



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI VERONA

DIPARTIMENTO DI CHIRURGIA

SCUOLA DI DOTTORATO DI VERONA

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CHIRURGICHE E DELLE MALATTIE  
EPATOBILIARI E PANCREATICHE

Con il contributo di FONDAZIONE CARIVERONA

CICLO /ANNO (1° anno d'Iscrizione) 24°/2009

TITOLO DELLA TESI DI DOTTORATO

TRATTAMENTO DELLA PANCREATITE AUTOIMMUNE CON AZATIOPRINA:  
RISULTATI SU UNA CASISTICA PERSONALE CON VALUTAZIONE DEI POSSIBILI EFFETTI  
COLLATERALI E DELL'ASSOCIAZIONE CON MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE  
INTESTINALI.

S.S.D. MED/12

(indicare il settore scientifico disciplinare di riferimento della tesi dato obbligatorio)\*

Coordinatore: Prof. Claudio Bassi

Tutor: Prof. Luca Frulloni

Dottorando: Dott./ssa Anna Maria Katsotourchi

## TRATTAMENTO DELLA PANCREATITE AUTOIMMUNE CON AZATIOPRINA:

### RISULTATI SU UNA CASISTICA PERSONALE CON VALUTAZIONE DEI POSSIBILI EFFETTI COLLATERALI E DELL'ASSOCIAZIONE CON MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI.

La pancreatite autoimmune (AIP) è una forma particolare di malattia infiammatoria del pancreas che può coinvolgere diffusamente o focalmente il parenchima pancreatico. Sul piano anatomopatologico AIP è stata classificata in AIP tipo 1 e AIP tipo 2. La pancreatite autoimmune può essere associata con la colite ulcerosa (UC) (20-30%) e questa associazione si correla con AIP tipo 2. Circa il 30 % dei pazienti affetti da AIP va incontro ad una recidiva di malattia e le recidive sono state osservate nei pazienti con AIP tipo 1. L'utilizzo di immunosoppressori è stato suggerito come terapia della pancreatite autoimmune recidivante ma solo pochi studi che riportano l'uso della azatioprina, con limitato numero di pazienti sono stati pubblicati fino ad oggi. L'azatioprina è stata proposta come arma terapeutica per il trattamento della AIP anche se l'AZA è stata indentificata come farmaco inducente la pancreatite. Lo scopo primario di questo studio è stato di valutare molti aspetti di questa problematica. In particolare è stata valutata 1. l'efficacia della azatioprina nella pancreatite recidivante; 2. la frequenza di associazione tra AIP e UC e le diverse caratteristiche in ambito clinico, strumentale e del outcome della AIP nei pazienti con e senza UC; 3. le caratteristiche istologiche della mucosa colica dei pazienti affetti con AIP nel sospetto di una infiammazione cronica intestinale (IBD) e le caratteristiche distintive tra pazienti con AIP- IBD e pazienti IBD; 4. il rischio di pancreatite in pazienti con IBD trattati con azatioprina.

I risultati principali di questi studi permettono di formulare le seguenti conclusioni:

1. il profilo clinico e strumentale dei pazienti con AIP trattati con AZA è diverso rispetto a quello dei pazienti non trattati. Le caratteristiche distintive sono sovrapponibili con i fattori prognostici riportati in letteratura. Tuttavia è stato identificato un sottogruppo di pazienti che potrebbe trarre beneficio dalla terapia immunosoppressiva.
2. la colite ulcerosa si associa con AIP e pazienti AIP con IBD recidivano ugualmente come i pazienti senza IBD e comunque possono essere trattati con AZA
3. le caratteristiche anatomopatologiche compresa l'immunoistochimica per plasmacellule IgG4+ sulla mucosa colica dei pazienti AIP-IBD sono simili a quelle dei pazienti IBD.
4. I risultati di una revisione sistematica indicando un aumentato rischio di pancreatite nei pazienti IBD trattati con AZA. Riassumendo la definizione della pancreatite in questo studio è insufficiente e non permette nessuna conclusione definitiva.

TREATMENT OF AUTOIMMUNE PANCREATITIS WITH AZATHIOPRINE: RESULTS OF A PERSONAL SERIES AND ESTIMATION BOTH OF ADVERSE EFFECTS AND ASSOCIATION WITH INFIAMMATORY BOWEL DISEASES.

Autoimmune pancreatitis (AIP) is a particular form of inflammatory pancreatic disease that may involve diffusely or focally the pancreatic parenchyma. Pathologically, AIP has been classified in type 1 and type 2 disease. AIP may be associated with ulcerative colitis (UC) (20-30%) and this association is related to AIP type 2. About 30% of patients suffering from AIP experienced a clinical relapse of the disease, and relapses have been observed in AIP type 1. Non-steroidal immunosuppressant drugs has been suggested as treatment of relapsing AIP, but only reports with limited number of patients have been published up to now using azathioprine (AZA). AZA has been proposed in the treatment of AIP, despite AZA has been identified as a drug-inducing pancreatitis. The aim of this study has been to evaluate many aspects of this issue, particularly: 1. the efficacy of azathioprine in relapsing AIP; 2. the frequency of association between AIP and UC and differences in clinical, instrumental and outcome of AIP patients with and without UC; 3. histological findings of colon mucosa of AIP patients with suspected colon inflammation (inflammatory bowel disease – IBD) and distinctive features between AIP-IBD and IBD; 4. risk of pancreatitis in patients suffering from IBD treated with azathioprine.

The main results of these investigations seems to allow the following conclusions:

1. the clinical and instrumental profile of AIP patients treated with AZA is different compared to those not-treated. The distinctive features found are the same of prognostic factors suggested in the literature. A subgroup of patients who may benefit from immunosuppressive treatment has been identify.
2. Ulcerative colitis is associated with AIP and AIP patients with IBD relapses as well as AIP patients without IBD and therefore can be treated with AZA.
3. The pathological features, including immunohistochemistry for IgG4+ plasmacells, of colon mucosa of AIP-IBD patients is similar to those suffering from IBD.
4. The results of systematic review indicate an increased risk of pancreatitis in IBD patients treated with AZA. However, the definition of pancreatitis in this study is far too low and does not allow any definitive conclusion.

## INDICE

Introduzione .....	1
Programma di ricerca .....	12
1. Efficacia della terapia con azatioprina in pazienti affetti da pancreatite autoimmune .....	13
1.1 Scopo .....	13
1.2 Pazienti e metodi .....	13
1.3 Analisi statistica .....	16
1.4 Risultati .....	17
1.5 Discussione .....	20
2. Profili clinici dei pazienti affetti da pancreatite autoimmune Associata a colite ulcerosa .....	24
2.1 Scopo .....	24
2.2 Pazienti e metodi .....	24
2.3 Analisi statistica .....	26
2.4 Risultati .....	26
2.5 Discussione .....	30
3. Caratterizzazione istologica della mucosa del colon in pazienti affetti colite ulcerosa associata a pancreatite autoimmune confrontati con quella dei pazienti con colite ulcerosa e malattia di Crohn .....	33
3.1 Scopo .....	33
3.2 Materiali e metodi .....	33
3.3 Analisi statistica .....	36
3.4 Risultati .....	36
3.5 Discussione .....	42

4. Incidenza di pancreatite acuta in pazienti con malattia infiammatoria cronica intestinale trattati con azatioprina .....	45
4.1 Scopo .....	45
4.2 Metodi .....	45
4.2.1 Strategia di ricerca .....	45
4.2.2 Outcomes .....	47
4.2.3 Estrazione dei dati .....	47
4.2.4 Analisi statistica .....	48
4.3 Risultati .....	48
4.4 Discussione .....	54
Considerazioni finali .....	57
Ringraziamenti .....	59
Bibliografia .....	60

## INTRODUZIONE

La pancreatite cronica rappresenta una patologia infiammatoria coinvolgente il tessuto ghiandolare del pancreas che per molti anni essa è stata associata, almeno nei paesi occidentali, ad abuso alcolico, considerato per tale motivo il fattore eziologico della malattia.

Tuttavia, con il passare del tempo e con l'ausilio di sempre più sofisticate metodiche di imaging e di biologia molecolare, sembra emergere che la pancreatite cronica non sia una singola malattia, ma piuttosto l'insieme di numerose malattie, differenti tra di loro sul piano eziopatogenetico, ma agenti probabilmente con un unico meccanismo, rappresentato verosimilmente da una ostruzione su sistema duttale del pancreas<sup>1</sup>.

Tra le varie entità nosografiche di pancreatite cronica che sono state identificate su un piano clinico, radiologico e/o con metodiche di biologia molecolare, la pancreatite autoimmune rappresenta quella di maggior interesse clinico<sup>2</sup>.

## TERMINOLOGIA E CARATTERIZZAZIONE ISTOLOGICA

Come per altre “nuove” malattie pancreatiche, anche per la pancreatite autoimmune sono stati impiegati numerosi termini, quali “*primary chronic pancreatitis*”<sup>1</sup>, “*non alcoholic duct destructive chronic pancreatitis*”<sup>3</sup>, “*sclerosing pancreato-cholangitis*”<sup>4, 5</sup>, “*granulomatous pancreatitis*”<sup>6, 7</sup>, “*sclerosing pancreatitis*”<sup>8</sup>, “*lympho-plasmacytic sclerosing pancreatitis*”<sup>9</sup>, “*idiopathic fibrosing pancreatitis*”<sup>10</sup>. Anche la *pancreatite eosinofila* rappresenta probabilmente una variante della pancreatite autoimmune<sup>11, 12</sup>.

Il termine oramai universalmente utilizzato per identificare questo tipo di malattia è pancreatite autoimmune. Introdotto da Autori Giapponesi alla metà degli anni '90<sup>13</sup>, è stato scelto per la rapida e drammatica risposta di queste forme di malattia alla terapia steroidea<sup>14-19</sup>. Questa evidenza e la frequente associazione con malattie autoimmuni rappresentano le sole evidenze di una patogenesi autoimmunitaria. Recentemente, è stato identificato un anticorpo reagente contro una proteina dell'*Helicobacter Pylori* che reagirebbe anche contro strutture proteiche acinari pancreatiche (UBR2, un enzima del sistema dell'ubiquitina), con un meccanismo quindi di "*mimicry*"<sup>20</sup>. Se confermati, questo dato confermerebbe la presenza di un autoanticorpo organo-specifico e, quindi, di inquadrare definitivamente questa malattia come una patologia autoimmunitaria.

La pancreatite autoimmune si caratterizza sul piano istologico per reperti del tutto peculiari che la differenziano da tutte le altre malattie infiammatorie croniche del pancreas<sup>21, 22</sup>. In pezzi operatori di pazienti sottoposti ad intervento chirurgico demolitivo pancreatico nel sospetto di una neoplasia pancreatica, la pancreatite autoimmune si caratterizza per<sup>23, 24</sup>:

1. infiammazione linfoplasmacellulare (T>B) periduttale spesso non uniformemente coinvolgente il pancreas;
2. fibrosi di tipo storiforme e/o periduttale;
3. stenosi duttale con dilatazione a monte ed atrofia acinare secondaria;
4. coinvolgimento vascolare sia arterioso che venoso (vasculite);
5. infiammazione peripancreatica e, in alcuni casi, anche estensione peripancreatica;

6. presenza di “*granulocytic epithelial lesions*”, cioè di lesioni caratterizzate dalla presenza di cellule granulocitarie in grado di aggredire le cellule duttali pancreatiche;
7. ricco infiltrato infiammatorio di plasmacellule IgG4<sup>+</sup>.

Sulla base dei reperti istologici la malattia è stata recentemente classificata in tipo 1 (AIP tipo 1) e tipo 2 (AIP tipo 2)<sup>25</sup>. La AIP tipo 1, che si adatta alla classica descrizione della malattia osservata in Giappone<sup>13, 26</sup>, è associata con un pattern istologico conosciuto anche come “*lymphoplasmacytic sclerosing pancreatitis*” (LPSP) (Kawaguchi K et al Human Pathol 1991) e si caratterizza per la presenza di 3 reperti chiave che sono: (1) denso infiltrato linfo-plasmacellulare periduttale; (2) fibrosi storiforme e (3) vasculite obliterante<sup>27, 28</sup>.

La AIP tipo 2 è una forma di pancreatite autoimmune conosciuta anche come “*idiopathic duct-centric pancreatitis*” (IDCP)<sup>29</sup> che si caratterizza istologicamente per la presenza di “*lesioni epiteliali granulocitarie*” (GEL)<sup>30</sup>. In questa forma di pancreatite autoimmune, i granulociti neutrofili sono a volte così numerosi da formare microascessi nei lobuli e nei dotti pancreatici<sup>21, 29</sup>. Generalmente, la parete duttale è completamente infiltrata da linfociti, neutrofili e plasmacellule, con coinvolgimento dell’epitelio e del lume duttali, spesso obliterati e non più riconoscibili. Raramente si osserva una vasculite obliterante e la presenza di plasmacellule IgG4<sup>+</sup>, che sono caratteristiche preminenti della AIP tipo 1.

Tuttavia, esistono quadri di sovrapposizione, che sono stimati in almeno il 10% dei casi (dati personali in pubblicazione).

Le 2 differenti forme di pancreatite autoimmune (AIP tipo 1 e tipo 2) sembrano presentare aspetti epidemiologici differenti, riassunti nella Tabella I<sup>31-34</sup>.

Tabella I: Caratteristiche epidemiologiche ed istologiche della AIP Tipo 1 e AIP Tipo 2 AIP.

LP=linfoplasmacitaria, ICH=immunoistochimica, IBD=malattie infiammatorie croniche intestinali

	AIP Tipo 1	AIP Tipo 2
<b>Età media</b>	6° decade	4° decade
<b>Sesso</b>	prevalente maschile	Maschi = femmine
<b>Pattern istologico</b>	LPSP	ICDC
<b>Caratteristiche Istologiche</b>	infiltrato LP periduttale fibrosi storiforme vasculite obliterante	infiltrato LP GEL ostruzione duttale
<b>Plamacellule IgG4+ (ICH)</b>	+++	-/+
<b>IgG4 sieriche</b>	↑↑ 50-70%	normali
<b>Coinvolgimento multiorgano</b>	ghiandole salivari colangite fibrosi retroperitoneale nefrite	IBD

## EPIDEMIOLOGIA

La pancreatite autoimmune è una malattia apparentemente rara, con una prevalenza in Giappone stimata del 0.82/100.000 abitanti<sup>35</sup>. In un recente studio Italiano<sup>36</sup>, la frequenza di pancreatite autoimmune sembra essere circa il 5% delle pancreatiti croniche, maggiormente osservata nel sesso maschile, con una frequenza che varia dal 45 al 90% nelle varie casistiche mondiali<sup>37</sup>. Essa rappresenta fino al 10% delle masse sottoposte a resezione chirurgica nel sospetto di neoplasia pancreaticca<sup>38</sup>. Tali frequenze sono probabilmente sottostimate, sia per la mancata conoscenza della malattia che per la difficoltà nel diagnosticarla, dal momento che in letteratura non esiste ancora accordo sui criteri diagnostici e che non è stato ancora identificato un marcatore sierico di malattia.

La pancreatite autoimmune si associa con altre malattie di tipo autoimmunitario, più frequentemente del tratto gastrointestinale (malattia di Crohn, colite ulcerosa, colangite sclerosante primitiva, cirrosi biliare primitiva, sindrome di Sjögren), ma anche di tipo sistemico (connettiviti, LES, uveiti autoimmuni, tiroidite autoimmune), in percentuale variabile nel mondo nel 33-86% dei pazienti con pancreatite autoimmune<sup>37</sup>.

