2018, 6, 181-191;

153. Collins, J.K. ; Wu, G.; Perkins-Veazie, P.; Spears, K.; Claypool, P.L.; Baker, R.A.; Clevidence, B.A. Watermelon consumption increases plasma arginine concentrations in adults. *Nutrition* **2007**, *23*, 261–266;
154. Schellekens, G.A.; deJong, B.A.; van den Hoogen, F.H.; van de Putte, L.B.; van Venrooij, W.J. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J. Clin. Investig.* **1998**, *101*, 273–281 ;
155. Mulgrew, A.T.; Taggart, C.C.; McElvaney, N.G. Alpha-1 antitrypsin deficiency:Current concepts. *Lung* 2007; 185, 191–201;
156. Di Ruscio, M.; Vernia, F.; Ciccone, A.; Frieri, G.; Latella, G. Surrogate Fecal Biomarkers in Inflammatory Bowel Disease: Rivals or Complementary Tools of Fecal Calprotectin? *Inflamm. Bowel Dis.* 2017, *24*, 78–92;
157. I. Schoultz, Åsa V. Keita. The Intestinal Barrier and Current Techniques for the Assessment of Gut Permeability. *Cells* 2020, *9*, 1909;
158. Sanderson IR, Boulton P, Menzies I, Walker-Smith JA. Improvement of abnormal lactulose/rhamnose permeability in active Crohn's disease of the small bowel by an elemental diet. *Gut.* (1987) *28*:1073–6;
159. Suenart P, Bulteel V, Lemmens L, Noman M, Geypens B, Van Assche G, et al. Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol.* (2002) *97*:2000– 4;
160. Vojdani, A. For the assessment of intestinal permeability, size matters. *Altern. Ther. Health Med.* 2013, *19*, 12–24;
161. Lee, G.O.; Kosek, P.; Lima, A.A.M.; Singh, R.; Yori, P.P.; Olortegui, M.P.; Lamsam, J.L.; Oliveira, D.B.; Guerrant, R.L.; Kosek, M. Lactulose:Mannitol diagnostic test by HPLC and LC-MSMS platforms: Considerations for field studies of intestinal barrier function and environmental enteropathy. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2014, *59*, 544–550;
162. Tlaskalova-Hogenova H, Stepankova R, Kozakova H, Hudcovic T, Vannucci L, Tuckova L, et al. The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cell Mol Immunol* (2011) *8*(2):110–20;
163. Mu Q, Zhang H, Luo XM. SLE: another autoimmune disorder influenced by microbes and diet? *Front Immunol* (2015) *6*:608;

164. Nockher WA, Wigand R, Schoeppe W, Scherberich JE. Elevated levels of soluble CD14 in serum of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* (1994) 96(1):15–9;
165. Lee TP, Huang JC, Liu CJ, Chen HJ, Chen YH, Tsai YT, et al. Interactions of surface-expressed TLR-4 and endosomal TLR-9 accelerate lupus progression in anti-dsDNA antibody transgenic mice. *Exp Biol Med* (Maywood) (2014) 239(6):715–23;
166. Lamprecht M, Bogner S, Schippinger G, Steinbauer K, Fankhauser F, Hallstroem S, et al. Probiotic supplementation affects markers of intestinal barrier, oxidation, and inflammation in trained men; a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. *J Int Soc Sports Nutr* (2012) 9(1):45;
167. Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, Sharon G, Hyde ER, McCue T, et al. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell* (2013) 155(7):1451–63;
168. Telesford KM, Yan W, Ochoa-Reparaz J, Pant A, Kircher C, Christy MA, et al. A commensal symbiotic factor derived from *Bacteroides fragilis* promotes human CD39(+)Foxp3(+) T cells and Treg function. *Gut Microbes* (2015) 6(4):234–42;
169. Ochoa-Reparaz J, Mielcarz DW, Wang Y, Begum-Haque S, Dasgupta S, Kasper DL, et al. A polysaccharide from the human commensal *Bacteroides fragilis* protects against CNS demyelinating disease. *Mucosal Immunol* (2010) 3(5):487–95;
170. https://www.rndsystems.com/target/fgf-19?category=Proteins%20and%20Enzymes&gclid=EA1aIQobChMI_L_zj9re9wIV2drVCh3D0wnjEAAYASAAEgKJR_D_BwE&gclsrc=aw.ds;
171. Camilleri M, Busciglio I, Acosta A, Shin A, Carlson P, Burton D, et al. Effect of increased bile acid synthesis or fecal excretion in irritable bowel syndrome-diarrhea. *Am J Gastroenterol.* (2014) 109:1621–30;
172. Harvey RF, Bradshaw JM. A simple index of Crohn's-disease activity. *Lancet* 1980; 315 (8167): 514;
173. Human FGF-19 Quantikine ELISA. www.rndsystems.com;
174. Gadaleta, R. M., & Moschetta, A. (2019). Metabolic Messengers: fibroblast growth factor 15/19. *Nature Metabolism*, 1(6), 588-594;
175. Song K.H., Li T., Owsley E., Strom S., Chiang J.Y. Bile acids activate fibroblast growth factor 19 signaling in human hepatocytes to inhibit cholesterol 7 α -hydroxylase gene expression. *Hepatology*. 2009;49(1):297–305;

