



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di Ricerca in Medicina Cardiovascolare e Biotecnologie Chirurgiche e Urologiche

Dipartimento di Discipline Chirurgiche, Oncologiche e Stomatologiche

Indirizzo: Biotecnologie Chirurgiche, Medicina Metabolico-Nutrizionale e Rigenerativa nell'Insufficienza d'Organo e dei Tessuti

Referente: Prof. Attilio Ignazio Lo Monte

Settore Scientifico Disciplinare MED/18

IMPLICAZIONI NEUROENDOCRINE, IMMUNOFENOTIPICHE E CELLULARI DELLE COLITI MICROSCOPICHE

IL DOTTORE

Dott. Emanuele Sinagra

IL COORDINATORE

Prof. Attilio Ignazio Lo Monte

IL TUTOR

Prof. Giuseppe Buscemi

CICLO XXVI

ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2016

INDICE

pag. 2

1. INTRODUZIONE	pag. 6
1.1 Epidemiologia	pag. 6
1.2 Patogenesi	pag. 7
1.2.1 Fattori genetici	pag. 8
1.2.2 Fattori luminali	pag. 10
1.2.3 Fattori immunologici	pag. 13
1.2.4 Alterazioni del sistema neuroendocrino	pag. 15
1.2.5 Disfunzione della barriera epiteliale intestinale	pag. 16
1.2.6 Ipotesi diagnostica della patogenesi delle coliti microscopiche	pag. 16
1.2.7 Le cellule interstiziali di Cajal e le cellule “ICC-like”	pag. 18
1.2.8 Il ruolo dei mastociti nelle diarree croniche	pag. 19
1.2.9 Il ruolo dell’ileite microscopica nel contesto della colite microscopica	pag. 20
2. SCOPO DELLO STUDIO	pag. 21
3. MATERIALI E METODI	pag. 22
3.1 Pazienti e controlli	pag. 22
3.2 Ileo-colonscopia con biopsie	pag. 23
3.3 Istopatologia e immunoistochimica	pag. 24
3.4 Analisi ottica computerizzata	pag. 26
3.5 Analisi statistica	pag. 27
4. RISULTATI	pag. 28

4.1 Incidenza delle coliti microscopiche	pag. 28
4.2 Endoscopia, istopatologia ed immunoistochimica, ed associazione fra ileite e colite microscopica	pag. 28
4.3 Analisi ottica computerizzata	pag. 29
4.3.1 Caratterizzazione immunofenotipica dell'infiltrato linfocitario dell'ileo – cellule CD3+	pag.29
4.3.2 Caratterizzazione immunofenotipica dell'infiltrato linfocitario dell'ileo – cellule CD8+	pag.32
4.3.3 Caratterizzazione immunofenotipica dell'infiltrato linfocitario del colon destro – cellule CD3+	pag.35
4.3.4 Caratterizzazione immunofenotipica dell'infiltrato linfocitario del colon destro – cellule CD8+	pag.38
4.3.5 Densità cellulare della cromogranina ileale	pag. 41
4.3.6 Densità cellulare della cromogranina del colon destro	pag. 44
4.3.7 Densità cellulare della serotonina ileale	pag. 47
4.3.8 Densità cellulare della serotonina del colon destro	pag. 50
4.3.9 Densità cellulare della calretinina ileale	pag. 53
4.3.10 Densità cellulare della calretinina del colon destro	pag. 56
4.3.11 Densità cellulare della proteina S100 ileale	pag. 58
4.3.12 Densità cellulare della proteina S100 del colon destro	pag. 61
4.3.13 Densità cellulare del CD117 ileale	pag. 64
4.3.14 Densità cellulare del CD117 del colon destro	pag. 67

5. DISCUSSIONE	pag. 70
5.1 Associazione fra colite microscopica ed ileite microscopica	pag. 70
5.2 Caratterizzazione immunofenotipica dell'infiltrato linfocitario	pag. 71
5.3 Valutazione della densità dei markers di attivazione neuroendocrina nell'ileite microscopica associata alla colite collagenosica e nella colite collagenosica	pag. 73
5.4 Valutazione della densità dei markers delle cellule interstiziali di Cajal e delle cellule ICC-like nell'ileite microscopica associata alla colite collagenosica e nella colite collagenosica	pag. 75
5.5 Valutazione della densità dei mastociti	pag. 76
6. CONCLUSIONI	pag. 77
BIBLIOGRAFIA	pag. 79
RINGRAZIAMENTI	pag. 93

Implicazioni neuroendocrine, immunofenotipiche e cellulari delle coliti microscopiche

1. INTRODUZIONE

1.1 Epidemiologia

Le coliti microscopiche (CM) sono un gruppo di malattie infiammatorie croniche del colon caratterizzate da eziologia sconosciuta. Le CM possono essere classificate in funzione delle loro caratteristiche istopatologiche in due entità distinte: la colite linfocitica (CL), caratterizzata da un tipico infiltrato linfocitario T (positivo al marcatore di superficie CD3); la colite collagenica (CC), nella quale ad un infiltrato linfocitario T si associa la deposizione di fibre collageniche [1]. Benchè siano ignote le basi eziopatogenetiche di tali disturbi, pazienti affetti da CM presentano spesso una storia clinica caratterizzata da patologie di tipo autoimmune (artrite reumatoide, diabete mellito tipo 1, sindrome di Sjogren) o dall'assunzione di particolari farmaci (inibitori di pompa protonica, farmaci antidepressivi, beta bloccanti) [2,3]. A causa della loro presentazione clinica (diarrea, dolori addominali) riscontrabile in diverse patologie infiammatorie intestinali quali il morbo di Crohn o la rettocolite ulcerosa, la coliti linfocitiche sono spesso mis-diagnosticate e la loro incidenza spesso sottostimata [4].

Diversi studi epidemiologici dimostrano che le CM vengono diagnosticate in circa il 10% dei pazienti che vanno incontro ad indagini diagnostiche per l'insorgenza di

diarrea acquosa e non sanguinolenta, a decorso cronico o intermittente, ed in più del 20% dei pazienti di età superiore a 70 anni di età, con maggiore incidenza nelle donne anziane e fumatori [5]. I dati provenienti da recenti studi epidemiologici hanno riportato la diagnosi di CM in diverse regioni del mondo, rendendole delle entità nosografiche ubiquitarie. Al giorno d'oggi, in un periodo di incremento dell'incidenza delle CM, dati provenienti da recenti studi epidemiologici, dimostrano dei tassi di incidenza che variano da 1/100.000 a 10,8/100.000 abitanti per la CC, e da 2,1/100.000 a 18,9/100.000 abitanti per la CL [5].

1.2 Patogenesi delle CM

E' universalmente riconosciuto che le CM siano secondarie ad una reazione immunitaria anomala in individui predisposti. Le infezioni gastrointestinali, alcuni farmaci e/o fenomeni autoimmunitari probabilmente contribuiscono ad innescare tale reazione. E' stata inoltre riportata una disfunzione del sistema neuroendocrino del colon, che sembra giocare un ruolo chiave nella fisiopatologia delle CM [6].

1.2.1 Fattori genetici

Che la predisposizione genetica sia di importanza nelle CM non è del tutto chiaro. Diversi aspetti negli studi scientifici pubblicati indicano che la predisposizione genetica potrebbe svolgere un ruolo nell'eziologia delle CM [7]. Uno studio svedese ha dimostrato una aggregazione familiare di casi di CM, analizzando cinque famiglie in cui era presente la CM, con una aggregazione sorella-sorella, indipendentemente dall'abitudine tabagica [8]. Sono state inoltre descritte aggregazioni fra madre e figlia e padre e figlio [9,10].

Recentemente, un caso familiare di CC in una paziente di età inferiore a 14 anni, è stato riportato in una aggregazione madre-figlia [11]. Sfortunatamente, fino ad ora, non è stata riportata nelle CM una concordanza tra gemelli, il che significa che non solo la predisposizione genetica, ma anche i fattori ambientali, dovrebbero essere considerati al fine di spiegare l'aggregazione familiare delle CM [7].

Inoltre, degli studi condotti su una ridotta dimensione campionaria hanno trovato un'associazione tra le coliti microscopiche con diversi aplotipi del complesso maggiore di istocompatibilità (HLA). Una crescente prevalenza dell'aplotipo HLA-A1 e una riduzione dell'aplotipo HLA-A3 è stata riscontrata nella CL, ma non nella CC [12]. Alcuni studi hanno inoltre riportato l'associazione fra le CM e gli aplotipi HLA-DQ, predisponenti alla malattia celiaca (MC), con un livello di prevalenza dell'aplotipo HLA-DQ2 fino al 64% dei pazienti con CM (tra i quali solo il 4% aveva una concomitante MC), rispetto al solo 31% nei pazienti appartenenti al gruppo di

controllo [13]. E' stata inoltre riscontrata l'associazione dell'aplotipo HLA-DQ2 con la CL, in assenza di associazione con la MC [14].

Infine, diversi polimorfismi genetici sono stati studiati nei pazienti con CM: la frequenza di portatori per l'allele GG del polimorfismo di un singolo nucleotide (SNP) delle metalloproteinasi della matrice è stata riscontrata significativamente più elevata nei pazienti con CC rispetto ai donatori sani, con un odds ratio per un aumento del rischio di CC pari a 1.5 (intervallo di confidenza al 95% [IC], 1- 3.5) [15]. Sfortunatamente, le frequenze degli alleli contenuti nei SNP 8, 12 e 13 del gene NOD2/CARD15 non sono risultate differenti tra i pazienti con CC e donatori sani [16]. Anche il polimorfismo del gene IL-6 è stato riscontrato essere in relazione con le CM, dal momento che i genotipi IL-6 GG e G sono risultati più frequenti nei pazienti con CC rispetto ai controlli, essendo l'odds ratio di 1,5 (IC 95% 1.041-2.203) e 1,9 (IC 95% 1.078-3.495), rispettivamente; nello stesso studio non è stata riscontrata un'associazione con altri polimorfismi delle citochine IL-1b, IL-1Ra, IL-10 e CD14 [17]. I genotipi GG e G del gene IL-6 sono associati ad un aumentata produzione dell'IL-6 che potrebbe contribuire alla sviluppo di risposte pro-infiammatorie nella mucosa intestinale. Infine, è stata inoltre riscontrata un'associazione delle CM con l'aplotipo HLA DQ2 DR3 e con l'allele TNF2 [18]. Sono necessari ulteriori studi per consolidare la conoscenza del ruolo dei fattori genetici nell'origine delle CM.

1.2.2 Fattori luminali

Il ruolo delle infezioni gastrointestinali nell'eziologia della CL è stata supportata da un case-report riguardante un paziente di 19 anni che ha sviluppato una CL in seguito ad un'infezione da *Campylobacter* [19], nonché dal significativo andamento stagionale dell'incidenza della CL [20]. Sono state inoltre riscontrate associazioni con *Clostridium difficile*, *Yersinia enterocolitica* e *Campylobacter jejuni* anche nella CC [21-23]. La risposta infiammatoria iniziale a seguito di infezione gastrointestinale ha dimostrato un incremento dei linfociti CD3+, dei linfociti intraepiteliali CD8 + e dei macrofagi calprotectina-positivi [24]. Solitamente tali incrementi ritornano rapidamente entro i limiti della norma nella maggior parte dei soggetti; tuttavia, un piccolo numero di pazienti con persistenza dei sintomi non presenta tale rientro nella normalità [24]. Tale processo può iniziare indipendentemente dal tipo di agenti infettivi (cioè virus, batteri o protozoi). Il fatto che soltanto una percentuale di pazienti che riporta un episodio di gastroenterite sviluppi la CM può essere spiegato dalla concomitante azione dei fattori genetici quali, ad esempio, le sopracitate varianti della metalloproteinasi-9 (MMP-9) osservate nella CC [25].

La presenza di un ruolo importante delle infezioni gastrointestinali nella patogenesi delle CM è stato sostenuto dalla somiglianza tra CL e sindrome dell'intestino irritabile post-infettiva (PI-IBS). Tali condizioni hanno una presentazione clinica simile ed entrambi possono regredire spontaneamente [24,26]. Sia la CL che la PI-

IBS mostrano un infiltrato intra-epiteliale e sottomucoso di linfociti e mastociti, e mostrano un'alta densità intracellulare, a livello del colon, di serotonina e peptide YY (PYY) [27-31]. Tali somiglianze hanno condotto alcuni autori a suggerire che la CL e la PI-IBS rappresentino una singola patologia [29].