Tali patologie possono anche presentarsi in forma subclinica e pertanto dovrebbero andare ricercate anche in assenza di segni/sintomi clinici.

## CLASSIFICAZIONE

La pancreatite autoimmune vien classificata sia su un piano anatomico-patologico (AIP tipo 1 e tipo 2), già illustrato, che morfologico (radiologico).

Sul piano morfologico (imaging), la pancreatite autoimmune può essere classificata in una *forma diffusa* ed in una *forma focale*, che ben correlano con le manifestazioni cliniche della malattia<sup>39-42</sup>.

La forma diffusa si caratterizza sul piano radiologico con un coinvolgimento di tutta la ghiandola pancreatica, che appare ingrandita (aspetto “*sausage-like*”) ipodensa, cioè ipoperfusa, in fase arteriosa dopo somministrazione di mezzo di contrasto sia alla RM che alla TC addome, con ritenzione di mezzo di contrasto in fase venosa e tardiva.

La forma focale si caratterizza per la presenza alle indagini radiologiche di una massa pancreatica, che pone per tale motivo, problemi di diagnosi differenziale con una neoplasia pancreatica (adenocarcinoma).

La classificazione morfologica viene maggiormente utilizzata in Italia, mentre la classificazione patologica nel resto del mondo. Tale classificazione ha tuttavia importanti implicazioni diagnostiche e terapeutiche, dal momento che nelle forme diffuse è necessario differenziarla dalla pancreatite acuta ed il rischio di neoplasia è molto basso (<1%), mentre nelle forme focali, la diagnosi differenziale è con l'adenocarcinoma del pancreas ed il rischio di neoplasia è molto alto (circa il 90% dei casi)<sup>38</sup>.

L'iter diagnostico in queste forme è differente ed è mirato nelle forme focali principalmente ad escludere una neoplasia<sup>38</sup>.

## ASPETTI CLINICI

Clinicamente la malattia può presentarsi con sintomi e segni clinici di pancreatite o secondari alla presenza di una massa pancreatica, tanto che alcuni Autori definiscono la pancreatite autoimmune come “*mass-forming pancreatitis*”<sup>43-45</sup>.

In presenza di una pancreatite, il sintomo cardine è rappresentato dal dolore di tipo pancreatico, che tuttavia generalmente è lieve, può anche essere non tipico, con quadro imaging sovrapponibile a quello di una pancreatite acuta di tipo lieve-edematoso. Non infrequentemente può osservarsi persistenza di iperamilasemia anche dopo la scomparsa della sintomatologia dolorosa addominale.

In presenza di una forma focale formante massa, al contrario, la sintomatologia è più subdola, con sintomi del tutto aspecifici e, nella maggior parte dei casi, la malattia può esordire clinicamente con ittero improvviso senza dolore, ponendo importanti problemi differenziali con l'adenocarcinoma del pancreas.

Questo è il motivo per il quale spesso questi pazienti vengono sottoposti a resezione pancreatica (duodeno-cefalo-pancreasectomia) nella convinzione di essere in presenza di una neoplasia pancreatica e la diagnosi viene quindi formulata “*a posteriori*” sul pezzo operatorio.

Altri sintomi sono rappresentati dal calo ponderale associato a diabete e diarrea (steatorrea), sintomi anch'essi frequentemente osservati nei pazienti con neoplasia pancreatica. Spesso infine si osserva anche aumento del Ca 19-9 (circa nel 40-5 dei casi nella nostra casistica), che contribuisce ulteriormente a sospettare la presenza di un tumore del pancreas.

## CRITERI DI DIAGNOSI ED APPROCCIO DIAGNOSTICO

Su un piano diagnostico, la malattia dovrebbe essere sospettata nelle forme diffuse di malattia in assenza dei fattori associati alla pancreatite, quindi in particolare nelle forme idiopatiche. A contrario, nelle forme focali, la malattia dovrebbe essere sospettata in pazienti di giovane età, con storia di malattia/e autoimmune/i, senza segni di coinvolgimento vascolare a dispetto della dimensione della massa >3 cm, con bassi livelli di Ca 19-9 e con segni radiologici suggestivi di pancreatite autoimmune<sup>15, 45-49</sup>.

In presenza di una massa pancreatica e con sospetto di pancreatite autoimmune, tuttavia, merita di essere stressato il fatto che di fronte ad una lesione focale pancreatica, la probabilità di essere in presenza di un adenocarcinoma pancreatico è molto alta (90%)<sup>38</sup> e che, pertanto, bisogna prestare particolare attenzione prima di porre una diagnosi di pancreatite autoimmune. Un ritardo nell'indicazione ad un intervento chirurgico può infatti pregiudicare un approccio demolitivo della lesione, per comparsa successiva di metastasi o di coinvolgimento vascolare.

L'iter diagnostico, proprio per queste ragioni, è pertanto molto delicato per le forme focali di malattia.

Un ago-aspirato o biopsia della lesione è in questi assolutamente mandatorio in questi casi, al fine di escludere una lesione neoplastica, tenendo presente che reperti citologici od istologici negativi non devono far escludere in maniera assoluta la possibilità di essere di fronte ad una neoplasia pancreatica<sup>50</sup>.

La diagnosi di pancreatite autoimmune su un reperto citologico od istologico (biopsia) non è semplice, necessita di un patologo esperto e si ottiene solo in una percentuale relativamente bassa di casi <sup>21, 50</sup>. Pertanto, in presenza di un

quadro clinico, di reperti istologici e di un quadro radiologico suggestivi di pancreatite autoimmune, un trattamento con steroidi è indicato e rappresenta un criterio diagnostico. Tuttavia, non esistono ancora evidenze definitive né sul dosaggio più efficace né sulle modalità di scalare la terapia steroidea.

Dal momento che la terapia steroidea rappresenta un criterio diagnostico e utile per escludere definitivamente la presenza di adenocarcinoma del pancreas, un dosaggio elevato di steroidi (prednisolone 1 mg/kg/die) è auspicabile da mantenere fino al controllo radiologico dopo 2-3 settimane con la stessa metodica di imaging utilizzata prima dell'inizio del trattamento scalare, da scalare successivamente di 5 mg alla settimana fino alla sospensione.

La risposta attesa sul piano morfologico è di una completa risoluzione del quadro focale pancreatico, del miglioramento dei sintomi/segni clinici di malattia (in particolare dell'ittero), con miglioramento anche del quadro biumorale, con normalizzazione della bilirubinemia e del Ca 19-9. Una mancata o non completa risposta alla terapia steroidea impone una indicazione assoluta all'intervento chirurgico.

In presenza di una malattia diffusa, anche se la diagnosi differenziale è più "tranquilla", è indicata l'esecuzione di un agoaspirato pancreatico solo nel sospetto di linfoma pancreatico, evenienza peraltro molto rara, o di un brushing del coledoco nel sospetto di un colangiocarcinoma. La presenza di ricca componente infiammatoria, soprattutto linfociti non monoclonali, in assenza di atipie cellulari rappresenta un reperto suggestivo di pancreatite autoimmune<sup>51</sup>.

Anche nelle forme diffuse non esiste un trattamento steroideo standardizzato, anche se suggeriamo uno schema analogo a quello consigliato per la forma focale di malattia.

Recentemente, in seguito a due meeting internazionali, sono stati proposti la classificazione in AIP tipo 1 e tipo 2 di malattia<sup>52, 53</sup> ed i criteri internazionali di diagnosi (International Consensus Diagnostic Criteria – ICDC)<sup>53</sup> che definiscono i parametri per poter diagnosticare i due sottotipi di malattia.

## TERAPIA

Come già ampiamente accennato, un ciclo di terapia steroidea è estremamente efficace per la pancreatite autoimmune<sup>2, 54, 55</sup>. Nel nostro Centro viene utilizzato prednisolone somministrato al dosaggio iniziale di 1 mg/kg/die per 2–3 settimane e scalato poi di 5 mg alla settimana. La risposta alla terapia steroidea è nel 100% dei pazienti<sup>37</sup>. L'impiego dello steroide può associarsi alla comparsa di diabete che può richiedere un trattamento insulinico, soprattutto in pazienti anziani, con storia di intolleranza glucidica e con esteso coinvolgimento infiammatorio della ghiandola pancreatica<sup>56</sup>. Un attento controllo delle glicemie, soprattutto post-prandiali, dopo alcuni giorni dall'inizio della terapia steroidea è pertanto necessario. La risoluzione del quadro infiammatorio pancreatico steroideo-indotto, insieme alla riduzione del dosaggio dello steroide, generalmente implica un miglioramento del diabete e, di conseguenza, una riduzione del dosaggio insulinico. E' utile pertanto un controllo delle glicemie nei pazienti che necessitano di trattamento insulinico per il diabete steroideo-indotto.

Dopo la risoluzione del quadro infiammatorio e la sospensione dello steroide, al momento non viene ancora consigliata una terapia a lungo-termini con immunosoppressori, approccio che generalmente viene applicato in presenza di malattie a patogenesi autoimmune. Al momento tuttavia non esistono

ancora evidenze che la malattia persista alla sospensione della terapia steroidea, ma la malattia tuttavia può recidivare. Nella nostra esperienza, le recidive sono state osservate in circa il 30% dei casi<sup>57</sup>, mentre in letteratura sono riportate in percentuali variabili dal 15% al 64%<sup>37</sup>. Tale frequenza potrebbe tuttavia essere anche maggiore, dal momento che alcuni pazienti sono trattati con immuno-soppressori per le malattie autoimmuni associate alla pancreatite autoimmune.

La recidiva di malattia può essere osservata morfologicamente alle indagini radiologiche (TC o MR), in assenza di sintomi o segni clinici specifici<sup>40</sup>. Un follow-up radiologico con RM è pertanto consigliato.

Nella nostra esperienza, fattori di rischio di malattia sono rappresentati da un elevato dosaggio delle IgG4, dalla condizione di fumatore e dal coinvolgimento extra-pancreatico<sup>57</sup>, dati confermati anche in un recente lavoro Francese<sup>32</sup>.

In presenza di recidiva di malattia, soprattutto in presenza dei fattori di rischio sopra-riportati, riteniamo utile intraprendere una terapia con immuno-soppressori. L'impiego di immuno-soppressori è al momento non ancora completamente accettato, anche se l'impiego di azatioprina è stato recentemente suggerito<sup>15</sup>. Nel nostro Centro viene utilizzata azatioprina, a dosaggi di 2 mg/kg/die, anche se tale farmaco può avere come effetto collaterale la comparsa di pancreatite acuta.

## PROGRAMMA DI RICERCA

La ricerca della dott.ssa Anna Maria Katsotourchi è stata quella di studiare il trattamento della pancreatite autoimmune con azatioprina valutando i possibili effetti collaterali e l'associazione con malattie infiammatorie croniche intestinali.

Gli indirizzi specifici sono stati:

1. efficacia della terapia con azatioprina dei pazienti con pancreatite autoimmune e valutazione dell'outcome clinico;
2. profili clinici dei pazienti affetti da pancreatite autoimmune associata a colite ulcerosa confrontati con quelli senza tale patologia;
3. caratterizzazione istologica della mucosa del colon in pazienti affetti colite ulcerosa associata a pancreatite autoimmune confrontati con quella dei pazienti con colite ulcerosa e malattia di Crohn;
4. verifica metanalitica della reale incidenza di pancreatite acuta in pazienti con malattie infiammatorie croniche intestinali trattati con azatioprina.

## 1. EFFICACIA DELLA TERAPIA CON AZATIOPRINA IN PAZIENTI AFFETTI DA PANCREATITE AUTOIMMUNE

### 1.1 SCOPODELLO STUDIO

Dal momento che in letteratura sono presenti solo casistiche limitate di pazienti con pancreatite autoimmune trattati con azatioprina e non esistono linee-guida che definiscano i criteri di selezione dei pazienti da trattare, scopo di questa parte della ricerca è stato quello di valutare l'efficacia di un trattamento con azatioprina a lungo-termine in una serie di pazienti con pancreatite autoimmune, valutando le caratteristiche dei pazienti trattati vs quelli non trattati e gli effetti del trattamento.

Scopi secondari sono stati quelli di verificare gli effetti collaterali del trattamento con azatioprina e la frequenza di malattie infiammatorie croniche intestinali nel gruppo trattato vs quello non trattato.

### 1.2 PAZIENTI E METODI

Abbiamo utilizzato retrospettivamente il nostro database di pazienti affetti da pancreatite autoimmune che viene mantenuto dal 1995 e che raccoglieva 127 pazienti al Luglio 2011. Tale database contiene dati demografici, delle abitudini voluttuarie, dei segni e sintomi all'esordio della malattia, dell'imaging, del trattamento medico e chirurgico, ed è stato già utilizzato in un precedente studio<sup>58</sup>.

La diagnosi di pancreatite autoimmune si è basata sulla presenza di almeno 3 dei seguenti 4 criteri diagnostici, come precedentemente pubblicato<sup>58</sup>:

- a. suggestive immagini radiologiche (TC o RM);
- b. associazione con altre malattie autoimmunitarie (colite ulcerosa, malattia di Crohn, sindrome Sjögren, cirrosi biliare primitiva, colangite sclerosante primitiva, fibrosi retroperitoneale, tiroidite autoimmune, nefrite tubulo-interstiziale e malattia di Mikulicz);
- c. caratteristiche citologiche ed istologiche suggestive (presenza di infiltrazione linfoplasmacellulare periduttale, presenza di lesioni epiteliali da granulociti) con diagnosi di AIP e negatività per atipia epiteliale;
- d. miglioramento significativo o normalizzazione del quadro clinico e radiologico (TC o RM) (scomparsa/significativa riduzione delle dimensioni del pancreas, normalizzazione del sistema duttale pancreatico) dopo terapia steroidea.

Abbiamo quindi selezionato quelli che rispondevano ai seguenti criteri di inclusione:

- a. pazienti osservati dal 2003 in poi, dal momento che in questo anno abbiamo trattato il primo paziente con azatioprina;
- b. indicazione per pancreatite autoimmune.

Criteri di esclusione sono stati:

- a. pazienti sottoposti in precedenza ad intervento chirurgico;
- b. indicazione al trattamento per la malattia autoimmune associata;
- c. precedenti trattamenti con immunosoppressori;
- d. pazienti non trattati con steroidi;
- e. impiego di altri immunosoppressori per la pancreatite autoimmune.

Di tutti i pazienti abbiamo poi analizzato numerosi parametri epidemiologici (sesso, età all'esordio, malattie autoimmuni associate, con particolare attenzione alle malattie infiammatorie croniche intestinali, abitudini voluttuarie), clinici (sintomi e segni, con particolare attenzione alla comparsa di diabete e steatorrea, peso corporeo), biumorali (IgG4 sieriche con cut-off 135 mg/dl) strumentali (forme focali o diffuse, presenza di calcificazioni, coinvolgimento di altri organi gastrointestinali o extra-gastrointestinali) osservati sia all'esordio della malattia che durante il follow-up. Sono inoltre stati registrati i trattamenti farmacologici (steroidi, azatioprina).

La pancreatite autoimmune è stata definita recidivante in presenza di alterazioni all'imaging tipiche della malattia a livello del pancreas o delle vie biliari, indipendentemente dalla sintomatologia del paziente. In particolare, in assenza di alterazioni pancreatiche o biliari all'imaging pur in presenza di una sintomatologia clinica suggestiva, la malattia non è stata considerata recidivante.

I pazienti sono stati quindi divisi in quelli non trattati (AZA<sup>-</sup>) e trattati (AZA<sup>+</sup>) con azatioprina.

