

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

DIPARTIMENTO DI AGROBIOLOGIA ED AGROCHIMICA

**CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOTECNOLOGIE VEGETALI
XVIII CICLO.**

**LA REATTIVITÀ DI FLUORESCENZA NUCLEARE: UN NUOVO MARCATORE
SENSIBILE E SPECIFICO PER IL FOLLOW-UP DEI SOGGETTI CELIACI E PER
IL MONITORAGGIO DELLA TOSSICITÀ IN VIVO DEI CEREALI**

Settore scientifico-disciplinare: AGR07

Coordinatore: **Prof. Domenico La Fiandra**

Tutor: **Dott. Antonio Picarelli**

Dottorando: Dott. **Luigi Sabbatella**

1. INTRODUZIONE

La malattia celiaca è un'enteropatia di tipo autoimmune che si manifesta, in individui geneticamente predisposti, in seguito al consumo di glutine.

L'ingestione di glutine provoca in questi soggetti una complessa reazione immunitaria che può tradursi in lesioni della mucosa intestinale in grado di causare alterazioni dell'assorbimento.

L'espressione del danno intestinale della malattia celiaca è tipicamente rappresentata dall'atrofia dei villi corredata da iperplasia delle cripte del Lieberkühn. Tali condizioni caratteristicamente e patognomicamente scompaiono dopo eliminazione del glutine dalla dieta.

La storia della celiachia ha origini molto lontane nel tempo, infatti già nel lontano 250 a.C. Galeno aveva descritto la presenza di questo fenomeno intestinale sia nel bambino che nell'adulto.

Nel I secolo d.C. Celso introdusse l'aggettivo celiaco (dal greco κοελιακος, intestino) per identificare una patologia della cavità addominale a carattere diarroico, mentre, a sua volta Areteo di Cappadocia ne riconobbe l'andamento protratto nel tempo e le difficoltà nella cura. Ad ogni modo, è soltanto nel 1888 che si ha la prima definizione di malattia celiaca come sindrome da malassorbimento intestinale ad opera di Samuel Gee, che individuò nella dieta una possibilità di terapia [1].

La storia moderna della celiachia ricevette un fondamentale impulso dal medico olandese Willem Karel Dicke che, negli anni '50, riuscì a dimostrare il ruolo eziologico del glutine nella sua patogenesi [2, 3].

Dicke osservò che durante la seconda guerra mondiale, i bambini che soffrivano di diarrea cronica associata a sindromi di malassorbimento intestinale, sintomi tipici della malattia celiaca, migliorarono notevolmente quando a causa del conflitto ci fu il cosiddetto "inverno del digiuno" (1944-1945) in cui, venendo a mancare le scorte di farina e frumento, i piccoli pazienti venivano sfamati con patate, banane ed altri alimenti inconsueti tra cui i bulbi di tulipano. Finita la guerra, con il ritorno alla normalità alimentare, Dicke notò il ripresentarsi dei sintomi. Grazie a questa brillante osservazione, egli giunse all'identificazione del glutine come agente eziologico della malattia celiaca.

L'anomala sensibilità nei confronti del glutine sembrerebbe conferita e/o comunque favorita da una particolare costituzione genetica. Tale assetto genetico risulta fortemente associato a

geni del sistema HLA (Human Leukocyte Antigen Complex), anche se recentemente sono stati individuati geni non appartenenti a tale sistema che appaiono essere coinvolti [4].

Nei soggetti geneticamente predisposti il consumo di glutine innesca una complessa risposta immune sia cellulo-mediata, avente come bersaglio ultimo la mucosa intestinale, sia umorale, evidenziata dalla produzione di autoanticorpi [5].

La celiachia costituisce un affascinante modello di malattia arricchito ogni giorno da nuove acquisizioni, ma a tutt'oggi ancora poco è noto sulle possibili origini di questa intolleranza. L'ipotesi attualmente più accreditata è basata sul fatto che l'uomo in origine non introduceva glutine con la dieta, né coltivava il grano da cui quest'ultimo deriva, ma con il passare del tempo da cacciatore del neolitico è diventato "inventore" dell'agricoltura imparando sia a coltivarlo che a nutrirsiene.

Su questa base, è stato ipotizzato che a questo cambiamento del comportamento alimentare, cioè il passaggio da un'alimentazione prettamente di tipo carnivoro ad una comprendente prodotti dell'agricoltura, non tutti gli uomini si sono adattati allo stesso modo. In alcuni casi, infatti, il sistema HLA avrebbe riconosciuto il glutine come proteina non "tollerabile", in maniera analoga ad un antigene estraneo, scatenando, come conseguenza, una risposta immunitaria "irragionevole", che porterebbe allo sviluppo dell'autoimmunità [6, 7].

Sebbene il principale organo bersaglio della malattia celiaca sia l'intestino tenue, lo spettro clinico di tale condizione è estremamente eterogeneo comprendendo manifestazioni molto diverse che variano sia da paziente a paziente che con l'età di insorgenza della malattia [5, 8, 9].

Negli ultimi anni sono state descritte forme cosiddette atipiche della malattia celiaca, in cui la sintomatologia si estende anche a livello extraintestinale presentandosi con ipersensibilità a livello cutaneo (dermatite erpetiforme), ipoplasia dello smalto dei denti, artrite, bassa statura, osteoporosi, problemi neurologici (atassia, epilessia), epatite cronica ed ipertransaminasemia [5, 10, 11].