Per quanto riguarda il ruolo degli acidi biliari, è ampiamente noto che l'infusione nel colon di acidi biliari possa determinare l'insorgenza di colite in modelli animali, nonché nei pazienti con resezione ileale, con conseguente malassorbimento degli acidi biliari (MAB), determinando l'insorgenza della diarrea [32]. Alcune piccoli studi retrospettivi hanno riscontrato un MAB fin nel 60% dei pazienti con CL e fin nel 44% dei pazienti con CC [33,34]. Ciò suggerisce che, almeno in alcuni pazienti, il MAB potrebbe avere un ruolo chiave nello sviluppo della malattia. Tuttavia, le evidenze sul ruolo degli acidi biliari nella patogenesi della CM risultano ancora contrastanti. Infatti, piccoli studi condotti mediante test del respiro con acidi biliari dimostravano una scarsa o addirittura nessuna evidenza di MAB nei pazienti con CM [35-37] e inoltre non è stata mai riscontrata un'associazione tra colecistectomia e CM [38].

Tuttavia, alcuni studi riguardanti la ritenzione di seleno-omocolilaurina hanno dimostrato un elevato grado di MAB [32,39] e inoltre, l'utilizzo di resine chetanti gli acidi biliari, quali colestiramina, è risultato efficace in pazienti con CC. Infine, un recente studio ha dimostrato che una bassa concentrazione di acidi biliari diidrossilati può aggravare la disfunzione della barriera mucosa nei pazienti con CC,

determinando un incremento dell'assorbimento di batteri non patogeni [40]. Se il MAB sia un fattore causale o non, nella patogenesi delle CM, rimane ancora non del tutto chiaro [41] e sulla base delle recenti evidenze, MAB e CM risultano probabilmente associati ma fra loro indipendenti.

Infine, esiste una forte associazione tra alcuni farmaci e le CM [42-44]. Ci sono diversi casi segnalati riguardanti il fatto che sia i sintomi che le variazioni istopatologiche coliche scompaiano al termine di determinati trattamenti farmacologici, e insorgano nuovamente alla reintroduzione del trattamento farmacologico [42-44]. I farmaci coinvolti comprendono i farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS), i beta-bloccanti, i bloccanti del recettore H₂, gli inibitori della pompa protonica, le statine, così come molti altri (tra cui acarbose, ticlopidina, flavonoidi, sertralina, clozapina, entacapone, etc.). I FANS sono noti agenti causali di infiammazione del piccolo e del grosso intestino, nonché di recidiva di malattia infiammatoria cronica intestinale [44-46]. I pazienti affetti da CM presentano spesso artralgie, per cui l'associazione con i FANS può essere in tal modo confusa [47]. Inoltre risulta interessante notare che l'età in cui ricade il picco dell'incidenza della CM (60 anni) corrisponde al range d'età in cui è comune l'inizio del trattamento con beta-bloccanti, statine e aspirina a basso dosaggio per le malattie cardiovascolari.

1.2.3 Fattori immunologici

Diversi studi hanno dimostrato una associazione tra CM e malattie autoimmuni, come la MC, il diabete mellito, l'artrite e malattie della tiroide [48,49]. Inoltre, i pazienti con LC presentano spesso positività al test degli anticorpi antinucleo (ANA) [48].

Per quanto riguarda i meccanismi di alterata risposta immunitaria coinvolti della patogenesi delle CM, diversi fattori determinanti l'infiammazione della mucosa intestinale infiammazione sono stati studiati nelle CM, postulando che un'alterata risposta immunitaria adattativa mediata da cellule T aberranti porti a una patologia infiammatoria cronica intestinale [49]. Il numero dei linfociti T CD3+ nella lamina propria e nel compartimento intraepiteliale è incrementato inella CL e nella CC [50], così da essere definito come un segno distintivo per queste malattie. Sulla base delle colorazioni immunoistochimiche e delle analisi citofluorimetriche, la maggior parte dei linfociti T sono CD4 + nella lamina propria e CD8 + nel compartimento intraepiteliale, esprimendo la forma alfa / beta del recettore T-linfocitario [51], con un profilo citochimica misto Th17 / Tc17 e Th1 / Tc1 [52]. Il marcato infiltrato CD8 + dovuto ai linfociti T citotossici (CTL) nella mucosa colica di pazienti con colite microscopica è stato recentemente dimostrato essere dovuto ad un incremento dell'espansione di cellule T residenti: ciò suggerisce che l'antigene attivante il processo infiammatoria sia localizzato nella mucosa colica [53]. Infatti, altri studi hanno inoltre dimostrato un incremento delle cellule T della memoria CD8 + (Ki67 + e CD45RO +) nel compartimento intraepiteliale e nella lamina propria, essendo più

pronunciata nella CC rispetto alla CL e nella malattia attiva, e rispetto alla malattia in remissione istologica. Diversi fattori aggiuntivi vengono inoltre studiati come cause responsabili della formazione della banda subepiteliale di collagene. Tra gli altri, un aumento numerico dei miofibroblasti attivati subepiteliali [54,55] e del fattore di crescita vascolare endoteliale, che favoriscono l'accumulo di matrice sottoepiteliale [56]. Queste osservazioni supportano la teoria che LC e CC potrebbero essere considerati come differenze fasi patologiche della stessa entità, con un aumento del numero dei CTL nelle primissime fasi (CL) e incremento della matrice subepiteliale di collagene e consensuale incremento dei linfociti CD25 + FOXP3 + Treg (che sono delle cellule regolanti i CTL e inibenti il loro danno tissutale mediante la produzione di IL-2) nella fase successiva (CC) [57]. Oltre all'infiltrato linfocitario, può essere inoltre osservato un incremento del numero di eosinofili nella mucosa colica dei pazienti con CC [58-60], con relativo incremento dei livelli di proteina cationica eosinofila [60] e degranolazione delle principali proteine basiche [59], suggerendo quindi il coinvolgimento del sistema immunitario innato nella patogenesi delle CM.

1.2.4 Alterazioni del sistema neuroendocrino

I livelli colici di ossido nitrico (NO) sono notevolmente incrementate nei pazienti con CL, che è dovuto ad un incremento dei livelli di NO sintetasi nell'epitelio del colon [61-63]. Inoltre, la serotonina colica, e la densità cellulare del peptide YY (PYY)

sono risultati estremamente elevati nei pazienti con CL [64]. Il NO determina un incremento della motilità intestinale e stimola la secrezione intestinale di acqua ed elettroliti [65,66]. La serotonina attiva le terminazioni sensoriali sottomucose del sistema nervoso enterico, e controlla la motilità gastrointestinale e la secrezione di cloruro attraverso inter-neuroni e neuroni motori [67,68]. Il PYY stimola l'assorbimento di acqua ed elettroliti, ed è un importante regolatore dell' "ileal brake" [69]. Inoltre, il PYY inibisce la prostaglandina E2 e peptide intestinale vasoattivo (VIP), che stimolano la secrezione intestinale di fluidi [70-72]. La somministrazione di PYY ha dimostrato di inibire la diarrea in modelli sperimentali murini riducendo la secrezione intestinale di fluidi e ritardando il transito intestinale [73].

1.2.5 Disfunzione della barriera epiteliale intestinale

L'epitelio intestinale è una barriera selettiva e regolata che permette il riassorbimento di ioni, acqua e sostanze nutritive, ma limita il passaggio delle molecole dannose, batteri, virus ed altri agenti patogeni [74]. Secondo alcuni studi, la barriera epiteliale del colon funzione è ridotta nei pazienti con CM, mentre l'integrità della mucosa del piccolo intestino rimane intatta [75]. In particolare, la permeabilità paracellulare è incrementata in pazienti con CC, a causa di una ridotta espressione di occludina e claudina-4, che sono importanti proteine delle tight junction, con una conseguente

riduzione della resistenza epiteliale [76]. Uno studio in vitro effettuato su biopsie del colon provenienti da pazienti con CC che erano in remissione clinica, ha evidenziato una disfunzione significativa nella integrità della barriera mucosa associato ad un aumentato assorbimento transmucosale di batteri non patogeni. Tale integrità è alterata in caso di malattia attiva e persiste nonostante l'efficacia clinica del trattamento con budesonide [77].

1.2.6 Ipotesi diagnostica della patogenesi delle coliti microscopiche

Il modello patogenetico maggiormente studiato riguarda le CL. La secrezione di serotonina da parte delle cellule enterocromaffini può essere incrementata o attenuata dai prodotti di secrezione di cellule immunitarie, come le cellule T CD4 + [78]. Inoltre, la serotonina modula la risposta immunitaria [78]. Le cellule enterocromaffini sono in contatto o situate molto vicino ai linfociti CD3 + e CD20 +, e inoltre diversi recettori serotoninergici sono stati caratterizzati nei linfociti, monociti, macrofagi e nelle cellule dendritiche [79-83]. È pertanto possibile che l'aumento della densità delle cellule della serotonina nel colon dei pazienti con colite linfocitaria risulti dell'interazione tra linfociti e cellule enterocromaffini. La serotonina infatti stimola la secrezione di ossido nitrico (NO), che è in parte responsabile per i suoi effetti sulla motilità intestinale. È ragionevole supporre che l'aumento dei livelli di NO colon è causata dall'aumento dei livelli di serotonina osservati nei pazienti con CL. L'aumento della serotonina e dei livelli di NO nel colon dei pazienti con CL

determina un incremento della motilità intestinale e della secrezione di acqua ed elettroliti, determinando una diarrea di carattere secretorio [84]. L'incrementata motilità intestinale e l'incrementata secrezione possono essere la causa del secondario incremento compensatorio dei livelli di PYY nel colon dei pazienti con CL. Questo meccanismo compensatorio può spiegare il verificarsi di diarrea intermittente in alcuni pazienti con LC, come un incremento dei livelli di PYY può compensare l'incremento della secrezione e della motilità solo per brevi periodi di tempo.

1.2.7 Le cellule interstiziali di Cajal e le cellule “ICC-like”

Le cellule interstiziali di Cajal (ICC) sono attori importanti nella organizzazione della motilità intestinale. Tali cellule presentano un ruolo fisiologico fondamentale nell'orchestrare la normale attività peristaltica del tubo digerente: sono le cellule pacemaker dei muscoli del tubo digerente. L'assenza, la riduzione del numero o l'alterata integrità del network delle ICC può avere un effetto drammatico sul sistema gastrointestinale [85].

Negli ultimi anni, particolare interesse è stata focalizzata su cellule ICC-like (ICC-LC), situate al di fuori del contesto della muscolatura del tratto gastrointestinale [86].

Tali osservazioni hanno spinto a cercare il razionale per spiegare, mediante analisi immunoistochimiche e ultrastrutturali (con l'ausilio della microscopia elettronica) contatti simil-sinaptici tra ICC/ICC-LC e immunociti situati nel compartimento interstiziale non epiteliale. Il concetto di tale sinapsi 'immunologica' tra i linfociti T e cellule presentanti l'antigene è già stato oggetto di un'intensa attività di ricerca nel corso degli ultimi 10 anni [86].

Le ICC-LC potrebbero rappresentare delle cellule progenitrici stromali, coinvolte nella segnalazione juxtacrina/paracrina in grado di svolgere un ruolo nella sorveglianza immunitaria.

Alcuni studi hanno mostrato delle alterazioni delle ICC nelle malattie infiammatorie croniche intestinali, quali la malattia di Crohn (MC) e la colite ulcerosa (CU), tuttavia nel contesto clinico delle CM non è stato mai chiarito il possibile ruolo eziopatogenetico delle ICC, e ancor meno delle ICC-LC. Le principali colorazioni immunoistochimiche per l'identificazione di tali cellule sono quelle per la calretinina, la proteina S100 e il c-Kit [87].

1.2.8 Il ruolo dei mastociti nelle diarree croniche

I mastociti si trovano nella periferia della maggior parte degli organi, in particolare nelle "zone-barriera" del corpo, quali la cute e la mucosa gastrointestinale [47]. I mastociti sono coinvolti in un ampio spettro di funzioni, tra cui la regolazione dell'omeostasi tissutale, della secrezione e della permeabilità epiteliale, funzioni

neuronal quali la peristalsi e il dolore, il mantenimento della difesa immunitaria e dell'infiammazione nella normalità e in condizioni patologiche, quali allergie alimentari, infezioni e malattie infiammatorie croniche intestinali [47].