La terapia con azatioprina è stata impiegata al dosaggio di 2 mg/kg/die, ad un dosaggio iniziale di 25-50 mg/die in un'unica somministrazione, aumentata poi di 25 mg ogni 3-7 gg fino al dosaggio massimo, in assenza di sintomatologia clinica e/o alterazioni biumorali. Dopo il raggiungimento della dose target, abbiamo consigliato al paziente controlli biumorali mensili.

In caso di alterazioni biumorali dopo l'inizio della terapia con azatioprina, abbiamo ridotto il dosaggio per poi riaumentarlo alla normalizzazione degli indici biumorali. La terapia è stata interrotta solo in caso di comparsa di severi

effetti collaterali o di alterazioni bioumorali dopo aver riaumentato il dosaggio del farmaco.

Gli esami strumentali (TC e/o RM Addome) sono stati programmati senza uno schema predefinito, ma correntemente vengono effettuati prima dell'inizio del trattamento steroideo, dopo 3-4 settimane ed alla fine del trattamento. Controlli strumentali successivi vengono programmati sulla base della sintomatologia clinica e delle alterazioni degli indici bioumorali. In assenza di tali eventi, gli esami strumentali vengono eseguiti ogni 1-2 anni.

Sono stati considerati drop-out i pazienti che non hanno eseguito controlli strumentali in un intervallo di tempo superiore a 3 anni.

Il termine del follow-up è stato Luglio 2011.

### 1.3 ANALISI STATISTICA

I tests di Kruskal Wallis e Mann-Whitney U test sono stati usati per le variabili continue. Il test di Wilcoxon è stato usato per le misurazioni ripetute.

Il test del Chi quadrate è stato usato per le variabili ordinali. Il test esatto di Fisher è stato usato per variabili ordinal nel caso una cella conteneva meno di <5 in una tavola di contingenza 2x2.

Per il calcolo statistico è stato utilizzato il programma SPSS (SPSS Inc, Chicago, Ill).

#### 1.4 RISULTATI

Dal numero iniziale di 127 pazienti, sono stati selezionati 58 pazienti (39 maschi e 19 femmine, età media all'esordio della malattia  $45.8 \pm 17.1$  anni). La Tabella II riporta la numerosità ed i motivi di esclusione dallo studio.

TABELLA II: Motivi e numero dei pazienti esclusi dallo studio.

<i>Motivo di esclusione</i>	<i>N. pazienti</i>
Anno osservazione prima del 2003	38
Precedente intervento chirurgico	12
Trattati con altri immunosoppressori	10
Indicazione all'azatioprina $\neq$ AIP	2
Pazienti non trattati con steroidi	7

La Tabella III riporta le principali caratteristiche di tutti i pazienti e separati nei gruppi AZA<sup>-</sup> ed AZA<sup>+</sup>. L'età media all'esordio era significativamente minore nei pazienti del gruppo AZA<sup>-</sup> rispetto a quelli del gruppo AZA<sup>+</sup>.

L'indicazione al trattamento con azatioprina è stata data sulla base della malattia recidivante (16 pazienti) e in presenza di un marcatissimo aumento delle IgG4 alla sospensione dello steroide (1 paziente).

Le caratteristiche distintive tra i 2 gruppi sono risultate pertanto l'età, la presenza di ittero all'esordio, calo ponderale, la frequenza di malattia recidivante e il numero di recidive, le IgG4 sieriche sia in valore assoluto che percentuale di valori patologici, ed il coinvolgimento extra-pancreatico. In particolare, la frequenza di coinvolgimento biliare e renale era maggiore nel Gruppo AZA<sup>+</sup>, mentre era più frequente la presenza di IBD nel gruppo AZA<sup>-</sup>.

I 17 pazienti, prima del trattamento con azatioprina, avevano recidivato nel 94% dei casi ed il 41% aveva avuto più di una recidiva di malattia.

Il trattamento con azatioprina è stato sospeso in 1 paziente per comparsa di gravi effetti collaterali (epatite ad un mese dall'inizio della terapia, sostituzione con puritenol e comparsa di shock anafilattico dopo 1 giorno). Nessun paziente ha avuto una pancreatite acuta.

Complessivamente le recidive di pancreatite sono state osservate in 2 su 16 pazienti (12.5%) in un follow-up medio di  $2.9 \pm 1.9$  anni. La recidiva è stata osservata, rispettivamente, dopo 3 anni e dopo 1 anno dall'inizio della terapia con azatioprina. In entrambi i casi la recidiva è stata asintomatica e documentata solo sulla base di una RM. Entrambi i pazienti hanno effettuato un altro ciclo di terapia con steroidi, continuando l'azatioprina e rimanendo liberi da malattia in un follow-up di 1 e 2 anni.

TABELLA III: Caratteristiche cliniche, radiologiche e bioumorali dei pazienti arruolati nello studio.

<i>Parametri</i>	<i>Tutti</i>	<i>AZA-</i>	<i>AZA+</i>	<i>p</i>
N.	58	41	17	–
Età all'esordio ( <i>anni</i> )	45.8 ± 17.1	42 ± 18	54 ± 11	0.019
Anni follow-up	2.8 ± 2	2.7 ± 1.9	3.2 ± 2.1	ns
Fumatori	22%	23%	20%	ns
Bevitori	20%	18%	27%	ns
AIP				
<i>Focale</i>	31 (53%)	23 (56%)	8 (47%)	ns
<i>Diffusa</i>	27 (47%)	18 (44%)	9 (53%)	
Sintomi esordio				
<i>Ittero all'esordio</i>	60%	51%	82%	0.039
<i>Pancreatite acuta</i>	22%	29%	8%	ns
<i>Dimagrimento</i>	71%	61%	94%	0.022
Almeno 1 Recidiva	38%	15%	94%	<0.0001
>1 recidiva	27%	0%	41%	0.046
IgG4 sieriche (>135 mg/dl)	45% 22/49	29% 10/35	86% 12/14	<0.0001
IgG4 sieriche	390±521	289±502	644±499	<0.0001
Coinvolgimento biliare	28%	17%	53%	0.009
Coinvolgimento renale	9%	2%	23%	0.023
IBD	22%	32%	0%	0.006

## 1.5 DISCUSSIONE

Il risultato principale del presente studio è stato quello di identificare le caratteristiche cliniche, strumentali e bioumorali dei pazienti che sono stati sottoposti a trattamento con azatioprina e documentare la efficacia del farmaco. Il trattamento con azatioprina è stato intrapreso sostanzialmente per una malattia recidivante, dal momento che il 94% dei pazienti trattati con questo immunosoppressore avevano avuto almeno una recidiva e il 41% più di una recidiva.

Le caratteristiche principali che sembrano identificare i pazienti che hanno una maggiore probabilità di essere trattati con azatioprina sono l'ittero all'esordio, un aumento delle IgG4 sieriche ed una malattia sistemica coinvolgente altri organi. Tutti questi parametri sono descritti anche in letteratura come fattori prognostici di recidiva di malattia (Tabella IV). In particolare l'aumento sierico delle IgG4, soprattutto dopo il trattamento steroideo, sembra essere un fattore particolarmente associato alla recidiva di pancreatite.

Il coinvolgimento multi-organo e l'elevato valore delle IgG4 sieriche identifica i pazienti con malattia sistemica IgG4-correlata. Pertanto dai risultati del nostro studio e da quelli presenti in letteratura, possiamo ipotizzare che questi pazienti all'esordio potrebbero essere trattati con una terapia combinata steroidea ed immuno-soppressiva.

La presenza di una malattia infiammatoria cronica intestinale sembra al contrario essere un fattore protettivo per la recidiva di malattia. Tuttavia, secondo i criteri di selezione della casistica, abbiamo escluso i pazienti nei quali l'azatioprina è stata utilizzata per la malattia intestinale e questo potrebbe rappresentare un bias di selezione.

Tabella IV: Fattori predittivi di recidiva di malattia riportati in letteratura.

<i>Ref</i>	<i>N.</i>	<i>Ittero</i>	<i>sIgG4</i>	<i>OOI</i>	<i>Fumo</i>	<i>Età</i>
Frulloni L et al. <sup>58</sup>	87	–	Si	Si	Si	Si
Hirano K et al. <sup>59</sup>	23	Si	No	–	–	–
Raina A et al. <sup>60</sup>	26	–	–	Si	–	–
Kawa S. et al. <sup>61</sup>	51	–	Si	–	–	–
Sah RP et al. <sup>31</sup>	97	–	Si	Si	–	–
Kubota K et al. <sup>62</sup>	70	Si	Si	Si	–	–
Maire F et al. <sup>32</sup>	44	–	Si	Si	–	–
Takuma K et al. <sup>63</sup>	50	–	Si	Si	–	–

La terapia con azatioprina, inoltre, sembra essere efficace almeno nel breve periodo (3 anni) dal momento che solo il 16% dei pazienti ha recidivato dopo trattamento con azatioprina. Va sottolineato che quasi tutti i pazienti avevano una malattia recidivante e, quindi, abbiamo selezionato una popolazione di pazienti ad alto rischio di recidiva. Inoltre, i 2 pazienti con recidiva sono stati trattati con un nuovo ciclo di steroidi continuando il trattamento immunosoppressivo, con remissione della malattia documentata strumentalmente, e i pazienti non hanno ulteriormente recidivato in un successivo follow-up di 1 e 2 anni.

Sulla base dei dati di questo studio si potrebbe anche ipotizzare un trattamento “*ab initio*” con azatioprina. Tuttavia, l’efficacia terapeutica della azatioprina si

ottiene dopo circa 2 mesi dal suo inizio e pertanto un trattamento combinato con steroide è preferibile, dal momento che quest'ultimo si è dimostrato efficace e rapido. Esso potrebbe inoltre rappresentare una terapia "ponte" in attesa che l'azatioprina raggiunga il suo range terapeutico.

Non è stato osservato nessun caso di pancreatite acuta quale effetto collaterale della terapia con azatioprina. Come discusso nel *Paragrafo 4*, sono presenti evidenze in letteratura che l'azatioprina induca pancreatite solo in pazienti con IBD ma non in altre malattie autoimmuni<sup>64</sup>. D'altra parte una iperenzimemia pancreatica è descritta in pazienti con IBD<sup>65</sup>. Tale fenomeno, che probabilmente non rappresenta un'inflammazione della ghiandola pancreatica, ma un'alterazione biumorale il cui significato clinico è incerto.

Solo un paziente ha sospeso il trattamento con azatioprina per comparsa di una epatite acuta con marcato aumento degli indici di citolisi epatica e rechallenge positivo. Anche considerando quindi l'*intention to treat* analisi, la terapia sembra essere efficace.

I limiti del presente studio sono rappresentati principalmente dalla sua natura retrospettiva. Tali risultati dovranno essere quindi confermati con studi randomizzati prospettici, che tuttavia sono di difficile realizzazione per l'esiguo numero di pazienti diagnosticati e per la variabilità delle casistiche pubblicate in letteratura, che verosimilmente riflettono differenti criteri di diagnosi.

In conclusione, abbiamo identificato alcune caratteristiche cliniche, laboratoristiche e strumentali che sembrano differenziare i pazienti trattati con azatioprina rispetto a quelli non trattati. Alcune di queste caratteristiche si sovrappongono a fattori prognostici di recidiva di malattia già descritti in letteratura.

La possibilità di trattare questi pazienti anche in assenza di recidiva di malattia è comunque deve ancora essere confermata.

La terapia con azatioprina sembra essere efficace e ben tollerata. Studi prospettici randomizzati sono necessari per una definitiva conferma dell'uso di questo immuno-soppressore nella terapia della pancreatite autoimmune.

## 2. PROFILI CLINICI DEI PAZIENTI AFFETTI DA PANCREATITE AUTOIMMUNE ASSOCIATA A COLITE ULCEROSA.

### 2.1 SCOPO

Scopo dello studio è stato quello di valutare le caratteristiche cliniche, strumentali e bioumorali di pazienti affetti da pancreatite autoimmune associata o meno a colite ulcerosa.

### 2.2 PAZIENTI E METODI

Dal nostro database di pazienti affetti da pancreatite autoimmune che è mantenuto dal 1995, abbiamo selezionato, per lo scopo di questo lavoro, i pazienti escludendo quelli con diagnosi retrospettiva su pezzo operatorio (7 pazienti– 6.7%). Abbiamo quindi raccolto i dati demografici, quelli sul consumo alcolico e tabagico, sui i segni e sintomi clinici all'esordio della malattia, sulla sierologia, sull'imaging e sul trattamento effettuato (medico/chirurgico).

L'esordio clinico è stato considerato quello di comparsa del primo segno/sintomo clinico e/o alterazione bioumorali o strumentali che hanno portato il paziente dal medico curante od al ricovero ospedaliero.

I criteri utilizzati per la diagnosi di pancreatite autoimmune sono già stati ripostati nel Paragrafo 1 e già pubblicati precedentemente <sup>58</sup>:

I pazienti sono stati poi classificati secondo i criteri ICDC<sup>53</sup> in:

- AIP tipo 1
- AIP tipo 2
- AIP tipo NoS (*not otherwise specified*)

La diagnosi di colite ulcerosa è stata effettuata sulla base delle biopsie eseguite durante colonscopia. La colonscopia è stata effettuata in presenza di sintomi suggestivi di colite (sanguinamento rettale, diarrea) od in presenza di livelli patologici di calprotectina fecale. Biopsie seriate del colon e dell'ileo sono state effettuate in tutti i pazienti sottoposti a colonscopia.

Pancreatite autoimmune è stata classificata in forma focale (mass-forming) o diffusa sulla base del coinvolgimento del pancreas da parte del processo infiammatorio documentato con TC e/o RM prima del trattamento steroideo, come precedentemente pubblicato <sup>39, 58</sup>.

La terapia steroidea è consistita in prednisolone somministrato al dosaggio iniziale di 1 mg/kg/die per 2–3 settimane, scalato poi di 5 mg alla settimana. Immuno-soppressori non steroidei sono stati usati in pazienti con recidiva di malattia. In 1 paziente l'indicazione all'uso di immunosoppressori è stata un alto valore di IgG4 sieriche (1230 mg/dl) dopo terapia steroidea.

Durante il follow-up ogni paziente è stato sottoposto ad esami strumentali (US e/o RM e/o TC) almeno ogni 3 anni. Sono stati considerati pazienti drop-out quelli che non avevano una visita medica e indagini strumentali (US, MR or CT) per più di 3 anni consecutivi.

E' stata definite recidiva di malattia la presenza di alterazioni strutturali all'imaging (RM or TC) del pancreas suggestivi per ricorrenza di malattia o coinvolgimento del tratto intra-pancreatico biliare, indipendentemente dalla sintomatologia clinica.

### 2.3 ANALISI STATISTICA

I tests di Kruskal Wallis e Mann-Whitney U test sono stati usati per le variabili continue. Il test di Wilcoxon è stato usato per le misurazioni ripetute. Il test del Chi quadrato è stato usato per le variabili ordinali. Il test esatto di Fisher è stato usato per variabili ordinal nel caso una cella conteneva meno di <5 in una tavola di contingenza 2x2. E' stata utilizzata una curva di sopravvivenza per valutare la recidiva di pancreatite autoimmune nel gruppo AIP-UC- ed AIP-UC+. Per il calcolo statistico è stato utilizzato il programma SPSS (SPSS Inc, Chicago, Ill).