176. Lefebvre P., Cariou B., Lien F., Kuipers F., Staels B. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev.* 2009;89(1):147–191;
177. Gadaleta R.M., Scialpi N., Peres C., Cariello M., Ko B., Luo J. Suppression of Hepatic Bile Acid Synthesis by a non-tumorigenic FGF19 analogue Protects Mice from Fibrosis and Hepatocarcinogenesis. *Sci Rep.* 2018;8(1):17210;
178. Duboc H., Rajca S., Rainteau D., Benarous D., Maubert M.A., Quervain E. Connecting dysbiosis, bile-acid dysmetabolism and gut inflammation in inflammatory bowel diseases. *Gut.* 2013;62(4):531–539;
179. Lenicek M., Duricova D., Komarek V., Gabrysova B., Lukas M., Smerhovsky Z. Bile acid malabsorption in inflammatory bowel disease: assessment by serum markers. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17(6):1322–1327;
180. Nolan J.D., Johnston I.M., Walters J.R. Altered enterohepatic circulation of bile acids in Crohn's disease and their clinical significance: a new perspective. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013;7(1):49–56;
181. Walters J.R. Bile acid diarrhoea and FGF19: new views on diagnosis, pathogenesis and therapy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2014;11(7):426–434;
182. Gadaleta et al., Fibroblast Growth Factor 19 modulates intestinal microbiota and inflammation in presence of Farnesoid X Receptor. 2020; 2352-3964;
183. Lenicek M., Duricova D., Komarek V., Gabrysova B., Lukas M., Smerhovsky Z. Bile acid malabsorption in inflammatory bowel disease: assessment by serum markers. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17(6):1322–1327;
184. Nolan J.D., Johnston I.M., Walters J.R. Altered enterohepatic circulation of bile acids in Crohn's disease and their clinical significance: a new perspective. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013;7(1):49–56; Walters J.R. Bile acid diarrhoea and FGF19: new views on diagnosis, pathogenesis and therapy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2014;11(7):426–434;
185. Schumann M, Richter JF, Wedell I, Moos V, Zimmermann-Kordmann M, Schneider T, et al. Mechanisms of epithelial translocation of the α 2-gliadin-33mer in coeliac sprue. *Gut.* 2008 Jun;57(6):747–54;
186. Matysiak-Budnik T, Moura IC, Arcos-Fajardo M, Lebreton C, Ménard S, Candalh C, et al. Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease. *J Exp Med.* 2008 Jan 21;205(1):143–54;
187. Lebreton C, Ménard S, Abed J, Moura IC, Coppo R, Dugave C, et al. Interactions Among Secretory Immunoglobulin A, CD71, and Transglutaminase-2