Il caso più estremo di infiltrazione mastocitaria, nell'ambito della patologia umana, è la mastocitosi sistemica, che è una malattia rara di anormale crescita cellulare dei mastociti nei diversi organi e apparati [47].

I mastociti sono presenti in tutti gli strati del tratto GI, e la loro localizzazione, in prossimità di nervi e aree perivascolari, lascia supporre che i mastociti siano una cellula effettrice importante dell'asse cervello-intestino nella mucosa intestinale [47].

Il termine di colite "mastocitaria" è stato descritto clinicamente in due studi [88,89], in un sottogruppo di pazienti con diarrea cronica, dove l'incremento quantitativo dei mastociti è stato dimostrato come l'anomalia morfologica primaria. Tale incremento è stato dimostrato mediante le colorazioni per triptasi o per il CD117.

1.2.9 Il ruolo dell'ileite microscopica nel contesto delle CM

Nel 2012, Marco Diaz Santesteban ha pubblicato uno studio caso-controllo riguardante l'associazione fra ileite e colite microscopica, ipotizzando il ruolo aggiuntivo dell'infiammazione microscopica ideale come ulteriore causa di diarrea cronica [90].

Le caratteristiche istologiche dell'ileite microscopica risultavano essere il riscontro di oltre 25 linfociti intraepiteliali (LIE) / 100 enterociti o di una quantità inferiore a 25

LIE / 100 enterociti con associato danno epiteliale e l'aumento qualitativo dell'infiltrato mononucleare nella lamina propria [90]. Tuttavia, in tale studio non venivano approfondite qualitativamente le caratteristiche immunofenotipiche di tale infiltrato linfocitario, né veniva posta una dettagliata differenziazione delle caratteristiche dell'ileite tra la CL e la CC, né venivano espresse le motivazioni che potevano spiegare, col supporto delle colorazioni immunosistochimiche, la coerenza con le alterazioni infiammatorie microscopiche riscontrate nel colon. L'autore concludeva il proprio studio ipotizzando che l'ileite microscopica esprimerebbe una iperattività simpatica che, promuovendo l'alterazione della funzione epiteliale, andrebbe a causare una diarrea cronica da malassorbimento [90].

3. Scopo dello studio

L'obiettivo primario dello studio riguarda l'individuazione dell'incidenza delle coliti microscopiche (nuove diagnosi) nei pazienti con diarrea cronica non ematica che afferiscono al Servizio di Endoscopia della Fondazione Istituto G. Giglio di Cefalù.

Gli obiettivi secondari dello studio vertono principalmente sull'analisi delle CC, i cui modelli patogenetici risultano meno studiati, nell'ambito della letteratura scientifica internazionale, rispetto alle CL, e consistono in particolare:

- 1. nella valutazione dell'incidenza dell'associazione fra ileite microscopica (valutata mediante colorazione con ematossilina-eosina) e colite microscopica (sia CL che CC);

- 2. nella caratterizzazione immunofenotipica dell'infiltrato linfocitario (mediante valutazione immunoistochimica del CD3/CD8) nell'ileite microscopica associata alla CC e nella CC;
- 3. nella valutazione della densità della cromogranina A e della serotonina (markers di attivazione neuroendocrina) nell'ileite microscopica associata alla CC e nella CC;
- 4. nella valutazione della densità dell'S100 e della calretinina (markers di attivazione delle ICC e delle ICC-LC) nell'ileite microscopica associata alla CC e nella CC;
- 5. nella valutazione della densità del CD117 (marker di attivazione mastocitaria) nell'ileite microscopica associata alla CC e nella CC.

4. Materiali e Metodi

4.1 Pazienti e controlli

Venti pazienti consecutivi con diagnosi di CM (6 CC, 14 CL) posta nel periodo intercorrente fra il gennaio 2013 ed il gennaio 2015 presso la Fondazione Istituto G. Giglio di Cefalù, sono stati inclusi nello studio come casi. Tali pazienti includono 10 uomini e 10 donne, con un'età media di 56 anni (range 25-77).

Venti pazienti consecutivi con diagnosi di sindrome dell'intestino irritabile (IBS), posta nel periodo intercorrente fra il gennaio 2013 ed il gennaio 2015, secondo i

criteri di Roma III [91], presso la Fondazione Istituto G. Giglio di Cefalù, sottoposti a colonscopia con mappatura ileocolica per escludere un “overlap” fra IBS e CM, sono stati inclusi nello studio come controlli. Tali pazienti includono 12 uomini e 8 donne, con un’età media di 37 anni (range 18-69).

I pazienti inclusi in tale studio monocentrico, caso-controllo, retrospettivo su dati raccolti prospettivamente, hanno posto il proprio consenso orale e scritto per il trattamento dei dati.

Le caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti inclusi nello studio sono raffigurate nelle tabelle 1 (casi) e 2 (controlli).

4.2 Ileo-Colonscopia con biopsie

I pazienti eligibili per lo studio sono stati preparati per la colonscopia con 4 litri di una soluzione di PEG. Nel corso della colonscopia sono state riportate tutte le eventuali alterazioni macroscopiche della mucosa coloretale: edema, iperemia, soffiusioni emorragiche, afte, erosioni, diverticoli. Sono state inoltre eseguite biopsie multiple orientate su filtri di acetato di cellulosa (Bio Optica): 2 nell’ileo terminale; 2 nel cieco, 2 nel colon ascendente, 2 nel trasverso prossimale; tali biopsie sono state analizzate complessivamente come derivanti dal colon destro. Inoltre sono state eseguite le seguenti biopsie: 2 nel trasverso distale, 2 nel colon discendente, 2 nel sigma; tali biopsie sono state analizzate complessivamente come derivanti dal colon

sinistro. Tali biopsie sono state esaminate da un patologo esperto di patologie infiammatorie intestinali del centro.

Per le analisi immunoistochimiche, sono state prese come riferimento le biopsie del colon destro.

4.3 Istopatologia ed immunoistochimica

La diagnosi di CL e di CC è stata posta sulla base di ben definiti e largamente accettati criteri istopatologici [92-95].

Le caratteristiche istologiche della CL risultano essere le seguenti:

- Normale architettura ghiandolare
- Aumento dei linfociti intraepiteliali nell'epitelio di rivestimento superficiale: > 15-20 / 100 cellule epiteliali (v.n. <5%) eventualmente valutati con colorazione immunoistochimica con anticorpo CD3 monoclonale.
- Infiltrato infiammatorio misto della lamina propria, con predominanza di linfociti e plasmacellule su granulociti eosinofili e neutrofilii

Le caratteristiche istologiche della CC risultano essere le seguenti:

- Marcato ispessimento della banda di collagene sottoepiteliale: >10 millimicron (normale : 0-3 μm , raramente >6) visualizzabile in Ematossilina & Eosina e con colorazione Tricromica di Masson.

- Incremento della componente infiammatoria nella lamina propria comprendente linfociti, plasmacellule, eosinofili e neutrofil.

Le caratteristiche istologiche dell'ileite microscopica risultano essere il riscontro di oltre 25 linfociti intraepiteliali (LIE) / 100 enterociti o di una quantità inferiore a 25 LIE / 100 enterociti con danno epiteliale e l'aumento qualitativo dell'infiltrato monoculare nella lamina propria [90].

Le biopsie sono state fissate in paraformaldeide tamponata al 4% durante la notte, incluse in paraffina e tagliate in sezioni spesse 5 micron. Le sezioni sono state colorate mediante colorazione con ematossilina eosina (H & E) e analisi immunoistochimica con il metodo avidina-biotina-complex (ABC) utilizzando il Vectastain ABC-kit (Vector Laboratories), utilizzando i seguenti anticorpi monoclonali:

1. Per la determinazione del CD3 è stato utilizzato l'anticorpo monoclonale diretto contro i linfociti CD3-positivi (Leica Biosystems, Newcastle, UK; NCL-L-CD2-565), utilizzato con diluizioni di 1:300;
2. Per la determinazione del CD8 è stato utilizzato l'anticorpo monoclonale diretto contro i linfociti CD8-positivi (Dako, CD57, clone 2B01), utilizzato con diluizioni di 1:200;

3. Per la determinazione della cromogranina A è stato utilizzato il DakoCytomation, cod. M869, utilizzato con diluizioni di 1:1.500;
4. Per la determinazione della serotonina è stato utilizzato l'anticorpo monoclonale murino diretto contro la serotonina (Dako, cod. M869), utilizzato con diluizioni di 1.1500;
5. Per la determinazione della calretinina è stato utilizzato l'anticorpo policlonale del coniglio diretto verso la calretinina umana ricombinante (Zymed, South San Francisco, CA, USA), utilizzato con diluizioni di 1:25;
6. Per la determinazione della proteina S100 è stato utilizzato l'anticorpo poligonale del coniglio diretto contro la proteina S100 (Dako, Glostrup, Denmark), utilizzato con diluizioni di 1:500;
7. Per la determinazione del CD117 è stato utilizzato l'anticorpo policlonale del coniglio del c-kit (CD117, Dako, Carpinteria, CA, USA), utilizzato con diluizioni di 1:50.

4.4 Analisi ottica computerizzata

Il numero di cellule immunoreattive per i suddetti markers e l'area delle cellule epiteliali sono state misurate utilizzando il software Olympus: Cell ^ D. Utilizzando l'obiettivo 40x, il campo del monitor rappresentato equivale ad un'area di 0,14 mm² del tessuto analizzato. Le misurazioni sono state effettuate in dieci campi scelti a caso

per ogni individuo. Le sezioni analizzate dei pazienti e controlli sono state codificate e mescolate, e le misurazioni sono state effettuate senza la conoscenza dell'identità dei pazienti. È stato utilizzato l'obiettivo 40x. I dati provenienti da campi sono stati registrati, è stato calcolato il numero di cellule per mm² di epitelio, e l'analisi statistica è stata eseguita automaticamente. Inoltre, il numero di cellule immunoreattive per i suddetti markers è stato anche contato per campo microscopico in 10 campi per ogni individuo.

4.5 Analisi statistica

I dati sono stati analizzati utilizzando il software SPSS 15 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Le variabili continue sono state riportate come media (\pm deviazione standard [SD]) o mediana (range) in base alla loro distribuzione. Le variabili categoriche sono state riportate come frequenza e percentuale. Le differenze significative sono state calcolate utilizzando il test al chi-quadrato per le variabili categoriche ed il test *t* di Student per le variabili continue.

5. Risultati

5.1 Incidenza delle CM

Dal gennaio 2013 al gennaio 2015 sono state effettuate presso il servizio di Endoscopia Digestiva della Fondazione Istituto G. Giglio di Cefalù 2712 colonscopie, di cui 154 (5,7 %) per diarrea cronica, per cui è stata effettuata una mappatura ileocolica per indagare l'origine della diarrea mediante analisi istopatologica. Di queste 154 colonscopie, 20 (12,9 %) sono risultate positive all'esame istopatologico per CM, di cui 6 (3,8%) risultavano essere CC, mentre 14 (9,1 %) risultavano essere CL.

5.2 Endoscopia, istopatologia ed immunoistochimica, ed associazione fra colite microscopica ed ileite

I reperti colici dei pazienti "casi" e dei controlli sono risultati essere macroscopicamente normali. L'esame istopatologico delle biopsie coliche ed ileali dei controlli ha dimostrato una normale istologia, mentre quello dei pazienti con CM ha dimostrato le caratteristiche tipiche (sopra menzionate) della CC in 6 pazienti, e della CL in 14 pazienti.

Tra le CC, 6/6 (100%) presentavano un'ileite associata, stabilita secondo i criteri precedentemente definiti. Tra le CL, 4/14 (28,5%) presentavano un'ileite associata, stabilita secondo i criteri precedentemente definiti.