### 2.4 RISULTATI

Sono stati arruolati nello studio 123 pazienti (92 maschi e 31 femmine, età media all'esordio clinico di  $49.7 \pm 16$  anni) presenti al Maggio 2011 nel nostro database. Sono stati sottoposti a colonscopia 54 su 123 pazienti (43.9%). Una diagnosi di colite ulcerosa è stata ottenuta in 31 su 123 pazienti (25.2%). La diagnosi di colite ulcerosa è stata formulata prima dell'esordio della pancreatite autoimmune in 14 di 31 pazienti (45.2%), contemporaneamente in 8 (25.8%), mentre nei rimanenti 9 pazienti (29%) la colite ulcerosa è stata diagnosticata nel follow-up. Tutti i pazienti con una precedente diagnosi di colite ulcerosa erano in trattamento solo con mesalazina. La Tabella V riporta le caratteristiche principali dei pazienti affetti da pancreatite autoimmune con (AIP-UC+) e senza (AIP-UC-) una diagnosi definitiva di colite ulcerosa. L'età all'esordio era più giovane nel gruppo AIP-UC+ rispetto a quello AIP-UC- ( $p < 0.0001$ ). Ittero era significativamente più frequentemente osservato nel gruppo AIP-UC- ( $p = 0.008$ ), così come un aumento delle IgG4 sieriche ( $p = 0.034$ ). La frequenza

di coinvolgimento extrapancreatico non era significativamente differente nei 2 gruppi. Nel gruppo AIP-UC<sup>+</sup>, il coinvolgimento multi-organo includeva una tiroidite autoimmune (1 paziente), colangite sclerosante (1 paziente) e nefrite interstiziale (1 paziente).

La AIP tipo 1 e AIP-NoS si correlavano maggiormente con il gruppo AIP-UC<sup>-</sup> mentre la AIP tipo 2 con il gruppo AIP-UC<sup>+</sup>.

Materiale patologico era disponibile in 90 dei 123 pazienti (73%), di tipo citologico in 31 pazienti (25%), biopsie in 39 (32%) e pezzi operatori in 20 (16%). Quindi, solo 33 pazienti (27%) non sono stati sottoposti a biopsie o ad intervento chirurgico. La diagnosi istologica di AIP tipo 1 e 2 veniva effettuata solo su pezzo operatorio.

L'impiego di terapia steroidea era simile nei 2 gruppi di pazienti, mentre immuno-suppressori non steroidei sono stati usati maggiormente AIP-UC<sup>-</sup>, anche se questa differenza non raggiungeva la significatività statistica (Table I).

Ricorrenze di pancreatite autoimmune sono state osservate in 41 di 123 pazienti (33.3%), in 32 di 93 pazienti (34.4%) nel gruppo AIP-UC<sup>-</sup> ed in 9 di 30 (15.4%) nel gruppo AIP-UC<sup>+</sup> (p=Ns).

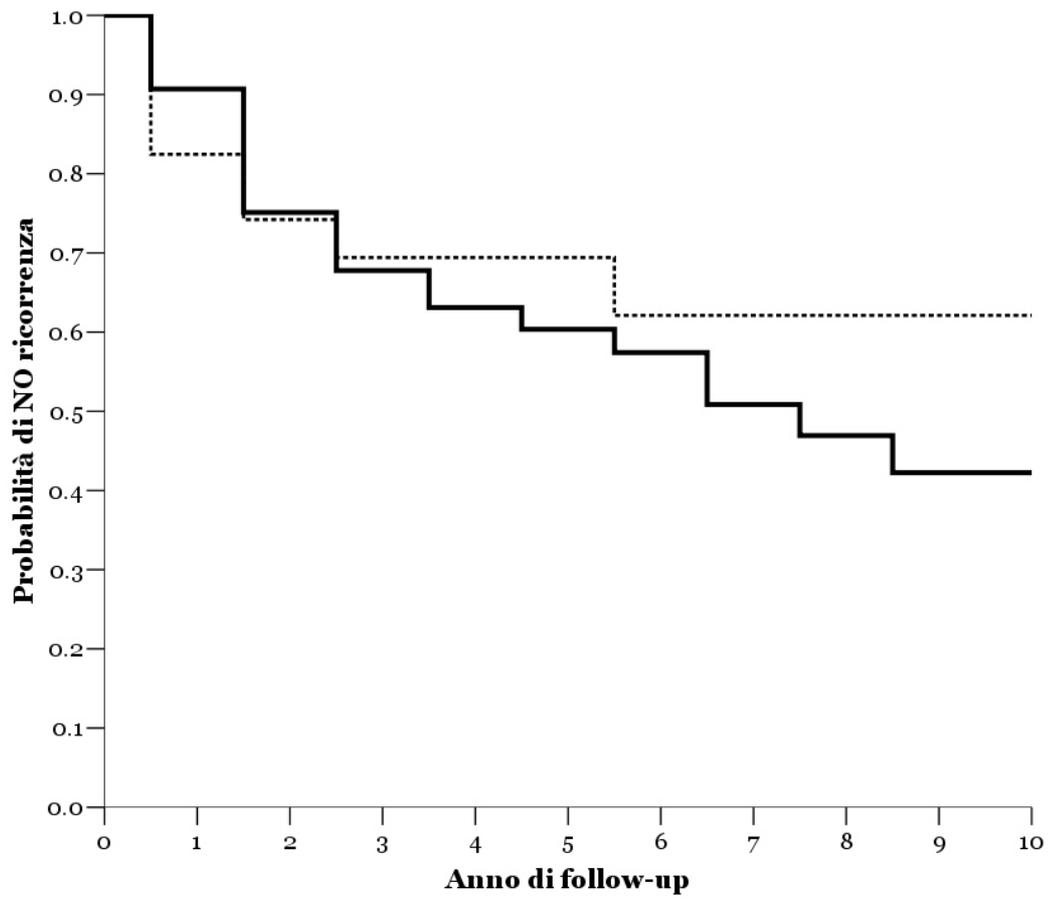
La curva di sopravvivenza per le ricorrenze di pancreatite autoimmune nei 2 gruppi è riportata nella Figure 1 (p=ns).

TABELLA V: Caratteristiche principali dei pazienti in studio. (OOI= coinvolgimento multi organo, AIP=pancreatite autoimmune, UC=colite ulcerosa)

	<i>Tutti</i>	<i>AIP-UC-</i>	<i>AIP-UC+</i>	<i>p</i>
Tutti	123	93 (75.6%)	30 (24.4%)	-
Maschi N (%)	85 (69.1%)	65 (76.5%)	20 (66.7%)	Ns
Età all'esordio ( <i>anni</i> )	49.7 ± 16	54.4 ± 14.3	36 ± 12.9	<0.0001
Durata della malattia ( <i>anni</i> )	4.6 ± 4.8	4 ± 4.3	6.5 ± 5.7	0.011
Bevitori	36 (30.3%)	26 (29.2%)	10 (33.3%)	Ns
Fumatori	35 (29.7%)	24 (27.3%)	11 (36.7%)	Ns
Estensione AIP Focale Diffusa	66 (53.7%) 57 (46.3%)	55 (59.1%) 38 (40.9%)	11 (36.7%) 19 (63.3%)	0.037
Tipo AIP Tipo 1 Tipo 2 Tipo NoS	60 (49%) 26 (21%) 37 (30%)	56 (60%) 2 (2%) 35 (38%)	4 (13%) 24 (80%) 2 (7%)	<0.0001
OOI ( <i>escluso UC</i> )	29 (23.6%)	26 (28%)	3 (10%) <sup>o</sup>	0.05
IgG4 sieriche (>135 mg/dl)	46/90 (51.1%)	40/69 (58%)	6/21 (28.6%)	0.025
Sintomi all'esordio Ittero Pancreatite Dolore pancreatico Diambrimento Steatorrea Diabete	66 (53.7%) 24 (19.5%) 13 (10.6%) 77 (62.6%) 10 (8.1%) 14 (11.4%)	60 (64.5%) 13 (14%) 8 (8.6%) 62 (66.7%) 7 (7.5%) 12 (13%)	6 (20%) 11 (36.7%) 5 (16.7%) 15 (50%) 3 (10%) 2 (6.7%)	<0.0001 0.015 Ns Ns Ns Ns
Chirurgia pancreatica	20 (16.3%)	17 (18.3%)	3 (10%)	Ns
Steroidi	93 (76.9%)	72 (79.1%)	21 (70%)	Ns
Immunosoppressori	31 (25.8%)	27 (29.3%)	4 (14.3%)	Ns
Recidiva	41 (33.3%)	32 (34.4%)	9 (30%)	Ns
1+ recidive	15/41 (36.6%)	14/32 (43.8%)	1/9 (22%)	Ns

<sup>o</sup>1 tiroidite autoimmune, 1 colangite sclerosante, 1 nefrite + neurite autoimmune

Figura 1: Curva di sopravvivenza per i pazienti con pancreatite autoimmune con (linea tratteggiata) e senza (linea continua) colite ulcerosa (p=ns).



## 2.4 DISCUSSIONE

Dai risultati del presente studio emerge che una diagnosi di colite ulcerosa è stata formulata nel 25.2% dei pazienti con diagnosi di pancreatite autoimmune. Tale frequenza, simile a quanto già pubblicato in un precedente lavoro del nostro gruppo su 87 pazienti<sup>58</sup> e in uno studio multicentrico Europeo<sup>66</sup>, indica una non causale associazione tra le due malattie, che implica a sua volta una verosimile comune patogenesi. Tale associazione è descritta nelle casistiche Americane ed Europee<sup>21, 32, 58, 67</sup>, ma non in quelle Giapponesi.

Dal momento che un quarto dei pazienti ha una colite ulcerosa associata alla pancreatite autoimmune ed una diagnosi di colite ulcerosa veniva formulata prima o contemporaneamente alla malattia pancreatica in circa il 70% di questi casi, in una parte di pazienti (17%) tale associazione permette di orientare il clinico verso una diagnosi di pancreatite autoimmune in pazienti con una pancreatite acuta o con un ittero colestatico.

Le caratteristiche distintive tra pazienti con pancreatite autoimmune associata a colite ulcerosa sembrano essere un'età più giovanile, una forma diffusa di malattia, livelli normali di IgG4, minore frequenza di ittero e maggiore frequenza di pancreatite acuta. Un tale profilo clinico, laboratoristico e strumentale permette quindi di sospettare un possibile coinvolgimento infiammatorio del colon. In questi pazienti riteniamo pertanto utile di investigare la possibile presenza di colite ulcerosa. Tuttavia, le modalità diagnostiche non sono ancora chiare. Un dosaggio della calprotectina fecale, una proteina infiammatoria dosabile nelle feci, potrebbe rappresentare un possibile test di screening per i pazienti da sottoporre poi a colonscopia in

pazienti con alvo regolare. Nei pazienti con alvo diarroico e presenza di sangue con le feci, una colonscopia è comunque indicata.

Come atteso, una diagnosi di AIP tipo 2 con i criteri internazionali ICDC<sup>53</sup> veniva formulata più frequentemente nei pazienti del gruppo AIP-UC<sup>+</sup>. Tuttavia una diagnosi di AIP tipo 1 è stata formulata in 4 pazienti del gruppo AIP-UC<sup>+</sup>. Questo dato, confermato in un recente studio multicentrico Europeo<sup>66</sup>, è difficilmente comprensibile e potrebbe essere spiegato un possibile coinvolgimento del colon da parte di una malattia IgG4 sistemica che potrebbe non essere una colite ulcerosa “classica” ma una variante simil-colite ulcerosa”. Tale aspetto verrà discusso nel Paragrafo 3.

E' rilevante il fatto che circa in un terzo dei pazienti abbiamo formulato una diagnosi di AIP indeterminata (NoS). Questo dato è spiegabile con la difficoltà di porre una diagnosi istologica di AIP tipo 1 o 2 su biopsie, che vengono routinariamente effettuate in questi pazienti. Tale diagnosi è stata formulata infatti solo su pezzi operatori. Peraltro, anche con la disponibilità del pezzo operatorio, spesso è difficile formulare una diagnosi di sottotipo di AIP. Nella consensus di Honolulu la sensibilità e specificità dei 5 patologi “top reader” nella classificazione in AIP tipo 1 e 2 era rispettivamente dell'84% e del 76% con un K agreement di 0.59 (moderate agreement)<sup>52</sup>. E' del tutto evidente che, se questa è la capacità diagnostica dei maggiori esperti nel classificare il sottotipo di pancreatite autoimmune su pezzo operatorio, la possibilità di patologi meno esperti di diagnosticare il sottotipo di pancreatite autoimmune su biopsie è molto basso. Con questi limiti, la AIP-NoS non sembra associarsi a colite ulcerosa e, quindi, potrebbe essere più probabilmente una AIP tipo 1.

Il rischio chirurgico è non statisticamente differente nei 2 gruppi e questo è spiegabile dal fatto che le forme focali, simulanti una neoplasia pancreaticca,

sono presenti in entrambi i gruppi, seppur maggiormente frequenti nel gruppo AIP-UC-.

Le recidive di pancreatite sono state osservate in maniera sovrapponibile nei 2 gruppi di pazienti sia come frequenza, sia nella curva attuariale (Figura 1). Tale dato, analogo a quello di uno studio francese<sup>32</sup>, sembra confermare che anche l'AIP tipo 2 recidiva in maniera simile a quella della tipo 1. Infatti una diagnosi di AIP tipo 2 è stata formulata maggiormente nel gruppo AIP-CU+. Il dato riportato nella casistica della Mayo Clinic secondo la quale solo l'AIP tipo 1 recidiva<sup>31</sup>, non sembra pertanto essere confermato dai nostri dati insieme a quelli Francesi. Questo sembra essere confermato dal fatto che una terapia con immuno-soppressore è del tutto sovrapponibile nei 2 gruppi di pazienti.

In conclusione, il profilo clinico dei pazienti con pancreatite autoimmune associato a colite ulcerosa è differente da quello dei pazienti senza malattia infiammatoria cronica intestinale. Tuttavia, l'outcome della malattia in termini di rischio chirurgico, recidiva di malattia e trattamento medico (steroido o immunosoppressivo) non sembra essere differente. Questo implica che è importante principalmente porre una diagnosi di malattia, per le intuibili conseguenze cliniche, piuttosto che di sottotipo di malattia (AIP tipo 1 o 2).

### 3. CARATTERIZZAZIONE ISTOLOGICA DELLA MUCOSA DEL COLON IN PAZIENTI AFFETTI COLITE ULCEROSA ASSOCIATA A PANCREATITE AUTOIMMUNE CONFRONTATI CON QUELLA DEI PAZIENTI CON COLITE ULCEROSA E MALATTIA DI CROHN

#### 3.1 SCOPO

Scopo del presente studio è stato quello di confrontare le caratteristiche istologiche di biopsie del colon in pazienti con colite ulcerosa e pancreatite autoimmune, confrontandole con quelle dei pazienti affetti da IBD (colite ulcerosa e malattia di Crohn).

#### 3.2 MATERIALI E METODI

Abbiamo studiato i pazienti affetti da pancreatite autoimmune e sottoposti a colonscopia e biopsie del colon e dell'ileo retrospettivamente selezionati dal database dell'Anatomia Patologica del Policlinico G.B. Rossi, Università di Verona e dall'Ospedale di Negrar, Verona.

La pancreatite autoimmune è stata classificata in tipo 1 e tipo 2 sulla base dei criteri diagnostici internazionali ICDC (International Consensus Diagnostic Criteria) della International Association of Pancreatology<sup>53</sup>.

Le colonscopie sono state eseguite nel sospetto di una malattia infiammatoria cronica intestinale associate a pancreatite autoimmune (diarrea ± rettorragia) oppure in presenza di elevati valori della calprotectina fecale. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a biopsie seriate del colon.