Tra le forme atipiche della malattia celiaca è doveroso riportare sia la cosiddetta forma latente, caratterizzata dalla positività ai marcatori sierologici (anticorpi antiendomizio ed anti-transglutaminasi tissutale) ma con negatività istologica (assenza di atrofia dei villi), sia quella silente o asintomatica, caratterizzata dall'assenza di sintomatologia evidente [5, 10].

Lavori recenti sembrano, inoltre, indicare che la malattia celiaca può essere considerata come un fattore di predisposizione allo sviluppo di altre patologie autoimmuni, quali, in particolare, il diabete mellito insulino-dipendente di tipo I, la tiroidite di Hashimoto e la sclerosi multipla [12-15].

La prevalenza di malattie autoimmuni in soggetti affetti da malattia celiaca è, infatti significativamente più alta rispetto alla popolazione generale. È ipotizzabile che l'associazione tra la malattia celiaca e le altre patologie autoimmuni possa essere dovuta ad un comune substrato genetico [16-18].

Negli anni passati la celiachia era considerata una malattia tipica dell'infanzia ma tale convinzione è stata recentemente rivista. Infatti, a partire dai primi anni '90 fino a tutt'oggi si sta assistendo ad un drastico incremento nel numero delle diagnosi di malattia celiaca a carico di soggetti in età adulta [10, 19].

2. EPIDEMIOLOGIA DELLA MALATTIA CELIACA

I primi studi epidemiologici sulla malattia celiaca sono stati condotti in Europa a partire dal 1950.

Una prima analisi di tipo descrittivo ha rivelato, sulla base dei sintomi clinici tipici, la distribuzione, intesa come frequenza, della celiachia nelle diverse popolazioni europee.

Successivamente, con studi di tipo analitico e investigativo, si è cercato invece di definire i valori di incidenza (numero di nuovi malati insorti in una popolazione in un dato periodo di tempo) e di prevalenza (numero di malati totali presenti in una popolazione in un certo periodo di tempo) della malattia.

Negli anni '50 in alcuni paesi europei, in particolare Inghilterra e Galles, è stata registrata un'incidenza intorno ad 1:8000, mentre in Scozia sono stati rilevati valori intorno ad 1:4000. La malattia si presentava maggiormente nei bambini, tanto da farla considerare per lungo tempo una condizione di ambito prettamente pediatrico [20].

In quest'epoca, la diagnosi di malattia celiaca era ancora esclusivamente basata sulla sintomatologia clinica tipica e, dunque, è chiaro che anche i parametri epidemiologici riflettevano la scarsità di conoscenze del tempo.

La consapevolezza della malattia è molto aumentata intorno al 1960 quando i primi test per valutare lo stato di malassorbimento (misurazione dei grassi fecali e valutazione dell'assorbimento intestinale dello xilosio dopo ingestione di dosi note di quest'ultimo) sono stati messi a punto. Infatti, gli studi epidemiologici successivi all'introduzione di questi nuovi test, hanno registrato un aumento della prevalenza della malattia in Irlanda, Scozia e Svizzera con un valore calcolato nel 1970 di circa 1:450–1:500 [21-23].

Sulla base di questo incremento di prevalenza della malattia, sono stati suggeriti cambiamenti nella dieta abituale ed il ritardo nell'introduzione di glutine nella dieta infantile e durante lo svezzamento.

In seguito all'adozione di questi accorgimenti i tassi d'incidenza della malattia in Inghilterra ed in Irlanda hanno subito una notevole diminuzione, suscitando grande ottimismo da parte dei ricercatori. Gioia ed euforia però sono durati poco, in quanto studi successivi hanno rilevato una diminuzione della malattia nella sua forma tipica, ma al contempo un incremento delle forme atipiche, oltre ad un drastico aumento dei casi di insorgenza tardiva della malattia in bambini e adulti.

Anche in Italia, prima dell'introduzione dei test sierologici il tasso di prevalenza era valutato intorno ad 1:1000. Successivamente analizzando un campione di 17000 ragazzi sardi in età

scolare, il tasso registrato è stato invece di 1:184 evidenziando che i casi mal diagnosticati prima erano di circa un bambino ogni sette [24].

Quando in Europa la malattia celiaca era oramai già considerata una realtà, nel resto del mondo, invece, veniva ancora considerata una malattia rara.

In America gli unici lavori di tipo epidemiologico sono stati svolti tra gli anni 1993 e 1994 riportando una prevalenza di 1:10.000. Il dato è stato ottenuto basandosi solo sui sintomi gastrointestinali tipici, ignorando le altre possibili espressioni della malattia [25].

Solo negli ultimi anni l'introduzione di nuovi marcatori diagnostici di tipo sierologico, più specifici e più sensibili, quali gli anticorpi antigliadina (AGA) e, soprattutto, gli anticorpi antiendomio (EMA), ed anti-transglutaminasi tissutale (anti-tTG), di concerto con la possibilità di effettuare in modo più semplice la tipizzazione dell'HLA, ha permesso l'effettuazione di protocolli di screening della malattia sempre più accurati.

I risultati di tali studi dimostrano che, ferme restando le differenze alimentari tra le diverse popolazioni che determinano l'ingestione di diversi quantitativi di glutine, la malattia è distribuita in modo piuttosto omogeneo nel mondo.

La prevalenza stimata a tutt'oggi per la malattia celiaca in Italia è di 1 caso su 180 [19], in Europa è compresa tra 1:130 ed 1:300 [26], mentre negli Stati Uniti è stimata intorno ad 1 caso ogni 250 persone [27].