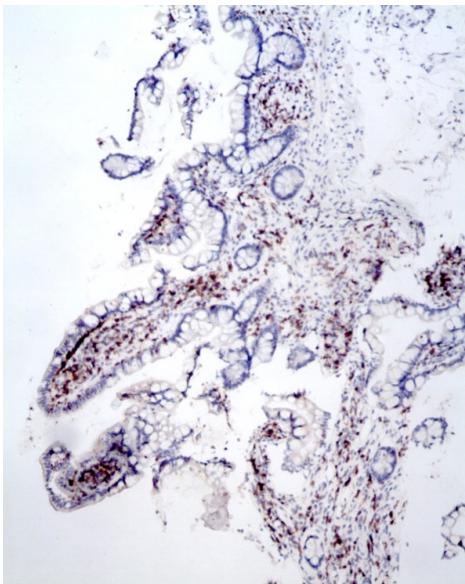
5.3 Analisi ottica computerizzata

5.3.1 Caratterizzazione immunofenotipica dell'infiltrato linfocitario dell'ileo - cellule CD3 +

Nei pazienti con CC, a livello dell'infiltrato ileale, la densità di cellule CD3+ risulta significativamente più elevata rispetto ai controlli (55 ± 3.19 , versus 30 ± 2.86 , $t=21.68$ con 28 gradi di libertà, $p<0.0001$), (figura 1, 2a e 2b). L'aumento delle cellule CD3+ nei pazienti con CC è stato verificato sia in termini di numero / mm² epitelio, sia come numero / campo microscopico.

numero di cellule per
mm²
di epitelio (media +/- DS)

Figura 1. Distribuzione della densità cellulare delle cellule CD3+ nell'ileo dei
pazienti con colite collagenosica e nei controlli



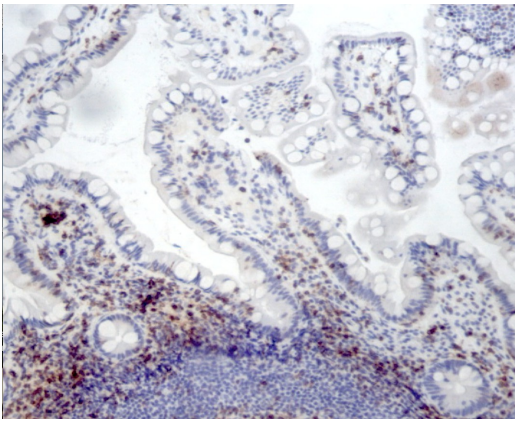


Figura 2a

Figura 2b

Figura 2. Nella figura sono mostrate le cellule immunoreattive per il CD3 nell'ileo di un paziente con colite collagenosica (2a) e in un paziente controllo (2b), ingrandimento 25x, scala 1:100 micron.

5.3.2 Caratterizzazione immunofenotipica dell'infiltrato linfocitario dell'ileo - cellule CD8 +

Nei pazienti con CC, a livello dell'infiltrato ileale, la densità di cellule CD8 + risulta significativamente più elevata rispetto ai controlli (45 ± 2.5 , versus 29 ± 2.99 , $t=25.16$ con 38 gradi di libertà, $p < 0.0001$), (figura 3, 4a e 4b). L'aumento delle cellule CD8 + nei pazienti con CC è stato verificato sia in termini di numero / mm^2 epitelio, sia come numero / campo microscopico.

Figura 3. Distribuzione della densità cellulare delle cellule CD8+ nell'ileo dei pazienti con colite collagenosica e nei controlli

numero di cellule per
mm²
di epitelio (media +/- DS)

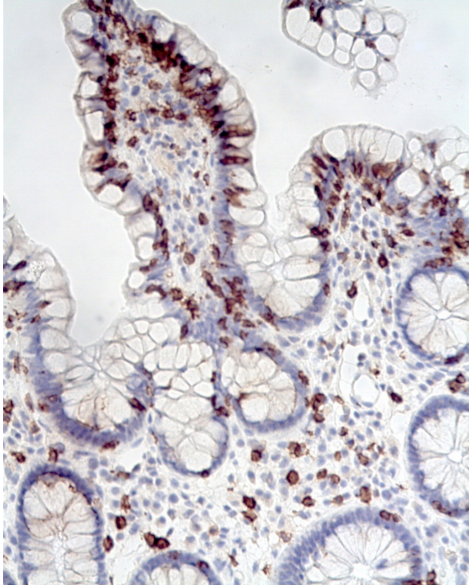


Figura 4a

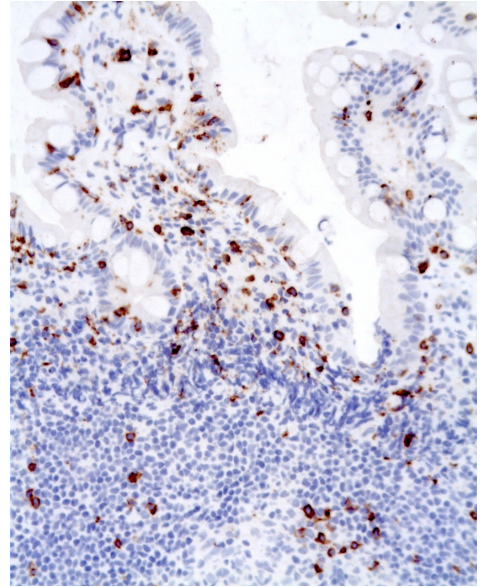


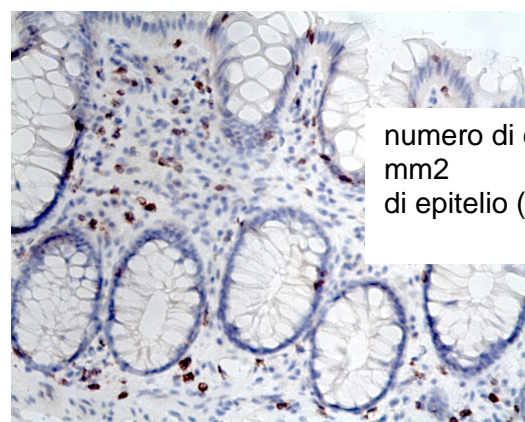
Figura 4b

Figura 4. Nella figura sono mostrate le cellule immunoreattive per il CD8 nell'ileo di un paziente con colite collagenosica (4a) e in un paziente controllo (4b), ingrandimento 25x, scala 1:100 micron.

5.3.3 Caratterizzazione immunofenotipica dell'infiltrato linfocitario del colon destro - cellule CD3 +

Nei pazienti con CC, a livello dell'infiltrato linfocitario del colon destro, la densità di cellule CD3+ risulta significativamente più elevata rispetto ai controlli (38 ± 3.19 , versus 29 ± 2.99 , $t=9.45$ con 38 gradi di libertà, $p<0.0001$), (figura 5, 6a e 6b). L'aumento delle cellule CD3+ nei pazienti con CC è stato verificato sia in termini di numero / mm² epitelio, sia come numero / campo microscopico.

Figura 5. Distribuzione della densità cellulare delle cellule CD3+ nel colon destro dei pazienti con colite collagenosica e nei controlli



numero di cellule per
mm²
di epitelio (media +/- DS)

Figura 6a

Figura 6b

Figura 6. Nella figura sono mostrate le cellule immunoreattive per il CD8 nell'ileo di un paziente con colite collagenosica (6a) e in un paziente controllo (6b), ingrandimento 25x, scala 1:100 micron.

5.3.4 Caratterizzazione immunofenotipica dell'infiltrato linfocitario del colon destro - cellule CD8 +

Nei pazienti con CC, a livello dell'infiltrato linfocitario del colon destro, la densità di cellule CD8+ risulta significativamente più elevata rispetto ai controlli (17 ± 2.91 , versus 8 ± 3.31 , $t=9.33$ con 40 gradi di libertà, $p<0.0001$), (figura 7, 8a e 8b). L'aumento delle cellule CD8+ nei pazienti con CC è stato verificato sia in termini di numero / mm² epitelio, sia come numero / campo microscopico.

Figura 7. Distribuzione della densità cellulare delle cellule CD8+ nel colon destro dei pazienti con colite collagenosica e nei controlli

numero di cellule per
mm²
di epitelio (media +/- DS)



Figura 8a



Figura 8b

Figura 8. Nella figura sono mostrate le cellule immunoreattive per il CD8 nel colon destro di un paziente con colite collagenosica (8a) e in un paziente controllo (8b), ingrandimento 25x, scala 1:100 micron.

5.3.5 Densità cellulare della cromogranina ileale

Nei pazienti con CC, a livello dell'infiltrato ileale, la densità di cellule cromogranina A + non risulta significativamente differente rispetto ai controlli (31.45 ± 5.05 , versus 29 ± 4.35 , $t=1.64$ con 38 gradi di libertà, $p=0.10$), (figura 9, 10a e 10b). La differenza della distribuzione delle cellule cromogranina A + nei pazienti con CC e nei controlli è stato verificato sia in termini di numero / mm² epitelio, sia come numero / campo microscopico.

Figura 9. Distribuzione della densità cellulare delle cellule cromogranina A + nell'ileo dei pazienti con colite collagenosica e nei controlli

numero di cellule per
mm²
di epitelio (media +/- DS)

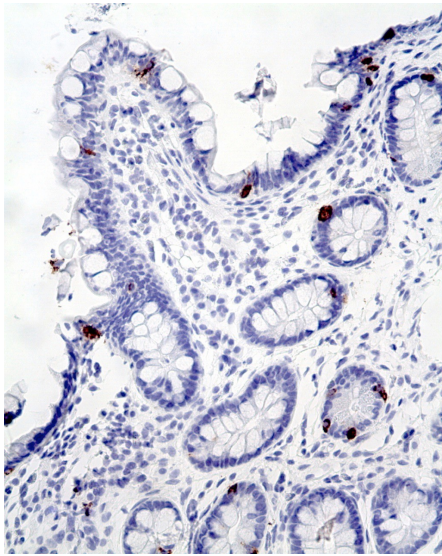


Figura 10a

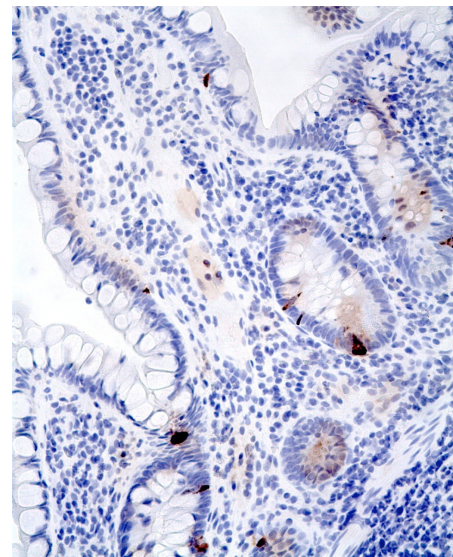


Figura 10b

Figura 10. Nella figura sono mostrate le cellule immunoreattive per la cromogranina A nell'ileo di un paziente con colite collagenosica (10a) e in un paziente controllo (10b), ingrandimento 25x, scala 1:100 micron.

5.3.6 Densità cellulare della cromogranina nel colon destro

Nei pazienti con CC, a livello del colon destro, la densità di cellule cromogranina A + non risulta significativamente differente rispetto ai controlli (29+/-4.63, versus 27+/-41

5.31, $t=1.26$ con 38 gradi di libertà, $p=0.21$), (figura 11, 120a e 12b). La differenza della distribuzione delle cellule cromogranina A + nei pazienti con CC e nei controlli è stato verificato sia in termini di numero / mm² epitelio, sia come numero / campo microscopico.

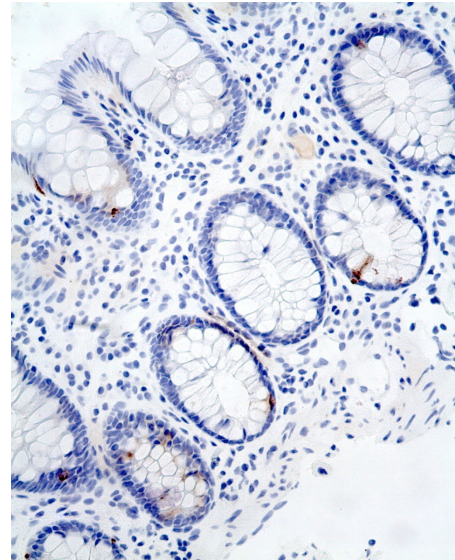


Figura 11. Distribuzione della densità cellulare delle cellule cromogranina A + nel colon destro dei pazienti con colite collagenosica e nei controlli

Figura 12a

Figura 12b

Figura 12. Nella figura sono mostrate le cellule immunoreattive per la cromogranina A nel colon destro di un paziente con colite collagenosica (12a) e in un paziente controllo (12b), ingrandimento 25x, scala 1:100 micron.