Sulla base dei reperti endoscopici, i pazienti con pancreatite autoimmune sono stati suddivisi nei seguenti gruppi:

- “normali” (gruppo AIP-N)
- “colite” in presenza di alterazioni endoscopiche suggestive di presenza di infiammazione (restringimento del lume, iperemia e fragilità della mucosa che presenta aspetto granulare, presenza di ulcerazioni ricoperte da fibrina spesso confluenti) (gruppo AIP-IBD).

Come Gruppo di controllo (gruppo C), abbiamo valutato 20 casi, comprendenti 5 casi di colite ulcerosa quiescente, 5 casi di colite ulcerosa attiva, 5 casi di malattia di Crohn del colon con granulomi e 5 casi di malattia di Crohn del colon senza granulomi.

Il materiale istologico è stato revisionato da due anatomo-patologi (G.Z. e P.C.) e, in caso di disagreement, è stato raggiunto un accordo con ulteriore terzo reviewer (A.S.). Il materiale istologico di questi pazienti è stato studiato per valutare la presenza di una malattia infiammatoria cronica intestinale. Caratteristiche suggestive di colite ulcerosa sono state considerate: distorsione ghiandolare, infiammazione della mucosa e sottomucosa, presenza di eosinofili, ascessi criptici.

Abbiamo studiato in modo particolare la presenza di una significativa infiammazione cronica associata ad infiltrato linfoplasmacellulare, suddividendo i pazienti nei seguenti gruppi:

- a. *normale*;
- b. *flogosi aspecifica*;
- c. *IBD non attiva o quiescente*;
- d. *IBD attiva*.

L'estensione della malattia infiammatoria cronica intestinale è stata inoltre distinta in:

- *rettale*: interessamento solo nel retto;
- *colon destro*: interessamento del retto e del colon di destra;
- *pancolico*: interessamento del colon sx, trasverso, discendente, sigma e retto

E' stata inoltre valutata anche la eventuale presenza di infiammazione ileale.

Un'analisi immuno-istochimica per presenza di plasmacellule IgG4+ è stata effettuata per studiare la presenza delle plasmacellule e caratterizzarle.

Tale metodica è stata eseguita con un autostainer usando un DAKO dual multimer system oppure un DAKO advance 2 stops multimer system (DAKO, Carpinteria, CA). Immunoistochimica per plasmacellule IgG4+ è stata eseguita usando anticorpi monoclonali anti-IgG4 (clone HP6025, diluzione 1:100; Zymed, San Francisco, CA) in tessuto fissato in formalina ed incluso in paraffina. L'immunoistochimica per IgG è stata eseguita utilizzando anticorpi anti-IgG policlonali di coniglio (dilution 1:10,000, DAKO, Carpinteria, CA).

Il numero totale delle IgG e delle plasmacellule IgG4+ è stato contato in 3 high-power field (magnificazione 40x corrispondente ad un area di 0.2 mm<sup>2</sup>) nell'area di maggiore densità di plasmacellule. La media di questi 3 valori determinava il più alto valore di densità delle plasmacellule IgG+ e IgG4+ /hpf per ciascun caso.

E' stato inoltre calcolato il rapporto tra il valore più alto di densità delle plasmacellule IgG4+ ed IgG+ (IgG4/IgG).

### 3.3 ANALISI STATISTICA

I tests di Kruskal Wallis e Mann-Whitney U test sono stati usati per le variabili continue. Il test di Wilcoxon è stato usato per le misurazioni ripetute.

Il test del Chi quadrate è stato usato per le variabili ordinali.

Il test di correlazione di Spearman è stato utilizzato per l'associazione tra plasmacellule IgG4<sup>+</sup> ed IgG<sup>+</sup>.

Per il calcolo statistic è stato utilizzato il programma SPSS (SPSS Inc, Chicago, Ill).

### 3.4 RISULTATI

Sono stati studiati 28 pazienti affetti da AIP (16 maschi e 12 femmine, età media  $41.6 \pm 14.3$  anni) e 20 pazienti con IBD (16 maschi, 8 femmine, età media  $41.5 \pm 14$ ) (p=ns).

La diagnosi di UC era stata formulata prima della diagnosi di AIP in 10 pazienti (50%) su 20, nello stesso anno in 5 pazienti (25%) e dopo la diagnosi di AIP in 5 pazienti (25%). La colonscopia con biopsie seriate è stata eseguita mediamente dopo  $3 \pm 4$  anni (range 0-16) dalla diagnosi di AIP, in pazienti non in trattamento steroideo. In particolare, 8 pazienti hanno eseguito la colonscopia nello stesso ricovero nel quale è stata formulata la diagnosi di AIP.

La Tabella VI riporta le caratteristiche dei pazienti con AIP, suddivisi nei gruppi AIP-N, AIP-IBD e IBD.

I reperti microscopici erano compatibili con una IBD in 3 dei 8 pazienti (37%) del gruppo AIP-N (quadro endoscopico normale), in 14 dei 20 (70%) del gruppo AIP-IBD e in tutti i 20 pazienti (100%) del gruppo IBD (p=0.0003).

Complessivamente quindi 17 pazienti del gruppo AIP su 28 (61%) hanno avuto una diagnosi finale di IBD. La Tabella VII riporta le caratteristiche microscopiche osservate nei vari gruppi.

L'estensione della malattia alle biopsie seriate del colon era solo al retto in tutti e 3 i pazienti del gruppo AIP-N con morfologia patologica (IBD quiescente o attiva), in 9 dei 14 (64%) del gruppo AIP-IBD, mentre tutti i pazienti con IBD avevano una estensione pancolica ( $p < 0.0001$ ) (Tabella VIII).

TABELLA VI: Caratteristiche principali dei pazienti con pancreatite autoimmune suddivisi sulla base dei reperti endoscopici e del gruppo di controllo IBD.

	<i>AIP-N</i>	<i>AIP-IBD</i>	<i>IBD</i>	<i>p</i>
N.	8	20	20	–
Sesso (Maschi %)	62%	55%	60%	ns
Età	49 ± 15	39 ± 13	42 ± 14	ns
Tipo di AIP				
Tipo 1	4 (50%)	4(20%)	–	<0,001
Tipo 2	0	16(80%)		
Tipo NoS	4 (50%)	0		
Estensione				
Focale	4(50%)	9(45%)	–	ns
Diffusa	4(50%)	11(55%)		

TABELLA VII: Caratteristiche microscopiche principali dei pazienti con pancreatite autoimmune suddivisi sulla base dei reperti endoscopici e del gruppo di controllo IBD.

	<i>AIP-N</i>	<i>AIP-IBD</i>	<i>IBD</i>	<i>p</i>
Normale	2 (25%)	0	0	0.003
Flogosi aspecifica	3 (37%)	6 (30%)	0	
IBD quiescente	1 (13%)	3 (15%)	5 (25%)	
IBD attiva	2 (25)	11 (55%)	15 (75%)	

TABELLA VIII: Estensione dell'infiammazione della mucosa colica nei pazienti con morfologia patologica (IBD quiescente o patologica) suddivisi nei gruppi AIP-N (3 pazienti), AIP-IBD (14 pazienti) ed IBD (20 pazienti).

	<i>AIP-N</i>	<i>AIP-IBD</i>	<i>IBD</i>	<i>p</i>
Retto	3 (100%)	9(64%)	0	<0.0001
Fino al colon dx	0	3 (22 %)	0	
Pancolica	0	2(14%)	20 (100%)	

I risultati per l'analisi immunohistochimica per la presenza di plasmacellule IgG4<sup>+</sup> ed IgG<sup>+</sup> sono riportati nella Tabella IX. La presenza di plasmacellule IgG4<sup>+</sup> (media e valore massimo) e del rapporto IgG4<sup>+</sup>/IgG<sup>+</sup> nei pazienti con AIP-IBD è risultata significativamente maggiore rispetto ai pazienti AIP-N, ma sovrapponibile a quelli con IBD. Nessuna differenza è stata osservata per la presenza di plasmacellule IgG<sup>+</sup> (media e valore massimo) nei 3 gruppi di pazienti.

TABELLA IX: Risultati della'analisi immunohistochimica per la presenza di plasmacellule IgG4<sup>+</sup> ed IgG<sup>+</sup> nei pazienti con morfologia patologica (IBD quiescente o patologica) suddivisi nei gruppi AIP-N, AIP-IBD ed IBD. \*Kruskal Wallis test  
<sup>1</sup>p=0.015 vs AIP-N Mann-Whitney U test  
<sup>2</sup>p=0.022 vs AIP-N  
<sup>3</sup>p=0.005 vs AIP-N  
<sup>4</sup>p=0.02 vs AIP-N  
<sup>5</sup>p=0.009 vs AIP-N

	<i>AIP-N</i>	<i>AIP-IBD</i>	<i>IBD</i>	<i>p</i>
<b>N.</b>	8	20	20	–
IgG4 <sup>+</sup>	2 ± 2	13 ± 12 <sup>1</sup>	16 ± 17 <sup>3</sup>	0.015
IgG4 <sup>+</sup> max	4 ± 4	18 ± 17 <sup>2</sup>	21 ± 2 <sup>4</sup>	0.042
IgG <sup>+</sup>	17 ± 11	31 ± 23	25 ± 18	Ns
IgG <sup>+</sup> max	26 ± 17	40 ± 29	31 ± 2 <sup>4</sup>	Ns
IgG4 <sup>+</sup> / IgG <sup>+</sup> (%)	16 ± 14	46 ± 43	55 ± 33 <sup>5</sup>	0.037

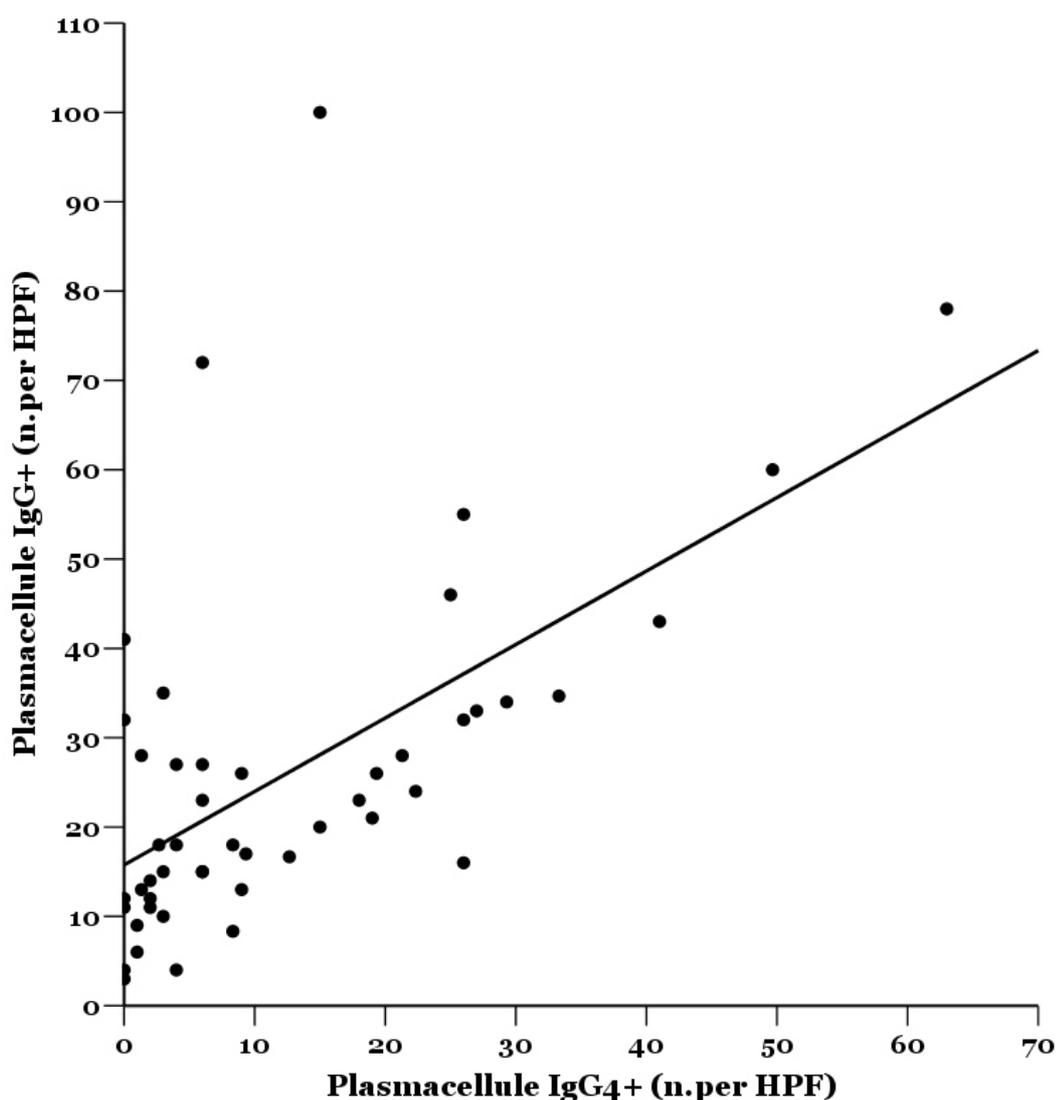
L'analisi immunohistochimica per plasmacellule IgG4<sup>+</sup> e IgG<sup>+</sup> correlava con il quadro microscopico (Tabella X). In particolare la presenza di plasmacellule IgG4 (media, valore massimo), di plasmacellule IgG<sup>+</sup> (valore medio) e del rapporto tra plasmacellule IgG4<sup>+</sup>/IgG<sup>+</sup> è risultato significativamente aumentato in presenza di una IBD attiva rispetto ad un quadro di normalità, di flogosi aspecifica e di IBD quiescente.

Tabella X: Correlazione tra quadro microscopico morfologico e immunohistochimica per plasmacellule IgG4<sup>+</sup> e IgG<sup>+</sup>.

	<i>Normale</i>	<i>Flogosi aspecific.</i>	<i>IBD quiesc</i>	<i>IBD attiva</i>	<i>p</i>
<b>N.</b>	2	9	9	28	–
IgG4 <sup>+</sup>	1.5 ± 2.1	4.7 ± 8.2	5.2 ± 4.1	18 ± 15	0.003
IgG4 <sup>+</sup> max	2 ± 2.8	7 ± 8.8	6.9 ± 4.8	24.1 ± 21.1	0.004
IgG <sup>+</sup>	23.5 ± 16.3	16.9 ± 11.9	16.4 ± 7	32.2 ± 22.8	0.04
IgG <sup>+</sup> max	31 ± 19.8	24 ± 15.5	22.9 ± 10.8	41.1 ± 29.6	Ns
IgG4 <sup>+</sup> /IgG <sup>+</sup>	4.3 ± 6.1	24.3 ± 15.5	22.9 ± 10.8	41.1 ± 37.9	0.017

Infine la presenza di plasmacellule IgG4<sup>+</sup> (media) nella mucosa colica correlava con quella delle plasmacellule IgG<sup>+</sup> (media) ( $R=0.583$  ;  $p<0.0001$ ). Anche il valore massimo delle plasmacellule IgG4<sup>+</sup> correlava con il valore massimo delle IgG<sup>+</sup> ( $R=0.555$ ;  $p<0.0001$ ) (dati non mostrati). Tali correlazione si manteneva nei pazienti con AIP ( $R=0.392$ ;  $p=0.032$ ) e IBD ( $R=0.922$   $p<0.0001$ ), anche se la retta di correlazione era maggiore nel gruppo IBD (dati non mostrati).