- Affect Permeability of Intestinal Epithelial Cells to Gliadin Peptides. *Gastroenterology*. 2012 Sep;143(3):698–707;
188. Brandtzaeg P. The gut as communicator between environment and host: immunological consequences. *Eur J Pharmacol*. 2011 Sep;668 Suppl 1:S16-32;
 189. Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*. 2012 Jun 8;336(6086):1268-73;
 190. Maynard CL, Elson CO, Hatton RD, Weaver CT. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*. 2012 Sep 13;489(7415):231-41;
 191. Scaldaferri F, Pizzoferrato M, Gerardi V, Lopetuso L, Gasbarrini A. The gut barrier: new acquisitions and therapeutic approaches. *J Clin Gastroenterol*. 2012 Oct;46 Suppl:S12-7;
 192. Vancamelbeke M, Vermeire S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017 Sep;11(9):821-834;
 193. Massey V, Arteel G. Acute alcohol-induced liver injury. *Front. Physiol.*, 12 June 2012;
 194. Pendyala S, Walker JM, Holt PR. A high-fat diet is associated with endotoxemia that originates from the gut. *Gastroenterology*. 2012 May;142(5):1100-1101.e2;
 195. Salim SY, Söderholm JD. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17(1):362–38;
 196. Johansson ME, Gustafsson JK, Holmén-Larsson J, et al. Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. *Gut*. 2014;63(2):281–291;
 197. Lacy BE, Patel NK. Rome Criteria and a Diagnostic Approach to Irritable Bowel Syndrome. *J Clin Med*. 2017 Oct 26;6(11):99;
 198. Lewis JD, Chuai S, Nessel L, Lichtenstein GR, Aberra FN, Ellenberg JH. Use of the noninvasive components of the Mayo score to assess clinical response in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2008; 14 (12): 1660-1666;
 199. Costantini M, Musso M. et al. Detecting psychological distress in cancer patients. validity of the Italian version of the Hospital Anxiety and Depression Scale. *Support Care Cancer* 1999; 7:121-127.
 200. Zigmond AS, Snaith RP. The hospital anxiety and depression scale. *Acta Psychiatr Scand* 1983; 67:361-370.
 201. Talley NJ, Phillips SF, Melton J III, Wiltgen C, Zinsmeister AR. A patient questionnaire to identify bowel disease. *Ann Intern Med* 1989;111:671–674.

202. Barbara G, Stanghellini V, De Giorgio R. et al. Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2004;126:693-702;
203. Spiegel B, Bolus R, Harris LA, Lucak S, Naliboff B, Esrailian E, Chey WD, Lembo A, Karsan H, Tillisch K, Talley J, Mayer E, Chang L. Measuring irritable bowel syndrome patient-reported outcomes with an abdominal pain numeric rating scale. *Pharmacol Ther.* 2009 Dec 1;30(11-12):1159-70;
204. Lins L, Carvalho FM. SF-36 total score as a single measure of health-related quality of life: Scoping review. *SAGE open medicine.* 2016;4:2050312116671725;
205. Brazier JE, Harper R, Jones NM, O'cathain A, Thomas KJ, Usherwood T, Westlake L. Validating the SF-36 health survey questionnaire: new outcome measure for primary care. *British medical journal.* 1992 Jul 18;305(6846):160-4;
206. Brazier E, Harper R, Jones NMB, Cathain AO, Thomas KJ, Usherwood T, et al. GENERAL PRACTICE Validating the SF-36 health survey questionnaire : new outcome. 1992;305(July):160-4;
207. Portincasa P, Bonfrate L, Khalil M, Angelis M, Calabrese FM, D'Amato M, Wang DQ, Di Ciaula A. Intestinal Barrier and Permeability in Health, Obesity and NAFLD. *Biomedicines.* 2021 Dec 31;10(1):83;
208. Stevens BR, Goel R, Seungbum K, Richards EM, Holbert RC, Pepine CJ, Raizada MK. Increased human intestinal barrier permeability plasma biomarkers zonulin and FABP2 correlated with plasma LPS and altered gut microbiome in anxiety or depression. *Gut.* 2018 Aug;67(8):1555-1557;
209. Moussavi S, Chatterji S, Verdes E, Tandon A, Patel V, Ustun B. Depression, chronic diseases, and decrements in health: results from the World Health Surveys. *Lancet.* 2007 Sep 8;370(9590):851-8;