Le cause del notevole aumento della prevalenza della malattia celiaca negli ultimi anni sono oggi da ricercare, quindi, su due versanti: da una parte nelle nuove abitudini alimentari come la diminuzione dell'allattamento al seno o l'aumento delle quantità di glutine ingerite durante il periodo dello svezzamento, e finanche quantità e qualità del glutine stesso, dall'altra nello sviluppo di test diagnostici sempre più sensibili e specifici [28].

I cambiamenti epidemiologici della malattia sono efficacemente sintetizzati da un modello ad iceberg originariamente proposto da Richard Logan nel 1992 [29].

In questo modello, la prevalenza globale della malattia dovrebbe essere rappresentata dalla grandezza totale dell'iceberg, la quale è a sua volta influenzata dalla frequenza dei soggetti predisposti geneticamente.

I casi diagnosticati con evidenza clinica di malattia celiaca rappresentano la parte "emersa", quindi visibile, dell'iceberg. Nella porzione "sommersa" dell'iceberg sono invece rappresentati i casi che sfuggono ancora alla corretta diagnosi, rappresentati in grandissima maggioranza da tutte le forme atipiche con cui la malattia può presentarsi [Figura 2.1].

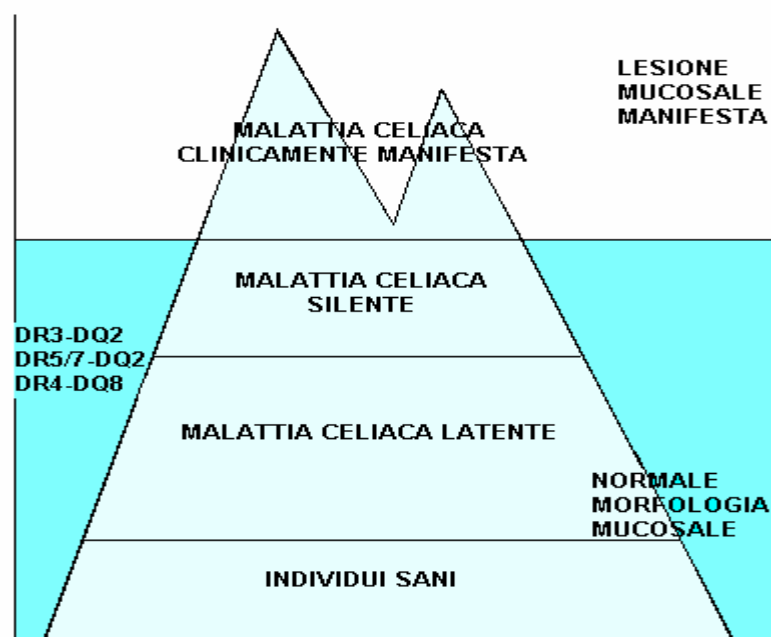


FIGURA 2.1 – L’ICEBERG DELLA MALATTIA CELIACA

La prevalenza globale della malattia è rappresentata dalle dimensioni totali dell’iceberg. Essa è influenzata dalla frequenza dei soggetti predisposti geneticamente (riportati a sinistra). I casi con evidenza clinica di malattia celiaca rappresentano la porzione visibile dell’iceberg. Nella porzione “sommersa” dell’iceberg sono invece rappresentati i casi che sfuggono ancora alla corretta diagnosi. A destra è riportata la morfologia mucosale nelle diverse situazioni. (Modificato da Logan, 1992).

3. DIAGNOSI DI MALATTIA CELIACA

I primi tentativi di porre una corretta diagnosi di malattia celiaca erano basati esclusivamente sul riscontro dei caratteristici segni e sintomi clinici. In quest'ottica è identificabile il tentativo di mettere a punto test diagnostici che fornissero una base più obiettiva possibile per effettuare una corretta diagnosi.

I primi test messi a punto erano basati sull'eliminazione dei grassi con le feci (steatorrea) e sulla valutazione dell'assorbimento intestinale e dell'eliminazione urinaria dello xilosio dopo ingestione di una dose nota di questo zucchero (xilosemia e xilosuria).

Questi esami, utilizzati per anni ai fini della decisione di sottoporre il paziente con sospetta celiachia a biopsia duodenale, riflettono, però, solo la presenza di un eventuale malassorbimento degli alimenti da parte della mucosa intestinale lesa, ma non sono assolutamente specifici per la malattia celiaca.

Dopo i primi approcci al problema, nel 1977 ad Utrecht (Olanda) la Società Europea di Gastroenterologia e Nutrizione Pediatrica (E.S.P.G.H.A.N.) ha proceduto alla stesura del "protocollo diagnostico della malattia celiaca", che, per la prima volta ha stabilito in maniera univoca i criteri che permettono di porre una diagnosi di malattia celiaca:

1. mucosa duodenale atrofica o subatrofica con dati clinici e di laboratorio suggestivi di malassorbimento intestinale;
2. miglioramento clinico ed istologico a dieta priva di glutine;
3. ricomparsa delle lesioni intestinali dopo la reintroduzione del glutine nella dieta

Questo protocollo ha costituito per quasi quindici anni il modello operativo al quale tutti i gastroenterologi pediatrici hanno fatto riferimento per giungere alla diagnosi. Come specificato, esso prevedeva l'esecuzione di una prima biopsia intestinale che doveva dimostrare il danno della mucosa intestinale, una seconda biopsia, dopo dieta senza glutine, per dimostrare la ricostituzione dei villi intestinali ed, infine, una terza biopsia dopo reintroduzione del glutine che riproponesse un quadro di atrofia della mucosa intestinale.