Figura 2: Correlazione tra valore medio delle plasmacellule IgG4<sup>+</sup> e delle plasmacellule IgG<sup>+</sup> nella mucosa colica di apzienti affetti da AIP e IBD.



### 3.5 DISCUSSIONE

Il principale risultato di questo studio è rappresentato dal fatto che plasmacellule IgG4<sup>+</sup> sono presenti nella mucosa colica di pazienti affetti da AIP indipendentemente sia dalla presenza che dal grado di infiammazione colica.

I pazienti con AIP sottoposti a colonscopia sono stati selezionati nel sospetto di una malattia infiammatoria cronica intestinale in base alla presenza di sintomi (alterazione dell'alvo tipo diarrea ± sangue) od in presenza di elevati valori della calprotectina fecale. Tale selezione può rappresentare un bias di selezione e, in mancanza di una popolazione di controlli sani, non siamo in grado di definire se in questi pazienti la presenza di una infiammazione “minima” sia secondaria ad un processo autoimmune coinvolgente il colon.

Una diagnosi di una IBD “*simil-colite ulcerosa*” è stata comunque documentata nella larga parte (61%) dei 28 pazienti del gruppo AIP. La maggioranza di questi pazienti, tuttavia, presentava un quadro macroscopico endoscopico di infiammazione.

Pertanto, in presenza di una alterazione dell'alvo e/o riscontro di valori della calprotectina fecale patologici, esiste un'elevata probabilità di diagnosticare una malattia infiammatoria cronica intestinale.

L'IBD può inoltre essere diagnosticata anche in presenza di un quadro endoscopico normale. In questi pazienti, le alterazioni istologiche erano presenti solo nel retto. Seppure il numero di 3 pazienti è limitato e non permette, quindi, di formulare ipotesi definitive, in questi pazienti biopsie del retto dovrebbero essere sufficienti per la diagnosi. Tuttavia, biopsie seriate del colon sono suggerite nel sospetto di IBD associata ad AIP per documentare l'estensione della malattia.

La presenza di alterazioni macroscopiche endoscopiche, d'altra parte, non permette da sola di fare diagnosi di IBD, dal momento che il 30% di questi pazienti avevano come diagnosi microscopica una flogosi cronica aspecifica. L'estensione dell'IBD in questi pazienti era nella maggior parte dei casi localizzata al retto (64%). Analogamente ai pazienti con quadro endoscopico nella norma, riteniamo appropriata l'esecuzione di biopsie seriate.

La presenza di plasmacellule IgG4<sup>+</sup> potrebbe essere un marcatore distintivo di coinvolgimento colico da parte di una malattia sistemica IgG4<sup>+</sup> differente dalla classica colite ulcerosa. Dai risultati del presente studio, tuttavia, plasmacellule IgG4<sup>+</sup> sono presenti sia nel gruppo AIP-IBD che nel gruppo IBD. Pertanto la presenza di tali plasmacellule non sembra essere un marcatore di malattia, quanto un marcatore di infiammazione. Questa ipotesi sembra essere confermata dal fatto che le plasmacellule IgG4<sup>+</sup> correlano con le plasmacellule IgG<sup>+</sup>, sia nel gruppo AIP che nel gruppo IBD. La maggiore correlazione tra questi differenti tipi di plasmacellule, è maggiore nel gruppo IBD, probabilmente per la maggiore infiammazione ed estensione di malattia. La correlazione che sembra osservarsi tra grado di infiammazione (assente, flogosi aspecifica, IBD quiescente ed IBD attiva) presenza di plasmacellule sembra confermare ulteriormente tale ipotesi. In particolare la maggiore presenza di tali plasmacellule è riscontrabile nell'IBD attiva, laddove l'infiammazione è maggiore.

Un discorso a parte merita di essere affrontato per il rapporto plasmacellule IgG4<sup>+</sup>/IgG<sup>+</sup>. Questo rapporto rimane basso in presenza di un quadro microscopico normale, aumenta nella flogosi aspecifica e nella IBD quiescente, in maniera sovrapponibile, mentre aumenta marcatamente nella IBD attiva. Dal momento che le plasmacellule IgG4 rappresentano un tentativo di sottoregolare

l'infiammazione, essendo stimulate dalla interleuchina 10 che è una citochina anti-infiammatoria<sup>68</sup>, un aumento del rapporto plasmacellule IgG4<sup>+</sup>/IgG<sup>+</sup> sarebbe il risultato di questo meccanismo.

A livello del colon, quindi, le plasmacellule IgG4<sup>+</sup> sembrano non rappresentare come nel pancreas e nelle vie biliare un "*hallmark*" della AIP.

Da un punto di vista diagnostico, quindi, questi risultati permettono di concludere che l'immunoistochimica per plasmacellule IgG4<sup>+</sup> non aiuta nella diagnosi differenziale tra IBD ed AIP-IBD, e, conseguentemente, nella diagnosi di AIP.

#### 4. REALE INCIDENZA DI PANCREATITE ACUTA IN PAZIENTI CON MALATTIA INFIAMMATORIA CRONICA INTESTINALE TRATTATI CON AZATIOPRINA.

##### 4.1 SCOPO

Scopo dello studio è stato quello di effettuare una revisione sistematica dei trials randomizzati per verificare se l'azatioprina è associata a pancreatite in pazienti affetti da malattie infiammatorie croniche intestinali.

Scopo secondario è stato quello di verificare la definizione di pancreatite e valutare il timing di insorgenza della pancreatite.

##### 4.2 METODI

###### 4.2.1 STRATEGIA DI RICERCA

Una ricerca computerizzata della letteratura su Medline e Cochrane database di reviews sistematiche già pubblicate sull'argomento non hanno evidenziato alcuna pubblicazione.

Nel presente studio una Ricerca per studi originali su Medline è stata effettuata fino al Giugno 2011 utilizzando i seguenti criteri di ricerca:

*(adverse effects OR side effects OR injurious effects OR undesirable effects OR pancreatitis OR Adverse Drug Event OR Adverse Drug Reaction OR Drug Safety) AND (Azathioprine OR Azathioprine Sodium Salt OR Azathioprine Sulfate OR Immuran OR Imuran OR Imurel OR 6-Mercaptopurine OR 6-Thiopurine OR 6-Thiohypoxanthine OR 6-Mercaptopurine Monohydrate OR 1,7-Dihydro-6H-purine-6-thione OR BW 57-323H OR Glaxo Wellcome Brand*

*of 6-Mercaptopurine OR GlaxoSmithKline Brand of 6-Mercaptopurine OR Leupurin OR Mercaptopurina Wellcome OR Mercaptopurine OR Puri-Nethol OR Purimethol OR Purinethol OR Wellcome Brand of 6-Mercaptopurine) AND (Crohn's Disease OR Crohns Disease OR Ileocolitis OR Ileitis, Terminal OR Ileitis, Regional OR Colitis, Granulomatous OR Enteritis, Granulomatous OR Enteritis, Regional OR Inflammatory Bowel Disease OR Bowel Diseases, Inflammatory OR Colitis, Ulcerative).*

Sono state utilizzate le seguenti limitazioni: *Humans, Clinical Trial, Randomized Controlled Trial, Clinical Trial, Phase I, Clinical Trial, Phase II, Clinical Trial, Phase III, Clinical Trial, Phase IV, Controlled Clinical Trial, English.*

Allo scopo di identificare ulteriori studi sono stati ricontrollati i lavori citati negli articoli selezionati. I titoli degli articoli selezionati in questo modo sono stati ricontrollati per accertarsi della loro validità per il presente studio. Abstracts e/o full texts di questi articoli potenzialmente rilevanti sono stati ulteriormente valutati.

I criteri di inclusione per gli studi adatti alla presente review sono stati:

- a. solo studi che hanno incluso l'outcome dei pazienti con IBD trattati con azatioprina (AZA) o 6-mercaptopurina (6MP) in trials clinici randomizzati controllati (indipendentemente dall'età dei pazienti e dal tipo di malattia – Malattia di Crohn o colite ulcerosa).
- b. solo “randomized controlled trials” che includessero almeno un braccio di trattamento con AZA o 6MP (indipendentemente dal dosaggio) ed almeno un altro braccio di trattamento con placebo o con un altro/i farmaco/i attivi. In entrambi i gruppi di trattamento sono stati permessi altri trattamenti medici.

c. solo studi che metodologicamente riportavano eventi avversi clinicamente rilevanti per il pancreas (pancreatite).

Due indipendenti reviewers (G.C. and A.M.K.) hanno valutato indipendentemente l'identificazione e la selezione degli studi e, in caso di disagreements, è stato raggiunto un accordo con ulteriore terzo reviewer (L.F.). Sono stati riportati i lavori esclusi e le ragioni per l'esclusione.

#### 4.2.2 OUTCOMES

Il tasso di pancreatite acuta è stato considerato l'outcome primario, espresso come percentuale di pazienti con pancreatite acuta nel gruppo AZA vs Gruppo controllo. La definizione di pancreatite proposta dagli Autori è stata definita come "certa" sulla base del dolore tipico, aumento degli enzimi sierici pancreatici e/o riscontro strumentale di pancreatite. La diagnosi rimaneva "incerta" quando la definizione di pancreatite non era riportata nei materiali e metodi oppure se non venivano riportati i dati clinici, laboratoristici e strumentali. E' stata valutata anche il tasso di mortalità per pancreatite acuta. Abbiamo usato 5 variabili di valutazione degli studi: tipo di studio, comprendendo disegno, tipo di malattia, monocentrico o multicentrico, periodo, dosaggio dell'AZA, durata del trattamento.

#### 4.2.3 ESTRAZIONE DEI DATI

Due reviewers (G.C e A.M.K.) indipendentemente hanno raccolto i dati da ogni studio e, in caso di disagreements, è stato raggiunto un accordo con ulteriore terzo reviewer (L.F.). Dagli studi che hanno soddisfatti i criteri di idoneità sono

stati raccolti i seguenti dati: *a)* studio: anno di pubblicazione, disegno dello studio, paese dello studio *b)* casi: malattie tipo (CD o UC), numero e fonte dei casi, periodo di arruolamento; *c)* trattamento: tipo di trattamento “attivo” +/- terapie aggiuntive per ogni braccio *d)* sono state considerati le variabile demografiche: sesso, età; *e)* monitoraggio degli enzimi pancreatici durante la terapia; *f)* altri possibili fattori che potrebbero influenzare l’outcome; *g)* durata di follow-up; *h)* percentuale di pancreatite acuta in ogni braccio e la sua definizione data dagli autori e *i)* l’outcome della pancreatite acuta.

#### 4.2.5 ANALISI STATISTICA

E’ stata effettuata una metanalisi degli studi selezionati mediante *software package MedCalc* valutando il rischio relativo (RR) con intervallo di confidenza (CI) del 95% per le variabili dicotomiche.

#### 4.3 RISULTATI

Dagli iniziali 138 studi selezionati dalla letteratura mediante la query riportata nei Materiali e Metodi, abbiamo selezionato 15 studi<sup>69-83</sup> che rispondevano ai criteri di inclusione e con sufficienti informazioni per l’analisi degli end-points del nostro studio. La Figura 3 riporta la flow chart di selezione di questi 15 lavori con i motivi di esclusione.

Le caratteristiche principali degli studi selezionati e dei pazienti sono riportate nelle Tabelle XI ed XII.

Nei 15 studi selezionati, la frequenza di pancreatite acuta nel gruppo trattato con AZA o 6-MP è stata di 17 casi su 549 (3.1%), mentre non è stata mai

osservata in 905 pazienti nel gruppo di controllo ( $p < 0.0001$ ). Il rischio relativo è risultato quindi di 57.6 (IC 3.47-956.8) ( $p = 0.0047$ ). La frequenza della pancreatite acuta nel gruppo AZA e nel gruppo di controllo nei singoli studi è riportata nella Tabella XIII.

Pancreatite acuta come evento indesiderato è stato osservato in 6 studi su 15 (40%). In due studi sono stati osservati 12 dei 17 casi (71%) di pancreatite acuta.

Pancreatite acuta “certa” è stata osservata in 7 dei 17 casi (35%), mentre rimaneva “probabile” in 11 pazienti (65%).

In nessun paziente la diagnosi di pancreatite acuta è stata confermata dalle indagini strumentali.

In 3 pazienti è stata descritta la severità della pancreatite, lieve in tutti i casi, che ha richiesto ricovero ospedaliero in 2, con degenza di 1 giorno.

Figura 3: Flow chart della selezione degli studi analizzati nella presente systematic review.

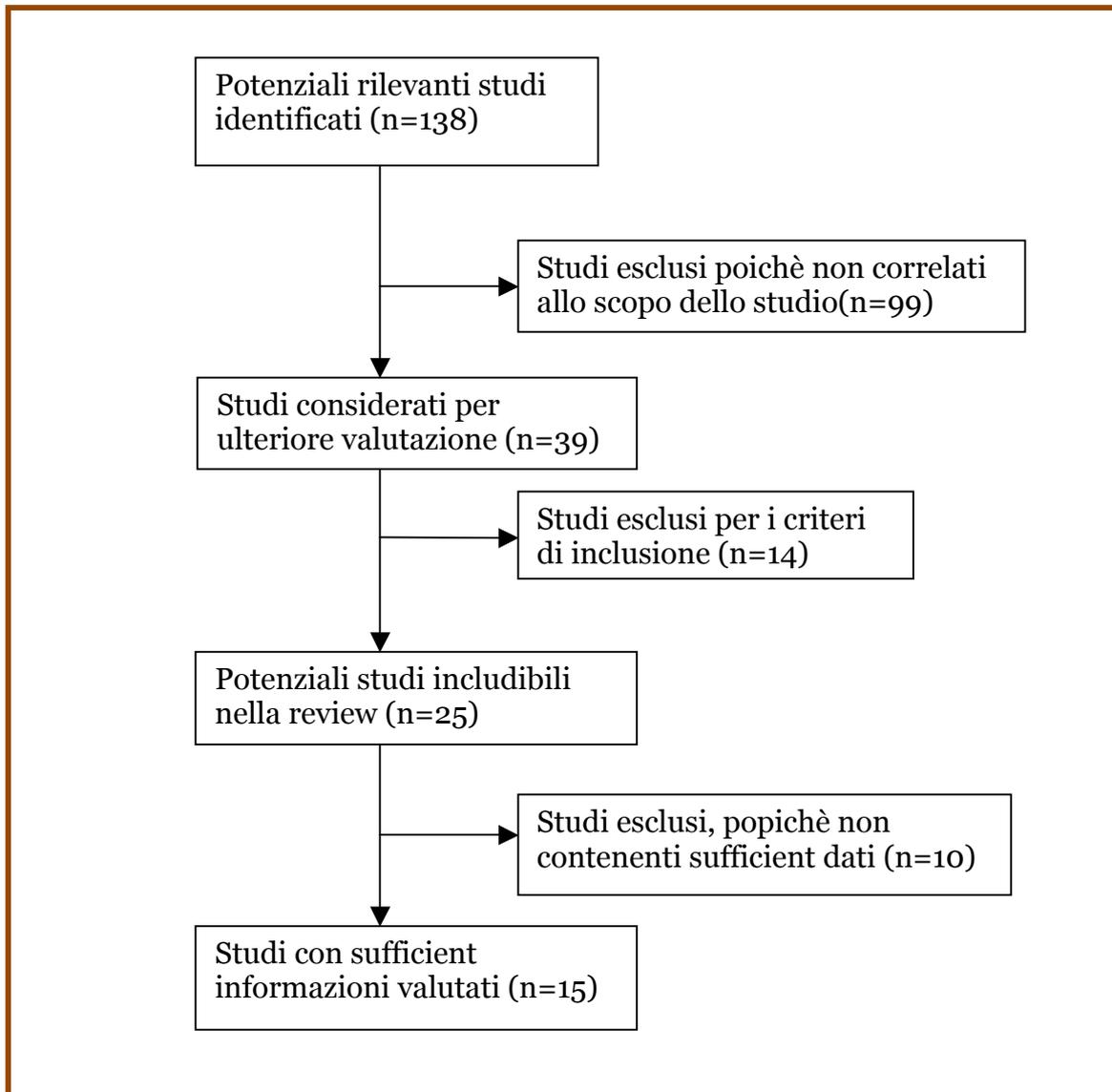


Tabella X: Caratteristiche principali dei 15 studi selezionati.