5.3.7 Densità cellulare della serotonina ileale

Nei pazienti con CC, a livello dell'infiltrato ileale, la densità di cellule serotonina + risulta significativamente più elevata rispetto ai controlli (41 ± 5.47 , versus 27.85 ± 4.88 , $t=8.01$ con 38 gradi di libertà, $p<0.0001$), (figura 13, 14a e 14b). L'aumento delle cellule serotonina + nei pazienti con CC è stato verificato sia in termini di numero / mm² epitelio, sia come numero / campo microscopico.

Figura 13. Distribuzione della densità cellulare delle cellule serotonina + nell'ileo dei pazienti con colite collagenosica e nei controlli



Figura 14a

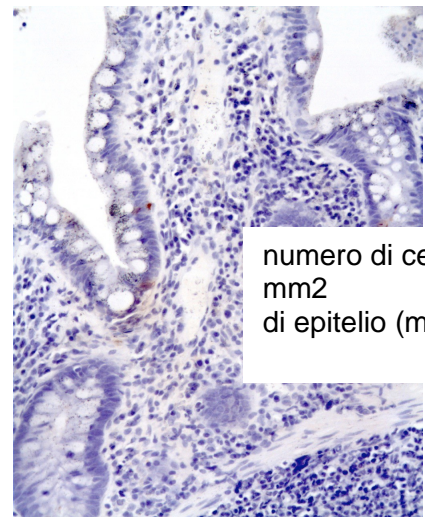


Figura 14b

Figura 14. Nella figura sono mostrate le cellule immunoreattive per la serotonina nell'ileo di un paziente con colite collagenosica (14a) e in un paziente controllo (14b), ingrandimento 25x, scala 1:100 micron.

5.3.8 Densità cellulare della serotonina del colon destro

Nei pazienti con CC, a livello del colon destro, la densità di cellule serotonina + risulta significativamente più elevata rispetto ai controlli (42.2 ± 4.86 , versus 26 ± 3.49 , $t=12.09$ con 38 gradi di libertà, $p < 0.0001$), (figura 15, 16a e 16b). L'aumento delle cellule serotonina + nei pazienti con CC è stato verificato sia in termini di numero / mm² epitelio, sia come numero / campo microscopico.

Figura 15. Distribuzione della densità cellulare delle cellule serotonina + nel colon destro dei pazienti con colite collagenosica e nei controlli

numero di cellule per
mm²
di epitelio (media +/- DS)

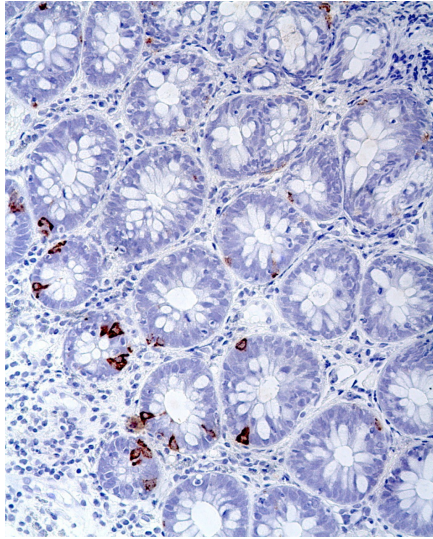


Figura 16a

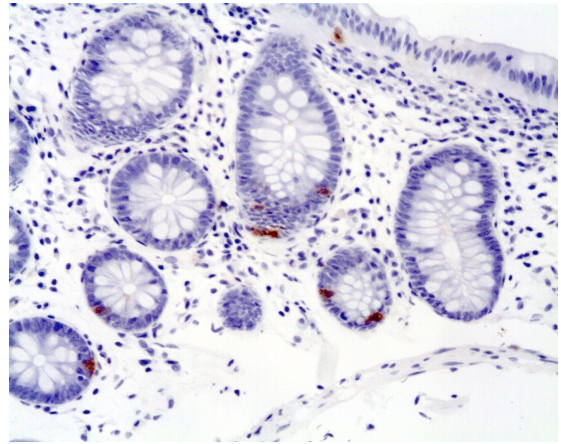


Figura 16b

Figura 16. Nella figura sono mostrate le cellule immunoreattive per la serotonina nel colon destro di un paziente con colite collagenosica (16a) e in un paziente controllo (16b), ingrandimento 25x, scala 1:100 micron.

5.3.9 Densità cellulare della calretinina ileale

Nei pazienti con CC, a livello dell'ileo, la densità di cellule calretinina + non risulta significativamente differente rispetto ai controlli, seppur con un trend di significatività a favore di un aumento di tale densità cellulare nei controlli (10 ± 3.38 , versus 12 ± 2.99 , $t=1.97$ con 38 gradi di libertà, $p=0.0551$), (figura 17, 18a e 18b). L'aumento delle cellule serotonina + nei pazienti con CC è stato verificato sia in termini di numero / mm² epitelio, sia come numero / campo microscopico.

Figura 17. Distribuzione della densità cellulare delle cellule calretinina + nell'ileo dei pazienti con colite collagenosica e nei controlli

numero di cellule per
mm²
di epitelio (media +/- DS)

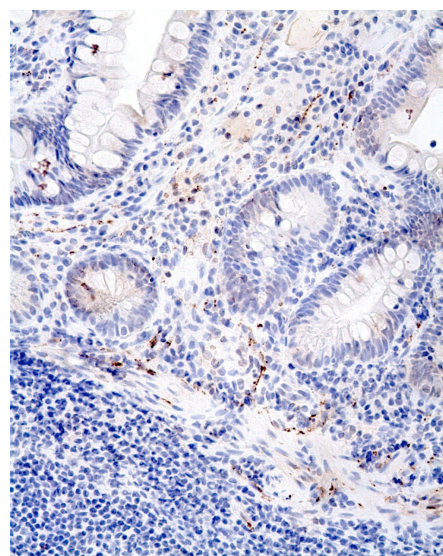
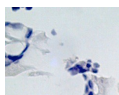


Figura 18a

Figura 18b

Figura 18. Nella figura sono mostrate le cellule immunoreattive per la calretinina nell'ileo di un paziente con colite collagenosica (18a) e in un paziente controllo (18b), ingrandimento 25x.

5.3.10 Densità cellulare della calretinina del colon destro

Nei pazienti con CC, a livello del colon destro, la densità di cellule calretinina + non risulta significativamente differente rispetto ai controlli, seppur con un trend di significatività a favore di un aumento di tale densità cellulare nei controlli (12 ± 2.99 , versus 13.8 ± 3.01 , $t=1.89$ con 38 gradi di libertà, $p=0.0673$), (figura 19). L'aumento delle cellule serotonina + nei pazienti con CC è stato verificato sia in termini di numero / mm² epitelio, sia come numero / campo microscopico.

Figura 19. Distribuzione della densità cellulare delle cellule calretinina + nel colon destro dei pazienti con colite collagenosica e nei controlli

numero di cellule per
mm²
di epitelio (media +/- DS)

5.3.11 Densità cellulare della proteina S100 ileale

Nei pazienti con CC, a livello dell'ileo, la densità di cellule S100 + non risulta significativamente differente rispetto ai controlli, seppur con un trend di significatività a favore di un aumento di tale densità cellulare nei controlli (14 ± 3.01 , versus 15.8 ± 3.6 , $t=1.88$ con 38 gradi di libertà, $p=0.0673$), (figura 20, 21a e 21b). L'aumento delle cellule serotonina + nei pazienti con CC è stato verificato sia in termini di numero / mm² epitelio, sia come numero / campo microscopico.

Figura 20. Distribuzione della densità cellulare delle cellule S100 + nell'ileo dei pazienti con colite collagenosica e nei controlli



Figura 21a

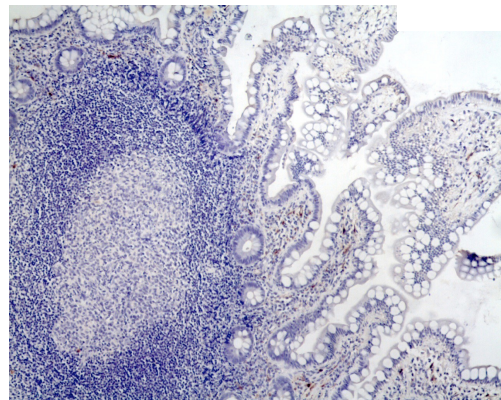


Figura 21b

numero di cellule per
mm²
di epitelio (media +/- DS)

Figura 21. Nella figura sono mostrate le cellule immunoreattive per la calretinina nell'ileo di un paziente con colite collagenosica (21a) e in un paziente controllo (21b), ingrandimento 25x.

5.3.12 Densità cellulare della proteina S100 nel colon destro

Nei pazienti con CC, a livello del colon destro, la densità di cellule S100 + non risulta significativamente differente rispetto ai controlli, seppur con un trend di significatività a favore di un aumento di tale densità cellulare nei controlli (15.8 ± 3.67 , versus 18.35 ± 4.51 , $t=1.95$ con 38 gradi di libertà, $p=0.0575$), (figura 22, 23a e 23b). L'aumento delle cellule serotonina + nei pazienti con CC è stato verificato sia in termini di numero / mm² epitelio, sia come numero / campo microscopico.

Figura 22. Distribuzione della densità cellulare delle cellule S100 + nel colon destro dei pazienti con colite collagenosica e nei controlli

numero di cellule per
mm²
di epitelio (media +/- DS)

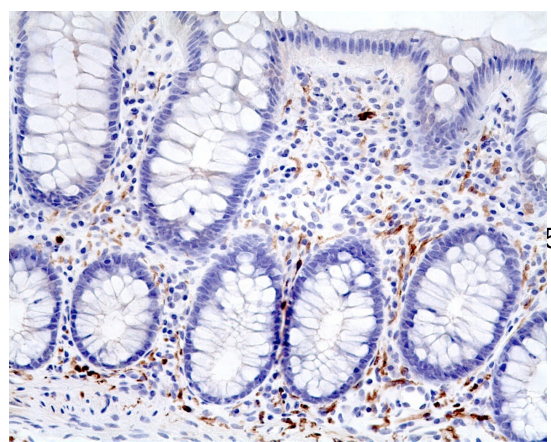


Figura 23a

Figura 23b

Figura 23. Nella figura sono mostrate le cellule immunoreattive per la calretinina nel colon destro di un paziente con colite collagenosica (23a) e in un paziente controllo (23b), ingrandimento 25x.

5.3.13 Densità cellulare del CD117 ileale

Nei pazienti con CC, a livello dell'infiltrato ileale, la densità di cellule CD117+ non risulta significativamente differente rispetto ai controlli (10.5 ± 3.12 , versus 8.5 ± 4.07 , $t=1.74$ con 38 gradi di libertà, $p=0.0893$), (figura 24, 25a e 25b). L'aumento delle cellule serotonina + nei pazienti con CC è stato verificato sia in termini di numero / mm² epitelio, sia come numero / campo microscopico.

Figura 24. Distribuzione della densità cellulare delle cellule CD117 + nell'ileo dei pazienti con colite collagenosica e nei controlli

numero di cellule per
mm²
di epitelio (media +/- DS)

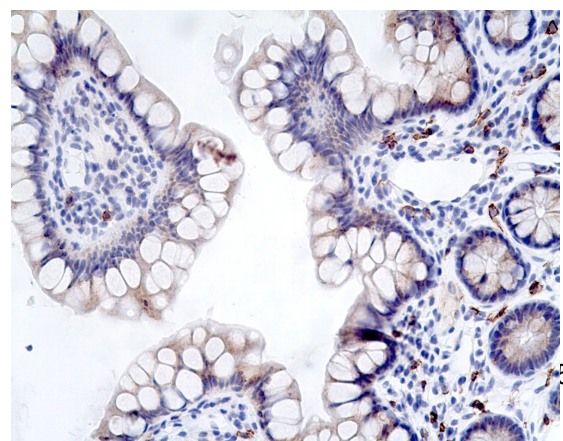


Figura 25a

Figura 25b

Figura 25. Nella figura sono mostrate le cellule immunoreattive per il CD 117 nell'ileo di un paziente con colite collagenosica (25a) e in un paziente controllo (25b), ingrandimento 25x, scala 1:100 micron.