A distanza di 20 anni, il progredire della ricerca e delle conoscenze riguardanti la malattia celiaca ha permesso l'introduzione di esami sempre più sensibili e specifici che, oggi, permettono di sospettarla anche in soggetti completamente asintomatici. Questi esami permettono di ottenere una diagnosi in tempi brevi e di affrontare lo screening della malattia in maniera sicuramente più precisa ed affidabile, oltre a permettere una notevole semplificazione delle procedure diagnostiche della malattia [30].

Oggi giorno, perciò, l'identificazione della malattia celiaca è basata sull'esecuzione, in prima istanza, di test sierologici di alta specificità e sensibilità.

Il primo marcatore sierologico ad essere introdotto è costituito dagli anticorpi antigliadina (AGA) di isotipi IgA ed IgG, determinati con metodica immunoenzimatica ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).

Gli AGA IgG sono maggiormente sensibili, sono infatti positivi nel 92% dei soggetti celiaci non trattati, ma anche nel 22% dei soggetti affetti da altre patologie gastroenteriche. Al contrario, gli AGA IgA sono maggiormente specifici, sono infatti positivi nel 88% dei pazienti celiaci non trattati e nel 10% dei soggetti con altre patologie gastroenterologiche [31-33].

Per quanto appena affermato, oggi gli AGA hanno perso gran parte del loro valore diagnostico nello screening di malattia celiaca, a causa dei bassi valori di sensibilità e specificità. Attualmente il loro uso è molto limitato nell'adulto e viene riservato in maniera quasi esclusiva allo screening di soggetti in età pediatrica [31-33].

Al giorno d'oggi, il test sierologico con la maggiore specificità (100%) è rappresentato dalla determinazione degli anticorpi antiendomizio (EMA), effettuata con la metodica dell'immunofluorescenza indiretta [31, 32, 34].

Gli EMA legano uno o più componenti endomisiali della muscolatura liscia e vengono identificati dal caratteristico pattern a nido d'ape di color verde mela che si distribuisce sulla muscolaris mucosae di un'opportuna sezione criostatica.

Sono stati proposti vari substrati per la determinazione degli EMA, quali l'esofago di scimmia, il cordone ombelicale umano, il digiuno di scimmia ed il rene di ratto [35-38]. Gli ultimi due substrati sono utilizzati per la determinazione, rispettivamente, degli anticorpi anti-digiuno (JAB) ed anti-reticulina (ARA), vecchi marcatori, oggi non più utilizzati in quanto ritenuti molto simili, se non identici, agli EMA.

È invece certo che tanto l'esofago di scimmia che il cordone ombelicale umano possano funzionare da substrato per l'EMA, anche se il primo si rende preferibile per pulizia di immagine, chiarezza del messaggio alla lettura e per la possibilità di individuare altre componenti endomisiali che, una volta identificate, potrebbero rappresentare promettenti obiettivi di studio.

Per la loro altissima specificità, gli EMA di isotipo IgA sono oggi universalmente accettati come test diagnostico nello screening della malattia celiaca. Al contrario, secondo diversi autori il loro range di sensibilità è variabile tra il 74% ed il 100% [31, 32, 34, 39-42].

Al fine di aumentarne la sensibilità diagnostica, recentemente è stata dimostrata l'esistenza di una seconda classe di EMA, di isotipo IgG1, in una popolazione di soggetti con segni e sintomi di malattia celiaca negativi per gli EMA IgA, in maniera indipendente dalla presenza o meno di un deficit selettivo per le IgA [39-41].

La combinazione del dosaggio degli isotipi IgA ed IgG1 degli EMA permette di ottenere valori prossimi al 100% anche per quel che concerne la sensibilità [39-41].

In supporto ai marcatori sierologici già noti, recentemente la transglutaminasi tissutale (tTG) è stata identificata come il maggior autoantigene responsabile della produzione degli EMA, quindi la determinazione degli anticorpi anti-tTG è stata proposta come un nuovo utile strumento per lo screening sierologico di malattia celiaca. [43].

Gli anticorpi anti-tTG vengono determinati con una metodica immunoenzimatica EIA in micropiastra (Enzyme Immuno Assay) e presentano elevati valori di sensibilità (95-98%), mentre in letteratura è riportata una specificità intorno al 94% [44-46].

In ogni caso, come detto, si tratta di esami di prima istanza, infatti per una corretta diagnosi è ancora indispensabile il prelievo biotico per l'esame istologico e morfometrico, che deve documentare l'atrofia dei villi accompagnata dall'iperplasia delle cripte (rapporto lunghezza dei villi/profondità delle cripte $<3:1$) a dieta contenente glutine, con ritorno alla normalità (rapporto villo/cripta $\geq 3:1$) dopo dieta senza glutine.

Per cercare di uniformare i criteri relativi all'indagine morfometrica nella diagnosi di malattia gli originali criteri di Marsh, che definivano il grado di atrofia dei villi e di iperplasia delle cripte insieme alle caratteristiche dell'infiltrato cellulare eventualmente presente, sono stati recentemente modificati da Oberhuber e collaboratori al fine di ottenere la classificazione morfometrica attualmente utilizzata [Tabella 1] [47].