Studio	Tipo Studio	Periodo	Disegno	Tipo malattia	Comparazione	Durata	AZA o 6MP Dose	Cotrattamento
Mantzaris 2009 <sup>69</sup>	Monocentrico	1998-2001	RCT	CD	Budesonide	12 mesi	AZA 2-2.5 mg/kg/day	Nessuno
Reinisch 2010 <sup>70</sup>	Multicentrico	2002-2007	DB-DD-RCT	CD	Mesalazina	12 mesi	AZA 2-2.5 mg/kg/day	Nessuno
Reinisch 2008 <sup>71</sup>	Multicentrico	NR	DB-DD-RCT	CD	Everolimus Placebo	7 mesi	AZA 2.5 mg/kg/day	Steroidi
D'Haens 2008 <sup>72</sup>	Multicentrico	1997-2003	RCT	CD	Placebo	12 mesi	AZA 100-150 mg	Metronidazolo
Ardizzone 2006 <sup>73</sup>	Monocentrico	1997-2000	RCT	UC	5-ASA	6 mesi	AZA 2 mg/kg/day	Steroidi
Ardizzone 2003 <sup>74</sup>	Monocentrico	1997-1998	RCT	CD	Metotrexate	6 mesi	AZA 2 mg/kg/day	Steroidi
Sood 2003 <sup>75</sup>	Monocentrico	1999-2005	RCT	UC	Sulfasalazina	18 mesi	AZA 1.4-2.3 mg/kg/die	Nessuno
Sood 2000 <sup>76</sup>	Monocentrico	1993-1997	RCT	UC	Placebo	12 mesi	AZA 2mg/kg/die	Steroidi Sulfasalazina
Orth 2000 <sup>77</sup>	Monocentrico	1997-1999	RCT	UC	Micofenolato	12 mesi	AZA 2 mg/kg/day	Steroidi
Markowitz 2000 <sup>78</sup>	Multicentrico	NR	DB-RCT	CD	Placebo	18 mesi	6MP 1,5 mg/Kg	Steroidi
Neurath 1999 <sup>79</sup>	Monocentrico	1996-1997	UN-RCT	CD	Micofenolato Prednisolone	6 mesi	AZA 2.5 mg/kg	Steroidi
Candy 1995 <sup>80</sup>	Monocentrico	NR	DB-RCT	CD	Placebo	15 mesi	AZA 2.5 mg/kg	Steroidi
Ewe 1993 <sup>81</sup>	Monocentrico	1987-1990	DB-RCT	CD	Placebo	4 mesi	AZA 2.5 mg/kg	Steroidi
Present 1980 <sup>82</sup>	Monocentrico	NR	DB-RCT-CO	CD	Placebo	24 mesi	6MP 1,5 mg/Kg	Steroidi Sulfasalazina
Sturdevant 1979 <sup>83</sup>	Multicentrico	NR	DB-RCT-CO	CD	Prednisone Sulfalazine Placebo	NR	AZA 1-2,5 mg/kg	None

Legenda: RCT=trial randomizzato controllato; CD=Crohn's disease; CT=trial controllato; CO=cross-over; DB-RCT=trial doppio cieco randomizzato controllato; DD=double dummy

Tabella XI: Caratteristiche dei pazienti ed incidenza di pancreatite acuta nei 15 studi selezionati suddivisi per gruppo di trattamento

Studio	N.paz		Sesso M		Età		N.paz		Sesso M		Età		PA	
	AZA	Altro	AZA	Altro	AZA	Altro	AZA	Altro	AZA	Altro	AZA	Altro	AZA	Altro
Mantzaris 2009 <sup>69</sup>	38	39	45%	44%	34.3 (19-59)	34.5 (19-62)	38	39	45%	44%	34.3 (19-59)	34.5 (19-62)	1 (3%)	0
Reinisch 2010 <sup>70</sup>	41	37	59%	54%	35.5 ± 13.6	36 ± 10.7	41	37	59%	54%	35.5 ± 13.6	36 ± 10.7	6 (15%)	0
Reinisch 2008 <sup>71</sup>	36	38 22	44%	47% 50%	38.5 (20-62)	30(19-69) 42 (18-64)	36	38 22	44%	47% 50%	38.5 (20-62)	30(19-69) 42 (18-64)	0 0	0 0
D'Haens 2008 <sup>72</sup>	40	41	40%	51%	38.8 (22-67)	40 (21-69)	40	41	40%	51%	38.8 (22-67)	40 (21-69)	0	0
Ardizzone 2006 <sup>73</sup>	36	36	56%	53%	43 ± 14	45 ± 17	36	36	56%	53%	43 ± 14	45 ± 17	0	0
Ardizzone 2003 <sup>74</sup>	27	27	56%	48%	31 ± 10	37 ± 7	27	27	56%	48%	31 ± 10	37 ± 7	1 (3.7%)	0
Sood 2003 <sup>75</sup>	12	13	58%	61%	35.2 ± 11.4	37.2 ± 13.2	12	13	58%	61%	35.2 ± 11.4	37.2 ± 13.2	1 (8.3%)	0
Sood 2000 <sup>76</sup>	25	25	52%	36%	35.2 ± 11.4	37.2 ± 13.2	25	25	52%	36%	35.2 ± 11.4	37.2 ± 13.2	2 (8%)	0
Orth 2000 <sup>77</sup>	12	12	75%	50%	40.4 (23-71)	42.2 (23-72)	12	12	75%	50%	40.4 (23-71)	42.2 (23-72)	0	0
Markowitz 2000 <sup>78</sup>	27	28	56%	64%	13 ± 2.3	13.4 ± 2.5	27	28	56%	64%	13 ± 2.3	13.4 ± 2.5	0	0
Neurath 1999 <sup>79</sup>	30	27	NR	NR	NR	NR	30	27	NR	NR	NR	NR	0	0
Candy 1995 <sup>80</sup>	33	30	21%	37%	33.9 (15-60)	31.8 (21-62)	33	30	21%	37%	33.9 (15-60)	31.8 (21-62)	0	0
Ewe 1993 <sup>81</sup>	21	21	NR	NR	27.3 (18-43)	29.3 (18-48)	21	21	NR	NR	27.3 (18-43)	29.3 (18-48)	0	0
Present 1980 <sup>82</sup>	58	53	NR	NR	NR	NR	58	53	NR	NR	NR	NR	1 (1.7%)	0
Sturdevant 1979 <sup>83</sup>	113	456	NR	NR	NR	NR	113	456	NR	NR	NR	NR	5 (4.4%)	0

Tabella XII: Dati clinici dei casi di pancreatite acuta osservati nei pazienti trattati con AZA o 6MP.

Caso	Studio	Sesso	Età	Timing PA	Imaging	Dolore	Severità PA	Ricovero	Degenza
1	Mantzaris 2009 <sup>69</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Reinisch 2010 <sup>70</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Reinisch 2010 <sup>70</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
4	Reinisch 2010 <sup>70</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
5	Reinisch 2010 <sup>70</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
6	Reinisch 2010 <sup>70</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
7	Reinisch 2010 <sup>70</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
8	Ardizzone 2003 <sup>74</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
9	Sood 2003 <sup>75</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
10	Sood 2000 <sup>76</sup>	-	-	-	-	-	Lieve	Si	1 gg
11	Sood 2000 <sup>76</sup>	-	-	-	-	-	Lieve	Si	1 gg
12	Present 1980 <sup>82</sup>	-	-	30 gg	-	Si	Lieve	-	-
13	Sturdevant 1979 <sup>83</sup>	M	30	15 gg	-	Si	-	-	-
14	Sturdevant 1979 <sup>83</sup>	F	29	13 gg	-	Si	-	-	-
15	Sturdevant 1979 <sup>83</sup>	M	24	18 gg	-	Si	-	-	-
16	Sturdevant 1979 <sup>83</sup>	M	23	16 gg	-	Si	-	-	-
17	Sturdevant 1979 <sup>83</sup>	M	37	21 gg	-	Si	-	-	-
18	Sturdevant 1979 <sup>83</sup>	F	32	17 gg	-	Si	-	-	-

#### 4.4 DISCUSSIONE

Dai risultati della presente revisione sistematica, non è possibile concludere che il trattamento con AZA o 6-MP nei pazienti con IBD aumenta il rischio di pancreatite.

Esistono dati in letteratura che mostrano come il rischio di questi farmaci nell'indurre pancreatite è aumentato nei pazienti trattati con indicazione IBD ma non con indicazione per altre patologie autoimmuni (artrite reumatoide, lupus eritematosus sistemico, epatite autoimmune, granulomatosi di Wegener)<sup>64</sup>.

Scopo dello studio è stato quello di valutare la incidenza di pancreatite in pazienti trattati con azatioprina per IBD, che risulta effettivamente aumentata. Tuttavia, nonostante abbiamo selezionato studi randomizzati controllati nell'ipotesi che la diagnosi di pancreatite fosse corretta, la definizione della pancreatite acuta come evento avverso è risultata largamente insufficiente. In nessun studio infatti la pancreatite acuta è confermata con l'imaging. Inoltre, nei pochi studi che riportano meglio le caratteristiche di questi pazienti, la diagnosi si basa esclusivamente sulla sintomatologia e sull'aumento degli enzimi sierici<sup>82, 83</sup>. Va sottolineato comunque che la patologia di base (malattia di Crohn) di per sé può manifestarsi clinicamente con dolore addominale e che l'iperenzimemia pancreatica asintomatica è stata riscontrata nelle IBD<sup>65</sup>. Caratteristicamente, negli studi dove la diagnosi si basa anche sul dolore, sono stati studiati pazienti affetti da malattia di Crohn.

Un altro dato discrepante è la durata della degenza di solo 1 giorno, nei pochi casi nei quali questa veniva descritta<sup>76</sup>. Tale dato è completamente divergente da quello osservato nella pratica clinica, dove pazienti con pancreatite acuta

lieve necessitano di una degenza media di circa 13 giorni (studio ProInf-AISP)<sup>84</sup> e che comunque i pazienti non vengono dimessi prima di 3-4 giorni.

Inoltre, i casi di pancreatite sono descritti in meno della metà degli studi (7 su 15) e la maggior parte dei casi con pancreatite acuta sono descritti in 2 di questi 7 studi (11 pazienti dei 18 complessivi). In particolare, lo studio di Sturdevant et al.<sup>83</sup> che è quello che ha descritto la maggior dei casi è del 1979, un periodo nel quale le metodiche di imaging erano limitate e, quelle disponibili (US e TC), erano state da poco introdotte nella pratica clinica e non disponibili ancora diffusamente.

Tutti questi aspetti, fanno ipotizzare che la larga parte dei pazienti con pancreatite indotta da AZA o 6-MP possano non avere avuto una pancreatite acuta. Come ipotesi alternativa, è possibile che alcuni di questi pazienti possano avere avuta una pancreatite autoimmune, al tempo non ancora riconosciuta, dal momento che è stata descritta nel 1995 e la cui conoscenza si è diffusa dopo il 2005. Solo lo studio di Reinish et al.<sup>79</sup> ha parzialmente arruolato pazienti dopo il 2005. Dal momento che il range terapeutico con AZA o 6-MP si ottiene generalmente dopo 2 mesi e che la pancreatite acuta azatioprina-indotta è descritta nel primo mese<sup>85</sup>, è anche possibile che la pancreatite possa essere non un effetto collaterale, ma una associazione tra IBD e pancreatite (autoimmune). Sarebbe auspicabile un nuovo studio prospettico multicentrico che chiarisca definitivamente il rischio di pancreatite in pazienti affetti da IBD trattati con AZA o 6-MP, tenendo presenti tutte queste considerazioni.

Sul piano pratico, quindi, la azatioprina non può essere un farmaco controindicato nel trattamento della AIP per l' aumentato rischio di pancreatite. Dai risultati del nostro studio (vedi Paragrafo 1.), anche con la limitazione del

numero limitato di pazienti, infatti nessuno dei pazienti con pancreatite autoimmune trattato con AZA ha sviluppato una pancreatite acuta.

## 5. CONSIDERAZIONI FINALI

La pancreatite autoimmune rappresenta a tuttoggi una patologia di difficile inquadramento diagnostico ed approccio terapeutico. Infatti, il trattamento steroideo si è dimostrato efficace nella terapia a breve termine, ma non è in grado di prevenire le recidive di malattia.

Esiste quindi una sottopopolazione di pazienti che necessita di un trattamento con immunosoppressori.

Le caratteristiche cliniche, bioumorali e strumentali di questa sottopopolazione di pazienti a rischio di recidiva sembrano essere rappresentate dall'età avanzata, dall'ittero all'esordio, dall'aumento delle IgG4 sieriche e dalla presenza di una malattia sistemica coinvolgente altri organi, che sembrano quindi rappresentare dei fattori prognostici di recidiva.

In questi pazienti, un trattamento con immunosoppressori è indicato. L'azatioprina sembra essere il trattamento di scelta, sia dai risultati del nostro studio, sia da quelli riportati in letteratura.

L'uso dell'azatioprina sembra non esporre a maggior rischio di pancreatite, almeno nella casistica da noi riportata e da quelle presenti in letteratura.

La revisione metanalitica degli studi sul rischio di pancreatite nei pazienti con IBD trattati con azatioprina, ci permette di non affermare in maniera definitiva che la pancreatite acuta sia un evento avverso in questa popolazione di pazienti. E' al contrario, più verosimile che possa trattarsi di iperenzime pancreatiche o, forse, espressione di un coinvolgimento autoimmune del pancreas.

Infine il profilo clinico della pancreatite autoimmune associata a colite ulcerosa è differente da quello dei pazienti senza tale patologia. Le recidive di malattia sembrano essere non differenti in maniera significativa in questi due gruppi di

pazienti. Pertanto, la presenza di colite ulcerosa non è un criterio per non trattare questi pazienti. Dal momento che la pancreatite autoimmune associata a colite ulcerosa è nella maggior parte dei pazienti di tipo 2, anche questa forma di malattia può giovare di un trattamento con immunosoppressori.

Studi prospettici multicentrici sono tuttavia necessari al fine di rendere le conclusioni della nostra ricerca definitive.