5.3.13 Densità cellulare del CD117 nel colon destro

Nei pazienti con CC, a livello del colon destro, la densità di cellule CD117+ non risulta significativamente differente rispetto ai controlli (8.5 ± 4.07 , versus 6.4 ± 2.79 , $t=1.90$ con 38 gradi di libertà, $p=0.065$), (figura 26, 27a e 27b). L'aumento delle cellule serotonina + nei pazienti con CC è stato verificato sia in termini di numero / mm² epitelio, sia come numero / campo microscopico.

Figura 26. Distribuzione della densità cellulare delle cellule CD117 + nel colon destro dei pazienti con colite collagenosica e nei controlli

numero di cellule per
mm²
di epitelio (media +/- DS)

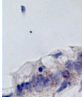


Figura 27a

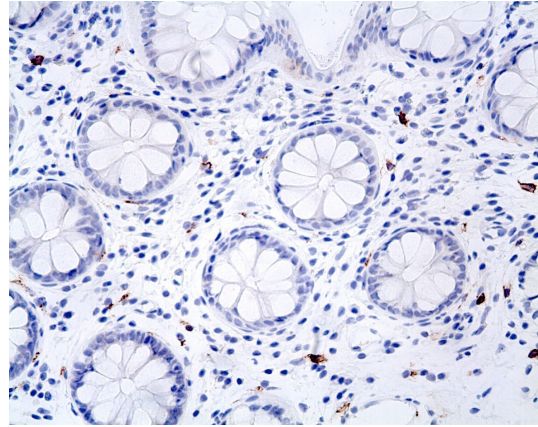


Figura 27b

Figura 27. Nella figura sono mostrate le cellule immunoreattive per il CD117 nel colon destro di un paziente con colite collagenosica (27a) e in un paziente controllo (273b), ingrandimento 25x, scala 1:100.

6. Discussione

6.1 Associazione tra colite microscopica ed ileite microscopica

Come nello studio di Díaz Santisteban [90], anche nel presente studio è stata riscontrata un'associazione fra CM ed ileite microscopica, particolarmente evidente per le ileiti associate alle CC rispetto alle ileiti associate alle CL. Nello studio di Díaz Santisteban, al contrario, non era riportata una distinzione fra le due sottopopolazioni di CM. L'autore ipotizzava che l'insorgenza dell'ileite microscopica fosse un processo multifattoriale legato a molteplici fattori: una riduzione primaria della peristalsi e del pH acido gastrico favorirebbe infatti una sovracrescita batterica che causerebbe, di concerto ad una iperstimolazione adrenergica secondaria alla presenza di agenti "stressanti", l'invasione della mucosa ileale da parte dei linfociti [90].

La prevalente distribuzione dell'ileite microscopica nel contesto delle CC supporterebbe l'ipotesi secondo la quale LC e CC potrebbero essere considerate come differenti fasi patologiche della stessa entità nosografica, dove le CC rappresenterebbero una fase successiva al processo infiammatorio iniziato nell'ambito delle CL; tale ipotesi, tuttavia, andrebbe validata in studi condotti su un più ampio numero di pazienti, che comparino le due entità e che valutino l'infiltrato linfocitario qualitativamente sia nelle CL, che nelle CC.

6.2 Caratterizzazione immunofenotipica dell'infiltrato linfocitario

Ad oggi, nonostante la relativa dimensione campionaria, il presente è uno dei più grandi studi finora caratterizzanti i sottogruppi di linfociti nella CC.

Precedentemente, Goeranzon [96] aveva valutato le sottopopolazioni linfocitarie nelle CC e nelle CL, confrontandole con dei controlli sani, e valutando le cellule CD8+, CD3+, CD4+, CD20+ e CD30+. Rispetto al presente studio, quello di Goeranzon differenziava le diverse sottoclassi di linfociti nei diversi compartimenti intraepiteliale, della lamina propria e delle cripte, riscontrando un incremento dei linfociti CD8+ nell'epitelio e nella lamina propria, con un consensuale decremento dei linfociti CD4+ nella lamina propria [96].

Nel presente studio, nei pazienti con CC è stato riscontrato un incremento delle sottopopolazioni linfocitaria CD3+ e soprattutto CD8+ a livello dell'epitelio e della lamina propria (tuttavia senza che sia stata valutata quantitativamente la differente distribuzione fra i due diversi compartimenti) rispetto ai controlli. Un limite del presente studio è rappresentato dalla mancata valutazione delle sottopopolazioni linfocitaria CD4+, CD20+ e CD30+, e dal mancato confronto fra CC e CL; tuttavia, come sottolineato precedentemente, il presente studio si prefigge di analizzare prevalentemente, sotto il profilo immunofenotipico, soltanto le CC; inoltre, a

differenza dello studio di Goeranzon, il presente studio conferma, a livello ileale, le medesime alterazioni immunofenotipiche riscontrate a livello colico.

Come precedentemente affermato, il marcato infiltrato CD8 + dovuto ai linfociti T citotossici (CTL) nella mucosa colica di pazienti con colite microscopica è stato recentemente dimostrato essere dovuto ad un incremento dell'espansione di cellule T residenti: ciò suggerisce che l'antigene attivante il processo infiammatorio sia localizzato nella mucosa colica. Infatti, altri studi hanno inoltre dimostrato un incremento delle cellule T della memoria CD8 + (Ki67 + e CD45RO +) nel compartimento intraepiteliale e nella lamina propria, essendo più pronunciata nella CC rispetto alla CL e nella malattia attiva, e rispetto alla malattia in remissione istologica [53].

Anche questo dato avvalorerebbe l'ipotesi secondo la quale LC e CC potrebbero essere considerate come differenti fasi patologiche della stessa entità nosografica, dove le CC rappresenterebbero una fase successiva al processo infiammatorio iniziato nell'ambito delle CL; tale ipotesi, tuttavia, andrebbe validata in studi condotti su un più ampio numero di pazienti, che comparino le due entità e che valutino l'infiltrato linfocitario qualitativamente sia nelle CL, che nelle CC.

6.3 Valutazione della densità dei markers di attivazione neuroendocrina nell'ileite microscopica associata alla colite collagenosica e nella colite collagenosica

Per ciò che concerne la Cromogranina A, essa rappresenta un marker delle cellule neuroendocrine. Precedentemente, El Sahly [63] aveva dimostrato un'incremento dell'espressione di tale marker nel colon destro e nel colon sinistro dei pazienti affetti da CL, rispetto ai controlli sani, epifenomeno di una comunicazione attiva tra il sistema neuroendocrino e il sistema immunitario, tanto da ipotizzare che la sigmoidoscopia da sola, in tal modo poteva essere utilizzata nella diagnosi di LC con l'ausilio di tale marker. Tuttavia i dati del nostro studio risultano essere contrastanti, per quanto riguarda la CC e l'ileite associata alla CC; interpretando con cautela tali dati, alla luce della relativa dimensione campionaria, nelle CC potrebbe esservi un coinvolgimento soltanto marginale della Cromogranina A e dei peptidi da questa derivati, nella patogenesi della malattia stessa rispetto alla CL.

Per ciò che concerne la Serotonina, essa attiva le diramazioni sensoriali del sistema nervoso enterico a livello della sottomucosa, nonché la motilità gastrointestinale e la secrezione di ioni cloruro mediante il controllo sugli inter-neuroni e sui motoneuroni [28]. Ci sono diversi studi che dimostrano che le cellule dell'infiammazione e del sistema immunitario colpiscono il sistema neuroendocrino dell'intestino [28]. Infatti, la serotonina secreta dalle cellule enterocromaffini modula la risposta immunitaria,

dal momento che le cellule enterocromaffini risultano in contatto con o molto vicino ai linfociti CD3 + CD20 +, e diversi recettori serotoninergici sono stati caratterizzati in linfociti, monociti, macrofagi e cellule dendritiche [28].

Il presente studio dimostra, con il limite relativo alla dimensione campionaria, così come evidenziato in precedenti studi condotti da El Sahly [28] riguardanti le CL, che vi è un incremento della densità delle cellule positive per la Serotonina anche nelle CC e nelle ileiti associate alle CC. Pertanto si può ipotizzare che l'alta densità di cellule positive per la serotonina nei pazienti con CC è secondaria all'interazione tra le cellule immunitarie e le cellule enterocromaffini positive per la serotonina localizzate nell'epitelio e nella sottomucosa dei pazienti con CC. L'incremento della serotonina potrebbe causare un'accelerata motilità del colon, nonché ipersensibilità viscerale, causando diarrea e dolore addominale, sintomi presenti nella CC.

6.4 Valutazione della densità dei markers delle cellule interstiziali di Cajal e delle cellule ICC-like nell'ileite microscopica associata alla colite collagenosica e nella colite collagenosica

Nel presente studio, per la prima volta ad oggi, sono stati valutati dei marcatori per le ICC e le ICC-LC nell'ileite microscopica associata alla CC e nella CC, mediante le colorazioni per calretinina e proteina S100. I risultati del presente studio dimostrano che la densità cellulare di entrambi i marcatori, sia a livello ileale, che a livello colico, nelle CC non risulta significativamente differente rispetto ai controlli, seppur con un trend di significatività a favore di un aumento di tale densità cellulare nei controlli. Tale dato, seppur da interpretare con cautela alla luce della relativa dimensione campionaria, potrebbe giustificare una disregolazione dell'interazione fra sistema nervoso, neuroendocrino e immunitario anche a livello delle cosiddette cellule "pace-maker" della motilità intestinale, che apparirebbero in quantità non significativamente inferiore rispetto ai controlli nel contesto di un quadro di flogosi intestinale cronica, motivando così l'accelerata motilità intestinale riscontrata nelle CC anche sotto questo aspetto.

Le ICC, che si trovano nella muscolatura del tratto gastrointestinale, sono state ben caratterizzate (per quanto possibile, al giorno d'oggi) dal punto di vista ultrastrutturale, citochimico e funzionale [86].

Negli ultimi anni, particolare interesse è stata focalizzata sulle cellule ICC-LC, localizzate all'esterno della muscolatura del tratto gastrointestinale. Alcuni Precedenti studi, sulla base di criteri accettati, hanno dimostrato la presenza delle ICC-LC nel pancreas umano, nell'utero, nella tuba di Falloppio e nella ghiandola mammaria [86].

In tali contesti, sono stati dimostrati stretti contatti tra ICC-LC e cellule stellate

pancreatiche, macrofagi o fibroblasti, ma anche con cellule fibroblasti-like e macrofagi residenti [86]. Inoltre, Wang [97] ha riscontrato una stretta interazione fra le ICC e i macrofagi attivati ed i linfociti in un modello animale di infiammazione colica indotta da *T. spiralis*.

Tali osservazioni hanno spinto a ipotizzare il concetto di “connective conjunction” (letteralmente, “collegamento connettivo”) dal momento che le strette interazioni fra le ICC / ICC-LC e gli immunociti risultano situati nel compartimento interstiziale, non epiteliale, come in una sorta di “sinapsi stromale” [86].

6.4 Valutazione della densità dei mastociti

Come affermato precedentemente, i mastociti sono coinvolti in un ampio spettro di funzioni, ed il termine di colite “mastocitaria” è stata descritto clinicamente in due studi, in un sottogruppo di pazienti con diarrea cronica, dove l’incremento quantitativo dei mastociti è stato dimostrato come l’anomalia morfologica primaria [47].

Nel presente studio non è stata riscontrata una significativa differenza nella densità cellulare dei mastociti, valutata mediante la quantificazione del CD117, a livello dell’ileo e del colon dei pazienti con CC rispetto ai controlli.

Nel contesto delle “coliti mastocitarie”, rimangono ancora numerose questioni non risolte. Infatti i trigger immunologici o ambientali per l’attivazione della proliferazione mucosale dei mastociti devono essere ancor meglio chiariti.

Dovrebbero essere infatti condotti degli studi prospettici mediante opportune colorazioni istochimiche, e su un più ampio numero di pazienti, per comprendere ad esempio se le coliti masticatorie coincidono con un sottogruppo di diarree funzionali. Infine, sarebbe auspicabile l'ideazione di studi controllati randomizzati riguardanti il ruolo degli antistaminici e dei farmaci stabilizzanti i mastociti in diversi gruppi di pazienti affetti da diarrea cronica con e senza una predominanza colica di mastociti. Infatti, ad oggi, non è ancora chiaro se la "colite mastocitaria" sia una reale entità clinica da ricercare in pazienti con diarrea cronica, e se, una volta diagnosticata, il suo trattamento risulti utile [47].