L'esame istologico e morfometrico utilizzato per la diagnosi della malattia presenta però degli ovvi limiti, infatti, problemi a livello di tecnica istologica e di osservatore potrebbero condurre ad interpretazioni erranee del dato, inoltre è da tenere in conto anche la casualità del punto in cui viene eseguito il prelievo biotico, che potrebbe avvenire in zone dell'intestino in cui la lesione non è evidente o è del tutto assente, come nei casi, rispettivamente di atrofia zonale (la cosiddetta "*patchy atrophy*" degli autori anglosassoni) e malattia celiaca latente.

TABELLA 1**CLASSIFICAZIONE MORFOMETRICA DI MARSH RIVISTA DA OBERHUBER E COLL. [47]**

Descrizione	Significato
CLASSE 0 (TIPO NORMALE) - Normale architettura mucosale - Normale numero di IEL (<40/100 EC)*	Mucosa intestinale normale.
CLASSE I (TIPO INFILTRATIVO) - Normale architettura dei villi - Normale profondità delle cripte - Aumentato numero di IEL (>40/100 EC)*	In pazienti celiaci a dieta priva di glutine indica l'introduzione di piccole quantità di glutine e/o che il paziente non è in piena remissione. Ricontrata anche in familiari di pazienti celiaci (definiti come celiaci potenziali). Non è diagnostica di malattia celiaca, ma indica che il paziente deve essere seguito nel tempo.
CLASSE II (TIPO IPERPLASTICO) - Normale architettura dei villi - Iperplasia delle cripte - Aumentato numero di IEL (>40/100 EC)*	Ricontrata raramente, principalmente in condizioni sperimentali ed in pazienti con dermatite erpetiforme. In pazienti a dieta priva di glutine indica spesso la presenza di lesioni "patchy" o che il paziente non ha ancora sviluppato la piena malattia.
CLASSE III (TIPO DISTRUTTIVO) - Iperplasia delle cripte - Aumentato numero di IEL (>40/100 EC)* - Atrofia dei villi:: IIIa atrofia parziale IIIb atrofia subtotale IIIc atrofia totale (mucosa piatta)	È suddivisa in tre sottoclassi (IIIa, IIIb e IIIc), in base al grado di atrofia dei villi intestinali. Rappresenta la lesione diagnostica di malattia celiaca.
CLASSE IV (TIPO IPOPLASTICO) - Atrofia totale della mucosa (mucosa piatta) - Normale profondità delle cripte - Normale numero di IEL*	Di rarissimo riscontro, è stata osservata in bambini severamente emaciati, in cui indica un grave stato di malnutrizione. Potrebbe rappresentare una lesione "antica" o irreversibile di causa ignota.

* IEL: linfociti intraepiteliali; EC: enterociti.

Per quanto detto, negli ultimi tempi all'esame istologico convenzionale è stata affiancata una nuova metodica di elevata specificità e sensibilità: l'esame colturale.

Questo esame prevede la coltura, in un opportuno mezzo, del frammento biotico di mucosa intestinale in presenza ed in assenza di glutine al fine di valutare l'eventuale produzione degli EMA nei liquidi di coltura delle biopsie intestinali [48-50].

Si tratta di un test che sta assumendo un ruolo molto importante nella diagnosi della malattia celiaca soprattutto quando, sia per mancanza di dati clinici chiari, sia per mancanza di prelievi biotici adeguati per l'esame istologico, la diagnosi iniziale potrebbe rimanere dubbia.

È proprio partendo dalla necessità di ricorrere spesso a challenge di gliadina nella dieta di celiaci con diagnosi dubbia che recenti studi di indagine diagnostica hanno posto particolare attenzione su altri siti mucosali del tratto gastrointestinale.

In particolare, osservazioni su sezioni di mucosa rettale di pazienti celiaci, dopo stimolazione con gliadina, hanno rivelato un rapido aumento del volume della lamina propria ed un progressivo aumento di linfociti intraepiteliali [51].

Recenti lavori hanno, inoltre, studiato la risposta della mucosa orale dopo stimolazione locale in vivo al fine di potersene servire come elemento utile a fine di diagnosi [52-53].

Altri studi sono attualmente in corso, per cercare di ottenere una sempre maggiore conoscenza della malattia e, per estensione, dei metodi per diagnosticarla correttamente e nel modo meno invasivo possibile. I tempi sembrano oggi maturi per avvicinarci il più possibile a questo traguardo.

4. RUOLO DEI CEREALI NELLA MALATTIA CELIACA

Il ruolo del glutine come agente causale della malattia celiaca è oggi universalmente accettato, in quanto una dieta priva di glutine provoca la completa remissione della sintomatologia e delle alterazioni a livello della mucosa intestinale.

Il glutine è un complesso proteico contenuto in numerosi cereali.

I cereali costituiscono uno dei più importanti componenti nutrizionali nella alimentazione umana e sono coltivati quasi in tutte le parti del mondo. Riso, grano e mais ne rappresentano più dell'80% della produzione mondiale totale.

Dal punto di vista botanico, i cereali (Gramineæ) sono classificati in quattro grandi gruppi: Bambusoideæ, Pooideæ, Panicoideæ e Chloridoideæ. Il gruppo Pooideæ, costituito da cereali ad elevato contenuto proteico (52-73%) e basso contenuto di acqua (11-14%), è ulteriormente suddiviso in due sottogruppi: Triticeæ, che comprendono grano, segale ed orzo ed Aveneæ, a cui appartiene l'avena [54].