## RINGRAZIAMENTI

## BIBLIOGRAFIA

1. Cavallini G. Is chronic pancreatitis a primary disease of the pancreatic ducts? A new pathogenetic hypothesis. *Ital J Gastroenterol* 1993;25:391-6.
2. Finkelberg DL, Sahani D, Deshpande V, et al. Autoimmune pancreatitis. *N Engl J Med* 2006;355:2670-6.
3. Ectors N, Maillet B, Aerts R, et al. Non-alcoholic duct destructive chronic pancreatitis. *Gut* 1997;41:263-8.
4. Erkelens GW, Vleggaar FP, Lesterhuis W, et al. Sclerosing pancreato-cholangitis responsive to steroid therapy. *Lancet* 1999;354:43-4.
5. Horiuchi A, Kawa S, Hamano H, et al. Sclerosing pancreato-cholangitis responsive to corticosteroid therapy: report of 2 case reports and review. *Gastrointest Endosc* 2001;53:518-22.
6. Sturmer J, Becker V. Granulomatous pancreatitis--granulomas in chronic pancreatitis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1987;410:327-38.
7. Essop AR, Posen J, Segal I, et al. Isolated granulomatous pancreatitis. *J Clin Gastroenterol* 1984;6:61-4.
8. Hamano H, Kawa S, Horiuchi A, et al. High serum IgG4 concentrations in patients with sclerosing pancreatitis. *N Engl J Med* 2001;344:732-8.
9. Ajisaka H, Fujita H, Kaji M, et al. Lymphoplasmacytic sclerosing pancreatocholangitis successfully treated by pancreatoduodenectomy. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002;9:522-6.
10. Nve E, Ribe D, Navines J, et al. Idiopathic fibrosing pancreatitis associated with ulcerative colitis. *HPB (Oxford)* 2006;8:153-5.
11. Abraham SC, Leach S, Yeo CJ, et al. Eosinophilic pancreatitis and increased eosinophils in the pancreas. *Am J Surg Pathol* 2003;27:334-42.
12. Barthet M, Hastier P, Buckley MJ, et al. Eosinophilic pancreatitis mimicking pancreatic neoplasia: EUS and ERCP findings--is nonsurgical diagnosis possible? *Pancreas* 1998;17:419-22.
13. Yoshida K, Toki F, Takeuchi T, et al. Chronic pancreatitis caused by an autoimmune abnormality. Proposal of the concept of autoimmune pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1995;40:1561-8.
14. Araki J, Tsujimoto F, Ohta T, et al. Natural course of autoimmune pancreatitis without steroid therapy showing hypoechoic masses in the uncinata process and tail of the pancreas on ultrasonography. *J Ultrasound Med* 2006;25:1063-7.

15. Church NI, Pereira SP, Deheragoda MG, et al. Autoimmune pancreatitis: clinical and radiological features and objective response to steroid therapy in a UK series. *Am J Gastroenterol* 2007;102:2417-25.
16. Czako L, Hegykozi E, Palinkas A, et al. Autoimmune pancreatitis: functional and morphological recovery after steroid therapy. *World J Gastroenterol* 2006;12:1810-2.
17. Ghazale A, Chari ST. Optimising corticosteroid treatment for autoimmune pancreatitis. *Gut* 2007;56:1650-2.
18. Hong SP, Park SW, Chung JP, et al. Autoimmune pancreatitis with effective steroid therapy. *Yonsei Med J* 2003;44:534-8.
19. Ito T, Nakano I, Koyanagi S, et al. Autoimmune pancreatitis as a new clinical entity. Three cases of autoimmune pancreatitis with effective steroid therapy. *Dig Dis Sci* 1997;42:1458-68.
20. Frulloni L, Lunardi C, Simone R, et al. Identification of a novel antibody associated with autoimmune pancreatitis. *N Engl J Med* 2009;361:2135-42.
21. Zamboni G, Luttges J, Capelli P, et al. Histopathological features of diagnostic and clinical relevance in autoimmune pancreatitis: a study on 53 resection specimens and 9 biopsy specimens. *Virchows Arch* 2004;445:552-63.
22. Kloppel G, Detlefsen S, Chari ST, et al. Autoimmune pancreatitis: the clinicopathological characteristics of the subtype with granulocytic epithelial lesions. *J Gastroenterol* 2010;45:787-93.
23. Zamboni G, Luttges J, Capelli P, et al. Histopathological features of diagnostic and clinical relevance in autoimmune pancreatitis: a study on 53 resection specimens and 9 biopsy specimens. *Virchows Arch* 2004.
24. Kloppel G, Luttges J, Lohr M, et al. Autoimmune pancreatitis: pathological, clinical, and immunological features. *Pancreas* 2003;27:14-9.
25. Park DH, Kim MH, Chari ST. Recent advances in autoimmune pancreatitis. *Gut* 2009;58:1680-9.
26. Okazaki K, Chiba T. Autoimmune related pancreatitis. *Gut* 2002;51:1-4.
27. Kamisawa T. IgG4-positive plasma cells specifically infiltrate various organs in autoimmune pancreatitis. *Pancreas* 2004;29:167-8.
28. Zhang L, Notohara K, Levy MJ, et al. IgG4-positive plasma cell infiltration in the diagnosis of autoimmune pancreatitis. *Mod Pathol* 2007;20:23-8.
29. Notohara K, Burgart LJ, Yadav D, et al. Idiopathic chronic pancreatitis with periductal lymphoplasmacytic infiltration: clinicopathologic features of 35 cases. *Am J Surg Pathol* 2003;27:1119-27.

30. Kloppel G. Chronic pancreatitis, pseudotumors and other tumor-like lesions. *Mod Pathol* 2007;20 Suppl 1:S113-31.
31. Sah RP, Chari ST, Pannala R, et al. Differences in clinical profile and relapse rate of type 1 versus type 2 autoimmune pancreatitis. *Gastroenterology* 2010;139:140-8; quiz e12-3.
32. Maire F, Le Baleur Y, Rebours V, et al. Outcome of patients with type 1 or 2 autoimmune pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2011;106:151-6.
33. Song TJ, Kim JH, Kim MH, et al. A comparison of clinical findings between histologically confirmed type 1 and type 2 autoimmune pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2011.
34. Zhang L, Chari S, Smyrk TC, et al. Autoimmune pancreatitis (AIP) type 1 and type 2: an international consensus study on histopathologic diagnostic criteria. *Pancreas* 2011;40:1172-9.
35. Nishimori I, Tamakoshi A, Otsuki M. Prevalence of autoimmune pancreatitis in Japan from a nationwide survey in 2002. *J Gastroenterol* 2007;42 Suppl 18:6-8.
36. Frulloni L, Gabbriellini A, Pezzilli R, et al. Chronic pancreatitis: report from a multicenter Italian survey (PanCroInfAISP) on 893 patients. *Dig Liver Dis* 2009;41:311-7.
37. Kamisawa T, Chari ST, Giday SA, et al. Clinical profile of autoimmune pancreatitis and its histological subtypes: an international multicenter survey. *Pancreas* 2011;40:809-14.
38. Frulloni L, Amodio A, Katsotourchi AM, et al. A practical approach to the diagnosis of autoimmune pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2011;17:2076-9.
39. Manfredi R, Graziani R, Cicero C, et al. Autoimmune pancreatitis: CT patterns and their changes after steroid treatment. *Radiology* 2008;247:435-43.
40. Manfredi R, Frulloni L, Mantovani W, et al. Autoimmune pancreatitis: pancreatic and extrapancreatic MR imaging-MR cholangiopancreatography findings at diagnosis, after steroid therapy, and at recurrence. *Radiology* 2011;260:428-36.
41. Rehnitz C, Klauss M, Singer R, et al. Morphologic patterns of autoimmune pancreatitis in CT and MRI. *Pancreatol* 2011;11:240-51.
42. Liang W, Xu S. Radiologic evaluation of autoimmune pancreatitis. *Radiology* 2012;262:731-2; author reply 732.
43. Chang WI, Kim BJ, Lee JK, et al. The clinical and radiological characteristics of focal mass-forming autoimmune pancreatitis: comparison with chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Pancreas* 2009;38:401-8.

44. D'Onofrio M, Zamboni G, Tognolini A, et al. Mass-forming pancreatitis: value of contrast-enhanced ultrasonography. *World J Gastroenterol* 2006;12:4181-4.
45. Lee H, Lee JK, Kang SS, et al. Is there any clinical or radiologic feature as a preoperative marker for differentiating mass-forming pancreatitis from early-stage pancreatic adenocarcinoma? *Hepatogastroenterology* 2007;54:2134-40.
46. Kamisawa T, Egawa N, Nakajima H, et al. Comparison of radiological and histological findings in autoimmune pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 2006;53:953-6.
47. Furukawa N, Muranaka T, Yasumori K, et al. Autoimmune pancreatitis: radiologic findings in three histologically proven cases. *J Comput Assist Tomogr* 1998;22:880-3.
48. Yang DH, Kim KW, Kim TK, et al. Autoimmune pancreatitis: radiologic findings in 20 patients. *Abdom Imaging* 2006;31:94-102.
49. Procacci C, Carbognin G, Biasiutti C, et al. Autoimmune pancreatitis: possibilities of CT characterization. *Pancreatology* 2001;1:246-53.
50. Bang SJ, Kim MH, Kim do H, et al. Is pancreatic core biopsy sufficient to diagnose autoimmune chronic pancreatitis? *Pancreas* 2008;36:84-9.
51. Kloppel G, Sipos B, Zamboni G, et al. Autoimmune pancreatitis: histo- and immunopathological features. *J Gastroenterol* 2007;42 Suppl 18:28-31.
52. Chari ST, Kloppel G, Zhang L, et al. Histopathologic and clinical subtypes of autoimmune pancreatitis: the honolulu consensus document. *Pancreatology* 2010;10:664-72.
53. Shimosegawa T, Chari ST, Frulloni L, et al. International consensus diagnostic criteria for autoimmune pancreatitis: guidelines of the International Association of Pancreatology. *Pancreas* 2011;40:352-8.
54. Kamisawa T, Shimosegawa T, Okazaki K, et al. Standard steroid treatment for autoimmune pancreatitis. *Gut* 2009;58:1504-7.
55. Pannala R, Chari ST. Corticosteroid treatment for autoimmune pancreatitis. *Gut* 2009;58:1438-9.
56. Frulloni L, Scattolini C, Katsotourchi AM, et al. Exocrine and endocrine pancreatic function in 21 patients suffering from autoimmune pancreatitis before and after steroid treatment. *Pancreatology* 2010;10:129-33.
57. Frulloni L, Scattolini C, Falconi M, et al. Autoimmune pancreatitis: differences between the focal and diffuse forms in 87 patients. *Am J Gastroenterol* 2009;in press.

58. Frulloni L, Scattolini C, Falconi M, et al. Autoimmune pancreatitis: differences between the focal and diffuse forms in 87 patients. *Am J Gastroenterol* 2009;104:2288-94.
59. Hirano K, Tada M, Isayama H, et al. Long-term prognosis of autoimmune pancreatitis with and without corticosteroid treatment. *Gut* 2007;56:1719-24.
60. Raina A, Yadav D, Krasinskas AM, et al. Evaluation and management of autoimmune pancreatitis: experience at a large US center. *Am J Gastroenterol* 2009;104:2295-306.
61. Kawa S, Hamano H, Ozaki Y, et al. Long-term follow-up of autoimmune pancreatitis: characteristics of chronic disease and recurrence. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009;7:S18-22.
62. Kubota K, Watanabe S, Uchiyama T, et al. Factors predictive of relapse and spontaneous remission of autoimmune pancreatitis patients treated/not treated with corticosteroids. *J Gastroenterol* 2011;46:834-42.
63. Takuma K, Kamisawa T, Tabata T, et al. Short-term and long-term outcomes of autoimmune pancreatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011;23:146-52.
64. Weersma RK, Peters FT, Oostenbrug LE, et al. Increased incidence of azathioprine-induced pancreatitis in Crohn's disease compared with other diseases. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;20:843-50.
65. Frulloni L, Patrizi F, Bernardoni L, et al. Pancreatic hyperenzymemia: clinical significance and diagnostic approach. *JOP* 2005;6:536-51.
66. Detlefsen S, Zamboni G, Frulloni L, et al. Clinical features and relapse rates after surgery in type 1 autoimmune pancreatitis differ from type 2: a study of 114 surgically treated European patients. *Pancreatol* 2012;in press.
67. Ravi K, Chari ST, Vege SS, et al. Inflammatory bowel disease in the setting of autoimmune pancreatitis. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:1326-30.
68. Frulloni L, Lunardi C. Serum IgG4 in autoimmune pancreatitis: a marker of disease severity and recurrence? *Dig Liver Dis* 2011;43:674-5.
69. Mantzaris GJ, Christidou A, Sfakianakis M, et al. Azathioprine is superior to budesonide in achieving and maintaining mucosal healing and histologic remission in steroid-dependent Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:375-82.
70. Reinisch W, Angelberger S, Petritsch W, et al. Azathioprine versus mesalazine for prevention of postoperative clinical recurrence in patients with Crohn's disease with endoscopic recurrence: efficacy and safety results of a randomised, double-blind, double-dummy, multicentre trial. *Gut* 2010;59:752-9.

71. Reinisch W, Panes J, Lemann M, et al. A multicenter, randomized, double-blind trial of everolimus versus azathioprine and placebo to maintain steroid-induced remission in patients with moderate-to-severe active Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2008;103:2284-92.
72. D'Haens GR, Vermeire S, Van Assche G, et al. Therapy of metronidazole with azathioprine to prevent postoperative recurrence of Crohn's disease: a controlled randomized trial. *Gastroenterology* 2008;135:1123-9.
73. Ardizzone S, Maconi G, Russo A, et al. Randomised controlled trial of azathioprine and 5-aminosalicylic acid for treatment of steroid dependent ulcerative colitis. *Gut* 2006;55:47-53.
74. Ardizzone S, Bollani S, Manzionna G, et al. Comparison between methotrexate and azathioprine in the treatment of chronic active Crohn's disease: a randomised, investigator-blind study. *Dig Liver Dis* 2003;35:619-27.
75. Sood A, Midha V, Sood N, et al. Azathioprine versus sulfasalazine in maintenance of remission in severe ulcerative colitis. *Indian J Gastroenterol* 2003;22:79-81.
76. Sood A, Midha V, Sood N, et al. Role of azathioprine in severe ulcerative colitis: one-year, placebo-controlled, randomized trial. *Indian J Gastroenterol* 2000;19:14-6.
77. Orth T, Peters M, Schlaak JF, et al. Mycophenolate mofetil versus azathioprine in patients with chronic active ulcerative colitis: a 12-month pilot study. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1201-7.
78. Markowitz J, Grancher K, Kohn N, et al. A multicenter trial of 6-mercaptopurine and prednisone in children with newly diagnosed Crohn's disease. *Gastroenterology* 2000;119:895-902.
79. Neurath MF, Wanitschke R, Peters M, et al. Randomised trial of mycophenolate mofetil versus azathioprine for treatment of chronic active Crohn's disease. *Gut* 1999;44:625-8.
80. Candy S, Wright J, Gerber M, et al. A controlled double blind study of azathioprine in the management of Crohn's disease. *Gut* 1995;37:674-8.
81. Ewe K, Press AG, Singe CC, et al. Azathioprine combined with prednisolone or monotherapy with prednisolone in active Crohn's disease. *Gastroenterology* 1993;105:367-72.
82. Present DH, Korelitz BI, Wisch N, et al. Treatment of Crohn's disease with 6-mercaptopurine. A long-term, randomized, double-blind study. *N Engl J Med* 1980;302:981-7.
83. Sturdevant RA, Singleton JW, Deren JL, et al. Azathioprine-related pancreatitis in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1979;77:883-6.

84. Cavallini G, Frulloni L, Bassi C, et al. Prospective multicentre survey on acute pancreatitis in Italy (ProInf-AISP): results on 1005 patients. *Dig Liver Dis* 2004;36:205-11.
85. Badalov N, Baradarian R, Iswara K, et al. Drug-induced acute pancreatitis: an evidence-based review. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007;5:648-61; quiz 644.