7. Conclusioni

Il presente studio presenta diversi limiti, quali la dimensione campionaria e l'analisi immunoistochimica delle sole CC, che tuttavia risultano, nell'ambito delle CM, le meno studiate nella letteratura scientifica internazionale. Estrapolando i risultati con cautela, emergono tuttavia dei dati interessanti.

Innanzitutto è stata validata in una coorte europea l'esistenza della ileite microscopica, in associazione sia alle CL che, soprattutto, alle CC, di cui è stato parzialmente identificato l'immunofenotipo, consistente prevalentemente in linfociti CD8+. In secondo luogo, è stato ipotizzato un ruolo eziopatogenetico per le ICC e le ICC-LC, la cui possibile ipoespressione a livello ileale e colico, potrebbe avere un ruolo compartecipe nella genesi della disregolazione della motilità intestinale nelle

CM. Inoltre, è stata confermata l'importanza patogenetica della serotonina sia a livello colico ma anche a livello ileale, in qualità di effettore neuroendocrino della regolazione della secrezione di ioni cloruro e della motilità intestinale; al contrario, il ruolo della cromogranina A, precedentemente valorizzato in altri studi, nel setting delle CC deve essere meglio chiarito. Il ruolo dei mastociti nelle CM, ed in generale nelle diarree croniche, rimane ancora oscuro. Tali dati consentono di ipotizzare che, nell'ambito delle CM, le CC rappresentino una entità a sé stante dal punto di vista della caratterizzazione immunofenotipica, neuroendocrina e cellulare, che tuttavia necessita di ulteriori approfondimenti mediante studi condotti su un più ampio numero di pazienti e che confrontino le ipotesi diagnostiche affrontate nel presente studio con quelle esistenti riguardanti le CL.

Bibliografia

- 1) Fernandez-Banares F, salas A, Esteve M. Pitfalls and errors in the diagnosis of collagenous and lymphocytic colitis. *J Chron's and Colitis* 2008;2:343-347.
- 2) Roth B, Manjer J, Ohlsson B. Microscopic Colitis is Associated with Several Concomitant Diseases. *Drug Target Insights*. 2013 Aug 11;7:19-25.
- 3) Jean R, Durand JM, Cretel E, Heyries L, Payan MJ, Retornaz F, Soubeyrand J. Lymphocytic colitis and Gougerot-Sjögren syndrome. Report of two cases. *Rev Med Interne*. 1999 Oct;20(10):923-5.
- 4) Pardi DS. Microscopic colitis. *Clin Geriatr Med*. 2014 Feb;30(1):55-65. doi:10.1016/j.cger.2013.10.005.
- 5) Ianiro G, Cammarota G, Valerio L, Annicchiarico BE, Milani A, Siciliano M, Gasbarrini A. Microscopic colitis. *World J Gastroenterol* 2012; 18(43): 6206-6215,
- 6) El-Salhy M, Gundersen D, Hatlebakk JG, Hausken T. Clinical presentation, diagnosis, pathogenesis and treatment options for lymphocytic colitis (Review). *Int J Mol Med*. 2013 Aug;32(2):263-70. doi: 10.3892/ijmm.2013.1385. Epub 2013 May 21. Review. PubMed PMID: 23695201.
- 7) Guagnozzi D, Lucendo AJ. Advances in knowledge on microscopic colitis: From bench to bedside. *Rev Esp Enferm Dig* 2015;107:98-108. 77.

- 8) Park E, Park YS, Park DR, Jung SA, Han DS, Jang BI, et al. Cytokine expression of microscopic colitis including interleukin-17. *Gut Liver* 2014; DOI: 10.5009/gnl13439.
- 9) Järnerot G, Hertervig E, Grännö C, Thorhallsson E, Eriksson S, Tysk C, et al. Familial occurrence of microscopic colitis: a report on five families. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:959-62.
- 10) Van Tilburg AJ, Lam HG, Seldenrijk CA, Stel HV, Block P, Dekker W, et al. Familial occurrence of collagenous colitis. A report of two families. *J Clin Gastroenterol* 1990;12:279-85.
- 11) Thomson A, Kaye G. Further report of familial occurrence of collagenous colitis. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:1244-6.
- 12) Phull PS, Vijayan B, Bisset WM, Murray GI. Familial collagenous colitis involving a 6-year old child. *J Crohn's Colitis* 2012;6:606-9.
- 13) Giardiello FM, Lazenby AJ, Yardeley JH, Bias WB, Johnson J, Alian- iello RG, et al, Increased HLA A1 and diminished HLA A3 in lympho- cytic colitis compared to controls and patients with collagenous colitis. *Dig Dis Sci* 1992;37:496-9.
- 14) Fine KD, Do K, Schulte K, Ogunji F, Guerra R, Osowski L, et al. High prevalence of celiac sprue-like HLA-DQ genes and enteropathy in patients with the microscopic colitis syndrome. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1974-82.
- 15) Fernandez-Bañares F, Esteve M, Farré C, Salas A, Alsina M, Casalots J, et al. Predisposing HLA-DQ2 and HLA-DQ8 haplotypes of coeliac disease and

associated enteropathy in microscopic colitis. Eur J Gastroenterol Hepatol 2005;17:1333-8.

- 16) Madisch A, Hellmig S, Schreiber S, Bethke B, Stolte M, Miehke S. Allelic variation of the matrix metalloproteinase-9 gene is associated with collagenous colitis. Inflamm Bowel Dis 2011;17:2295-8.
- 17) Castaneda FE, Walia B, Vijay-Kumar M, Patel NR, Roser S, Kolachala VL, et al. Targeted deletion of metalloproteinase 9 attenuates experimental colitis in mice: Central role of epithelial-derived MMP. Gastroenterology 2005;129:1991-2008.
- 18) Koskela RM, Karttunen RA, Niemelä SE, Lehtola JK, Bloigu RS, Karttunen RA. Cytokine gene polymorphism in microscopic colitis association with the IL-6-174 GG genotype. Eur J Gastroenterol Hepatol 2011;23:607-13.
- 19) Perk G, Ackerman Z, Cohen P and Eliakim R: Lymphocytic colitis: a clue to an infectious trigger. Scand J Gastroenterol 34: 110-112, 1999.
- 20) LaSala PR, Chodosh AB, Vecchio JA, Schned LM and Blaszyk H: Seasonal pattern of onset in lymphocytic colitis. J Clin Gastroenterol 39: 891-893, 2005.
- 21) Erim T, Alazmi WM, O'Loughlin CJ and Barkin JS: Collagenous colitis associated with *Clostridium difficile*: a cause effect? Dig Dis Sci 48: 1374-1375, 2003.
- 22) Bohr J, Nordfelth R, Jarnerot G and Tysk C: *Yersinia* species in collagenous colitis: a serologic study. Scand J Gastroenterol 37: 711-714, 2002.

- 23) Makinen M, Niemela S, Lehtola J and Karttunen TJ: Collagenous colitis and *Yersinia enterocolitica* infection. Dig Dis Sci 43: 1341-1346, 1998.
- 24) Spiller RC, Jenkins D, Thornley JP, *et al*: Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute *Campylobacter* enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome. Gut 47: 804-811, 2000.
- 25) Madisch A, Hellmig S, Schreiber S, Bethke B, Stolte M and Miehke S: Allelic variation of the matrix metalloproteinase-9 gene is associated with collagenous colitis. Inflamm Bowel Dis 17: 2295-2298, 2011.
- 26) Spiller R and Garsed K: Postinfectious irritable bowel syndrome. Gastroenterology 136: 1979-1988, 2009.
- 27) Dunlop SP, Jenkins D, Neal KR and Spiller RC: Relative importance of enterochromaffin cell hyperplasia, anxiety, and depression in postinfectious IBS. Gastroenterology 125: 1651-1659, 2003.
- 28) El-Salhy M, Gundersen D, Hatlebakk JG and Hausken T: High densities of serotonin and peptide YY cells in the colon of patients with lymphocytic colitis. World J Gastroenterol 18: 6070-6075, 2012.
- 29) Park JH, Rhee PL, Kim G, *et al*: Enteroendocrine cell counts correlate with visceral hypersensitivity in patients with diarrhoea- predominant irritable bowel syndrome. Neurogastroenterol Motil 18: 539-546, 2006.

- 30) Kim HS, Lim JH, Park H and Lee SI: Increased immunoendocrine cells in intestinal mucosa of postinfectious irritable bowel syndrome patients 3 years after acute *Shigella* infection - an observation in a small case control study. *Yonsei Med J* 51: 45-51, 2010.
- 31) El-Salhy M, Gundersen D, Hatlebakk JG and Hausken T: Irritable Bowel Syndrome: Diagnosis Pathogenesis and Treatment Options. Nova Science Publisher, New York, 2012.
- 32) Breuer NF, Rampton DS, Tammar A, Murphy GM, Dowling RH. Effect of colonic perfusion with sulfated and nonsulfated bile acids on mucosal structure and function in the rat. *Gastroenterology* 1983;84:969-77.
- 33) Lewis FW, Warren GH, Goff JS. Collagenous colitis with involvement of terminal ileum. *Dig Dis Sci* 1991;36:1161-63.
- 34) Ingle SB, Adgaonkar BD, Hinge CR. Microscopic colitis: Common cause of unexplained nonbloody diarrhea. *World J Gastroenterol* 2014;5:48-53.
- 35) Fernandez-Bañares F, Esteve M, Salas A, Forné TM, Espinos JC, Martin-Comin J, et al. Bile acid malabsorption in microscopic colitis and in previously unexplained functional chronic diarrhea. *Dig Dis Sci* 2001;46:2231-8.
- 36) Fausa O, Foerster A, Hoving T. Collagenous colitis. A clinical, histological and ultrastructural study. *Scan J Gastroenterol Suppl* 1985;107:561-4.
- 37) Kingham JG, Levison DA, Ball JA, Dawson AM. Microscopic colitis-a cause of chronic watery diarrhea. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1982;107:8-23.

- 38) Giardiello FM, Bayless TM, Jessurun J, Hamilton SR, Yardely JH. Collagenous colitis: Physiologic and histopathologic studies in seven patients. *Ann Intern Med* 1987;106:46-9.
- 39) Laing AW, Pardi DS, Loftus EV Jr, Smyrk TC, Kammer PP, Tremaine WJ, et al. Microscopic colitis is not associated with cholecystectomy or appendectomy. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:708-11.
- 40) Bohr J, Tysk C, Eriksson S, Abrahamsson H, Järnerot G. Collagenous colitis: A retrospective study of clinical presentation and treatment in 163 patients. *Gut* 1996;39:846-51.
- 41) Münch A, Soderholm JD, Ost A, Carlsson AH, Magnusson KE, Storm M. Low levels of bile acids increase bacterial uptake in colonic biopsies from patients with collagenous colitis in remission. *Aliment Pharmacol Ther* 2011;33:954-60.
- 42) Beaugerie L and Pardi DS: Review article: drug-induced microscopic colitis - proposal for a scoring system and review of the literature. *Aliment Pharmacol Ther* 22: 277-284, 2005.
- 43) Fernandez-Banares F, Esteve M, Espinos JC, *etal*: Drug consumption and the risk of microscopic colitis. *Am J Gastroenterol* 102: 324-330, 2007.
- 44) Bjarnason I, Hayllar J, MacPherson AJ and Russell AS: Side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the small and large intestine in humans. *Gastroenterology* 104: 1832-1847, 1993.