I grani dei diversi cereali contengono una quantità di proteine variabile tra il 7 ed il 16% che, in base alla loro funzione, possono essere classificate in tre tipi:

- proteine che presentano una struttura simile a quella delle proteine di membrana, localizzate in tutte le parti del chicco.
- proteine di deposito, presenti esclusivamente nello strato impermeabile, detto endosperma.
- proteine metaboliche, con funzioni enzimatiche, che si ritrovano principalmente nello strato di aleurone e nell'embrione.

I vari studi clinici e biochimici effettuati a partire dal 1953, anno della prima dimostrazione della "tossicità" del grano nei pazienti celiaci [2, 3], hanno permesso di concludere che alcune proteine contenute nel grano, nell'orzo e nella segale sono "tossiche", mentre le analoghe proteine del mais e del riso non lo sono [55], e che questa "tossicità" sarebbe dovuta alla presenza di specifiche sequenze amminoacidiche nelle proteine incriminate [56].

Tradizionalmente, le proteine dei cereali vengono distinte in due frazioni: la frazione solubile in soluzione alcolica, costituita dalle prolammine e la frazione parzialmente solubile in soluzione alcalina, costituita dalle glutenine [57].

Studi precedenti avevano permesso di dimostrare che solo la frazione prolamminica è in grado di conferire la "tossicità" ai cereali nei pazienti celiaci [56], mentre al giorno d'oggi è ormai appurato che anche le frazioni gluteniniche a basso (LMW) e ad alto (HMW) peso

molecolare, presentano attività “tossica” per i pazienti celiaci, seppure in misura minore rispetto alla frazione prolaminica [58].

La “tossicità” delle glutenine sembra risiedere nella presenza di sequenze simili a quelle osservate nelle gliadine [56].

Le prolamine dei diversi cereali assumono nomi differenti: gliadina nel frumento, ordeina nell’orzo, avenina nell’avena, secalina nella segale, zeina nel mais ed orizina nel riso.

Il contenuto di prolamine nelle farine ottenute a partire dai diversi cereali varia considerevolmente e dipende dalla specie, dalla varietà e dalle condizioni di crescita. In media, infatti, la farina derivata dal grano di frumento ha il maggior contenuto in prolamine (3-6 g/100 g di farina) seguita dal mais, fino a giungere al riso che, di norma ne è privo.

Il nome prolamine rispecchia la caratteristica composizione amminoacidica di queste proteine che sono, infatti, caratterizzate da un elevato contenuto degli amminoacidi prolina e glutammina.

Le prolamine del riso, del miglio, del sorgo e del mais sono basse in contenuto di prolina e glutammina, ma ricche in leucina ed alanina. L’avenina dell’avena è in una posizione intermedia.

Caratteristiche comuni a tutte le prolamine, sono un basso contenuto di aminoacidi essenziali metionina, lisina, e triptofano. Per questa ragione, da un punto di vista nutrizionale, una dieta priva di glutine non è svantaggiosa per i pazienti celiaci [59-61].

Le prolamine consistono in numerose frazioni proteiche. A seconda delle loro sequenze amminoacidiche, della loro composizione e della loro massa molecolare, sono state classificate in diversi tipi: α , β , γ , ed ω . Ciascuna frazione è costituita da diversi domini proteici (N-terminale, centrale e C-terminale); i domini N-terminali presentano sequenze amminoacidiche ripetitive ricche in glutammina, prolina ed amminoacidi aromatici, mentre quelli C-terminali non possiedono sequenze ripetitive.

Secalina e ordeina presentano solo le frazioni ω e γ , mentre la gliadina ha due frazioni aggiuntive, α e β [62]. L’avenina, pur contenendo corte sequenze ripetitive ricche in prolina e glutammina, è comunque strutturalmente differente dalle prolamine degli altri cereali.

Le prolamine più studiate in relazione alla malattia celiaca sono le gliadine del frumento. Queste proteine sono codificate da loci localizzati nella porzione terminale del braccio corto dei cromosomi dei gruppi 1 e 6 del frumento.

Tutte le frazioni gliadiniche sono ritenute dannose per i soggetti celiaci, ma studi condotti su frammenti di mucosa intestinale di soggetti celiaci in remissione, mediante challenge in vitro con gliadina, hanno dimostrato che le frazioni α ed ω sono le più “tossiche” [63-64].

Gli studi condotti da Kasarda e collaboratori hanno permesso di evidenziare le sequenze aminoacidiche responsabili dell'effetto tossico della frazione α della gliadina [65].

Le sequenze situate nella porzione N-terminale sono quelle maggiormente indiziate di attività "tossica" nei soggetti affetti da malattia celiaca [66].

Nei 256 aminoacidi che compongono l' α -gliadina sono state individuate solo due sequenze tetrapeptidiche presenti in tutti i frammenti capaci di indurre attivazione immunologica nel tessuto intestinale dei soggetti celiaci [56]:

- Pro-Ser-Gln-Gln
- Gln-Gln-Gln-Pro.

In un lavoro recente è stato dimostrato che l'attivazione immunologica dovuta alla α -gliadina è riproducibile sia in vivo che in vitro, utilizzando una sua porzione molto più corta. Inizialmente è stata utilizzata la sequenza 31-49, poi sostituita da una sequenza di soli 13 amminoacidi, il peptide 31-43 (la cui sequenza è Leu-Gly-Gln-Gln-Gln-Pro-Phe-Pro-Pro-Gln-Gln-Pro-Tyr), il quale contiene uno dei tetrapeptidi considerati "tossici" [49, 67-69].

Oltre la gliadina, sono ritenute "tossiche" per i soggetti celiaci anche altre prolammine, quali l'ordeina e la secalina, a causa della loro elevata omologia con le sequenze aminoacidiche della gliadina e gli stretti rapporti tassonomici con quest'ultima [70], mentre l'avenina dell'avena, filogeneticamente distante dalle Triticaceae e con un minore contenuto in prolina e glutammina, viene di solito ritenuta tollerabile, in piccola quantità, dai pazienti celiaci, anche se i risultati sperimentali ottenuti sono piuttosto controversi [71-78].

Inoltre, la tossicità delle diverse prolammine sembra essere anche confermata da ulteriori studi in vitro, in cui è stato dimostrato che queste proteine inducono l'agglutinazione di cellule appartenenti alla linea K562 [79].

In ogni caso, a tutt'oggi, mancano studi completi che permettano di fare chiarezza sull'effettivo ruolo dei diversi cereali nella malattia celiaca, in modo particolare per quanto riguarda orzo e segale. Studi accurati, infatti, sono stati condotti solo per quanto riguarda l'avena.

Come precedentemente accennato, i risultati ottenuti sembrano dimostrare che quest'ultima non presenterebbe effetti tossici e/o immunogenici per i pazienti celiaci, anche a lungo termine [71-78], su questa base, in tempi recenti è stato proposto di includere l'avena nella dieta senza glutine dei pazienti celiaci. Va però tenuto presente che altri dati dimostrerebbero, invece, un'attivazione immunologica dopo instillazione rettale di proteine dell'avena in soggetti celiaci [80].

Nel complesso i dati ottenuti riguardo l'avena sono piuttosto contraddittori ed una sua eventuale inclusione nell'alimentazione di soggetti affetti da malattia celiaca è tuttora oggetto di discussione.

Per quel che concerne gli altri cereali, come detto, si osserva come le conoscenze siano ridotte e derivanti soltanto da studi parziali e datati condotti utilizzando i metodi in vitro ed i test clinici dell'epoca.

Allo stato attuale delle cose, cereali come ad esempio l'orzo e la segale, continuano ad essere considerati "tossici" per i pazienti celiaci su queste basi "storiche", ma in realtà mancano studi completi e condotti secondo le metodiche e le conoscenze più recenti.

5. LA MUCOSA INTESTINALE

L'intestino tenue, che comprende il duodeno, il digiuno e l'ileo, è la principale sede di assorbimento dei prodotti della digestione. È organizzato in quattro strati funzionali distinti: la mucosa, la sottomucosa, la tonaca muscolare e l'avventizia.

La mucosa, dal punto di vista istologico, è, a sua volta, suddivisa in tre strati: un epitelio di rivestimento, una lamina propria connettivale di supporto ed uno strato muscolare (*muscularis mucosæ*).

L'epitelio è costituito da un monostrato di cellule cilindriche, gli enterociti. Esso si solleva in numerose estroflessioni digitiformi alte circa 1 mm dette villi, che sono a loro volta circondate da avvallamenti circolari, le cripte del Lieberkühn.

Gli enterociti sono ricoperti da una struttura dall'aspetto striato, l'orletto a spazzola, costituita dai microvilli la cui funzione, al pari di quella dei villi, è quella di aumentare la superficie totale di assorbimento.

Resta da sottolineare l'altra caratteristica principale delle cellule epiteliali rappresentata dalla loro capacità di aderire tenacemente l'una all'altra così da formare una lamina compatta e continua che costituisce una barriera selettiva al passaggio di batteri, virus ed alimenti per via paracellulare. L'adesione cellulare dipende in larga misura dalla presenza di speciali apparati di giunzione costituiti dalle giunzioni serrate ("tight junction"), strutture di connessione costituite da glicoproteine calcio-dipendenti, le E-caderine.

L'epitelio intestinale è specializzato, inoltre, nell'assorbimento e nella secrezione; le cellule di questo epitelio sono infatti polarizzate, il polo apicale, rivolto verso il lume, è specializzato nell'assorbimento dei prodotti della digestione, mentre il polo basale, che si affaccia sulla tonaca propria, interviene nei processi di trasporto delle sostanze assorbite verso la rete capillare sanguigna e linfatica.

La lamina propria, formata da tessuto connettivo areolare lasso, presenta una notevole varietà di tipi cellulari (leucociti, macrofagi, plasmacellule e linfociti), oltre a numerose ghiandole, linfonodi e capillari sanguigni e linfatici.

La *muscularis mucosæ* costituisce lo strato più interno della muscolatura liscia intestinale.

La sottomucosa, strato di tessuto connettivo lasso, forma una struttura di supporto alla sovrastante mucosa ed, inoltre, contiene i vasi sanguigni di calibro maggiore, i vasi linfatici ed i nervi.

La tonaca muscolare propria è formata da tessuto muscolare liscio, solitamente suddiviso in due strati: uno circolare interno ed uno longitudinale esterno. L'azione di questi strati di

muscolatura liscia, disposti l'uno perpendicolarmente all'altro, è alla base della contrazione peristaltica.

L'avventizia, infine è la struttura che permette il passaggio di vasi e nervi con funzioni di rivestimento.