- 45) Leung WK, Bjarnason I, Wong VW, Sung JJ and Chan FK: Small bowel enteropathy associated with chronic low-dose aspirin therapy. *Lancet* 369: 614, 2007
- 46) Takeuchi K, Smale S, Premchand P, *et al*: Prevalence and mechanism of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced clinical relapse in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 4: 196-202, 2006.
- 47) Yen EF and Pardi DS: Review article: microscopic colitis - lymphocytic, collagenous and 'mast cell' colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 34: 21-32, 2011.
- 48) Mahajan D, Goldblum JR, Xiao SY, Shen B and Liu X: Lymphocytic colitis and collagenous colitis: a review of clinico- pathologic features and immunologic abnormalities. *Adv Anat Pathol* 19: 28-38, 2012.
- 49) Tysk C, Bohr J, Nyhlin N, Wickbom A and Eriksson S: Diagnosis and management of microscopic colitis. *World J Gastroenterol* 14: 7280-7288, 2008.
- 50) Whang EE, Hines OJ, Reeve JR, Grandt D, Moser JA, Bilchik AJ, *et al*. Antisecretory mechanisms of peptide YY in rat distal colon. *Dig Dis Sci* 1997;42:1121-7.
- 51) Kumawat AK, Elgbratt K, Tysk C, Bohr J, Hörnquist EH. Reduced T cell receptor excision circle levels in the colonic mucosa of microscopic colitis patients indicate local proliferation rather than homing of peripheral lymphocytes to the inflamed mucosa. *BioMed Res Int* 2013;408638.

- 52) Mosnier JF, Larvol L, Barge J, Dubois S, De La Bigne G, Hénin D, et al. Lymphocytic and collagenous colitis: An immunohistochemical study. *Am J Gastroenterol* 1996;91:709-13.
- 53) Kumawat A, Strid H, Tysk C, Bohr J, Hörnquist EH. Microscopic colitis patients demonstrate a mixed Th17/Tc17 and Th1/Tc1 mucosal cytokine profile. *Mol Immunol* 2013;55:355-64.
- 54) Gunther U, Bateman AC, Beattie RM, Bauer M, MacDonald TT, Kas- kas BA. Connective tissue growth factor expression is increased in col- lagenous colitis and coeliac disease. *Histopathology* 2010;57:427-35.
- 55) Wildgren S, Jlidi R, Cox JN. Collagenous colitis: Histologic, morpho- metric, immunohistochemical and ultrastructural studies. Report of 21 cases. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1988;413:287-96.
- 56) Salas A, Fernandez-Bañares F, Casalots J, González C, Tarroch X, Forcada P, et al. Subepithelial myofibroblasts and tenascin expression in microscopic colitis. *Histopathology* 2003;43:48-54
- 57) Maloy KJ, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2001;2:816-22.
- 58) Griga T, Tromm A, Schmiegel W, Pfisterer O, Muller KM, Brasch F. Collagenous colitis: Implications for the role of vascular endothe- lial growth factor in repair mechanisms. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004;16:397-402.

- 59) Wagner M, Lampinen M, Sangfelt P, Agnarsdottir M, Carison M. Budesonide treatment of patients with collagenous colitis restores normal eosinophil and T-cell activity in the colon. *Inflamm Bowel Dis* 2010;16:1522-8.
- 60) Levy AM, Yamazaki K, Van Keulen VP, Burgart LJ, Sandborn WJ, Philips SF, et al. Increased eosinophil infiltration and degranulation in colonic tissue from patients with collagenous colitis. *Am J Gastroenterol* 2001;96:1522-8.
- 61) Lundberg JO, Herulf M, Olesen M, *et al*: Increased nitric oxide production in collagenous and lymphocytic colitis. *Eur J Clin Invest* 27: 869-871, 1997.
- 62) Olesen M, Middelveld R, Bohr J, *et al*: Luminal nitric oxide and epithelial expression of inducible and endothelial nitric oxide synthase in collagenous and lymphocytic colitis. *Scand J Gastroenterol* 38: 66-72, 2003.
- 63) El-Salhy M, Gundersen D, Hatlebakk JG and Hausken T: Chromogranin A Cell Density as a Diagnostic Marker for Lymphocytic Colitis . *Dig Dis Sci* (2012) 57:3154–3159
- 64) Kolios G, Rooney N, Murphy CT, Robertson DA and Westwick J: Expression of inducible nitric oxide synthase activity in human colon epithelial cells: modulation by T lymphocyte derived cytokines. *Gut* 43: 56-63, 1998.
- 65) Mourad FH, Turvill JL and Farthing MJ: Role of nitric oxide in intestinal water and electrolyte transport. *Gut* 44: 143-147, 1999.

- 66) Kuwahara A, Kuramoto H and Kadowaki M: 5-HT activates nitric oxide-generating neurons to stimulate chloride secretion in guinea pig distal colon. *Am J Physiol* 275: G829-G834, 1998.
- 67) Gershon MD: Plasticity in serotonin control mechanisms in the gut. *Curr Opin Pharmacol* 3: 600-607, 2003.
- 68) Kellum JM, Albuquerque FC, Stoner MC and Harris RP: Stroking human jejunal mucosa induces 5-HT release and Cl⁻ secretion via afferent neurons and 5-HT₄ receptors. *Am J Physiol* 277: G515-G520, 1999.
- 69) Walsh JH: Gastrointestinal hormones. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Johnson LR, Alpers DH, Christensen J, Jacobson ED and Walsh JH (eds). Raven Press, New York, pp1-128, 1994.
- 70) Goumain M, Voisin T, Lorinet AM, *et al*: The peptide YY- preferring receptor mediating inhibition of small intestinal secretion is a peripheral Y(2) receptor: pharmacological evidence and molecular cloning. *Mol Pharmacol* 60: 124-134, 2001.
- 71) Souli A, Chariot J, Voisin T, *et al*: Several receptors mediate the antisecretory effect of peptide YY, neuropeptide Y, and pancreatic polypeptide on VIP-induced fluid secretion in the rat jejunum in vivo. *Peptides* 18: 551-557, 1997.
- 72) Whang EE, Hines OJ, Reeve JR Jr, *et al*: Antisecretory mechanisms of peptide YY in rat distal colon. *Dig Dis Sci* 42: 1121-1127, 1997.

- 73) Moriya R, Shirakura T, Hirose H, Kanno T, Suzuki J and Kanatani A: NPY Y2 receptor agonist PYY(3-36) inhibits diarrhea by reducing intestinal fluid secretion and slowing colonic transit in mice. *Peptides* 31: 671-675, 2010.
- 74) Chassany O, Michaux A, Bergmann JF. Drug-induced diarrhoea. *Drug Saf* 2000;22:53-72.
- 75) Bürgel N, Bojarski C, Mankertz J, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Mechanisms of diarrhoea in collagenous colitis. *Gastroenterology* 2002;123:433-43.
- 76) John LJ, Fromm M, Schulzke JD. Epithelial barriers in intestinal inflammation. *Antioxid Redox Signal* 2011;15:1255-70.
- 77) Wildt S, Madsen JL, Rumessen JJ. Small-bowel permeability in collagenous colitis. *Scand J Gastroenterol* 2006;41:1044-49.
- 78) Khan WI and Ghia JE: Gut hormones: emerging role in immune activation and inflammation. *Clin Exp Immunol* 161: 19-27, 2010.
- 79) Yang GB and Lackner AA: Proximity between 5-HT secreting enteroendocrine cells and lymphocytes in the gut mucosa of rhesus macaques (*Macaca mulatta*) is suggestive of a role for enterochromaffin cell 5-HT in mucosal immunity. *J Neuroimmunol* 146: 46-49, 2004.
- 80) Briejer MR, Akkermans LM, Meulemans AL, Lefebvre RA and Schuurkes JA: Nitric oxide is involved in 5-HT-induced relaxations of the guinea-pig colon ascendens in vitro. *Br J Pharmacol* 107: 756-761, 1992.

- 81) Stoner MC, Scherr AM, Lee JA, Wolfe LG and Kellum JM: Nitric oxide is a neurotransmitter in the chloride secretory response to serotonin in rat colon. *Surgery* 128: 240-245, 2000.
- 82) Stoner MC and Kellum JM: Both serotonin and a nitric-oxide donor cause chloride secretion in rat colonocytes by stimulating cGMP. *Surgery* 130: 236-241, 2001.
- 83) Kadowaki M, Gershon MD and Kuwahara A: Is nitric oxide involved in 5-HT-induced fluid secretion in the gut? *Behav Brain Res* 73: 293-296, 1996.
- 84) Protic M, Jojic N, Bojic D, *et al*: Mechanism of diarrhea in microscopic colitis. *World J Gastroenterol* 11: 5535-5539, 2005.
- 85) Mostafa RM, Moustafa YM, Hamdy H. Interstitial cells of Cajal, the Maestro in health and disease. *World J Gastroenterol* 2010; 16(26): 3239-3248
- 86) Popescu LM, Gherghiceanu M, Cretoiu D, Radu E. The connective connection: interstitial cells of Cajal (ICC) and ICC-like cells establish synapses with immunoreactive cells. Electron microscope study in situ. *J Cell Mol Med.* 2005 Jul-Sep;9(3):714-30. PubMed PMID: 16202219. Streutker CJ, Huizinga JD, Driman DK, Riddell RH.
- 87) Interstitial cells of Cajal in health and disease. Part I: normal ICC structure and function with associated motility disorders. *Histopathology.* 2007 Jan;50(2):176-89. Review. PubMed PMID:17222246.

- 88) Fine KD, Meyer RL, Lee EL. The prevalence and causes of chronic diarrhea in patients with celiac sprue treated with a gluten-free diet. *Gastroenterology* 1997; 112: 1830–8.
- 89) Jakate S, Demeo M, John R, Tobin M, Keshavarzian A. Mastocytic enterocolitis: increased mucosal mast cells in chronic intractable diarrhea. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130: 362–7.
- 90) Diaz Santisteban, M. Ileitis Microscópica como causa de Diarrea Crónica. Estudio de Casos y Controles *Rev Gastroenterol Perú* 2007; 27: 310-318
- 91) Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, Houghton LA, Mearin F, Spiller RC. *Functional bowel disorders. Gastroenterology* 2006;130(5): 1480-91
- 92) Nyhlin N, Bohr J, Eriksson S, et al. Systematic review: microscopic colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;23:1525-34.
- 93) Warren BF, Edwards CM, Travis SP. 'Microscopic colitis': classification and terminology. *Histopathology*. 2002 Apr;40(4):374-6.
- 94) Robert ME. Microscopic colitis: pathologic considerations, changing dogma. *J Clin Gastroenterol*. 2004 May-Jun;38(5 Suppl 1):S18-26.
- 95) Geboes K, Villanacci V. Terminology for the diagnosis of colitis. *J Clin Pathol* 2005, 58:1133-113
- 96) Göransson C, Kumawat AK, Hultgren-Hörnqvist E, Tysk C, Eriksson S, Bohr J, Nyhlin N. Immunohistochemical characterization of lymphocytes in microscopic

colitis. J Crohns Colitis. 2013 Nov;7(10):e434-42. doi:
10.1016/j.crohns.2013.02.007. Epub 2013 Mar 19. PubMed PMID: 23523417.

97) Wang XY, Berezin I, Mikkelsen HB, Der T, Bercik P, Collins SM, Huizinga JD.
Pathology of Interstitial Cells of Cajal in relation to inflammation revealed by
ultrastructure but not immunohistochemistry. Am J Pathol. 2002; 160:1529-40.

RINGRAZIAMENTI

Al termine del mio percorso di studi, vorrei ringraziare:

- Il prof. Attilio Ignazio Lo Monte per avermi continuamente supportato e motivato nel corso dei tre anni di dottorato di ricerca
- Il prof. Giovanni Tomasello per avermi onorato della sua collaborazione scientifica e della sua amicizia
- il dott. Aroldo Gabriele Rizzo per avermi aiutato ad ottenere, grazie alla realizzazione della presente tesi, questo importante traguardo
- il dott. Giancarlo Pompei e le dott.sse Francesca Maiata e Mariella Giordano per il supporto tecnico e la collaborazione nella raccolta dei dati
- i miei colleghi di lavoro che hanno sempre assecondato il mio interesse nei confronti della ricerca
- la mia famiglia che ha da sempre sostenuto, tra gioie e dolori, il mio percorso di studi con infinito amore
- Claudia, la mia futura moglie, e la sua famiglia, per avermi sempre affiancato con amore in tutti i momenti della mia vita lavorativa, e non solo!
- i miei amici, ed in particolare Marco, Salvo, Giuseppe e Anna, Marco e Alessandra, Marta e Sergio, Paola e Giuseppe, Chiara, Leila, Georgios, Gaetano, Laura e Claudio, Irene e Valerio, Eugenio e Roberta, Maria e Daniel, Maria e Hugues, Anna e Mimmo, per aver sempre creduto in me