5.1 **COMPONENTI CELLULARI DEL SISTEMA IMMUNITARIO ASSOCIATI ALLA MUCOSA INTESTINALE**

Le cellule proprie del sistema immunitario si trovano disseminate nella mucosa intestinale in tre regioni distinte: lo strato epiteliale, la lamina propria e le Placche di Peyer. In ognuna di queste aree le cellule hanno caratteristiche fenotipiche e funzionali diverse.

Lo strato epiteliale è popolato da linfociti intraepiteliali (IEL) CD8+, in condizioni fisiologiche si trovano circa 40 IEL per ogni 100 enterociti [81]. Un numero maggiore di IEL infiltranti lo strato epiteliale viene considerato come un indicatore di un processo patologico o infiammatorio coinvolgente il sistema immunitario.

Il 90% dei linfociti T intraepiteliali esprime il recettore TCR di tipo α/β , mentre solo una piccola frazione di essi esprime un TCR di tipo γ/δ .

La lamina propria contiene una popolazione cellulare composta in cui spiccano i linfociti T CD4+ che, di norma, non esprimono marcatori di attivazione. In condizioni patologiche, ad essi si aggiungono linfociti T CD4+ che esprimono marcatori di attivazione immunologica provenienti dal tessuto linfoide associato all'intestino (GALT, Gut-Associated Lymphoid Tissue). Altri tipi cellulari riscontrabili all'interno della lamina propria sono plasmacellule, macrofagi, mastociti ed, in condizioni particolari, granulociti eosinofili; tutti questi tipi cellulari sono in parte associati al GALT.

5.2 **MODIFICAZIONI DELLA MUCOSA INTESTINALE DEI SOGGETTI CELIACI**

La malattia celiaca non trattata è caratterizzata da una complessa lesione morfologica dell'intestino tenue caratterizzata da atrofia parziale o totale dei villi, aumento di profondità delle cripte del Lieberkühn, aumento dell'indice mitotico nelle cripte, aumento del numero dei linfociti intraepiteliali, infiltrazione di plasmacellule, linfociti e mastcellule nella lamina propria ed anomalie dell'epitelio che perde il suo aspetto cilindrico apparendo cuboide ed irregolare [5, 10]. [Figura 5.1].

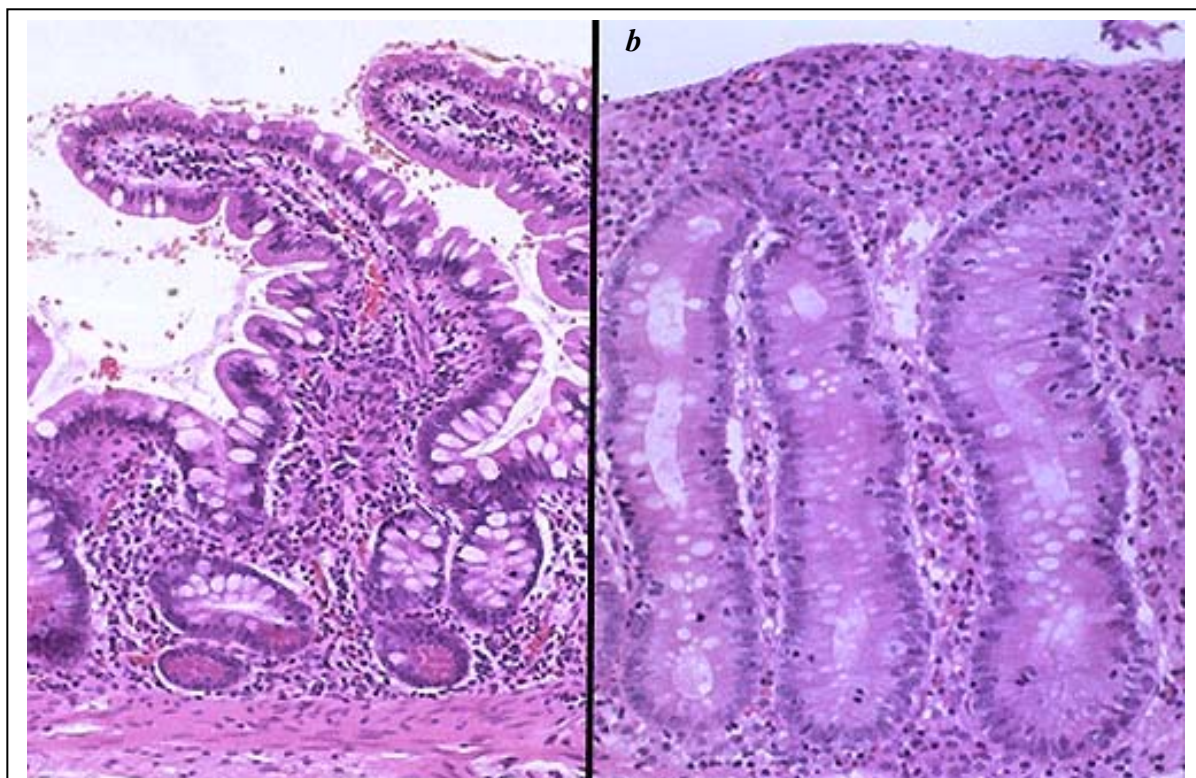


FIGURA 5.1 – MODIFICAZIONI DELLA MUCOSA INTESTINALE NELLA MALATTIA CELIACA NON TRATTATA.

a) a sinistra è visibile la situazione normale, mentre *b)* a destra la tipica architettura mucosale della malattia celiaca non trattata.

Il quadro descritto, tuttavia, difficilmente è riscontrabile in toto nella malattia celiaca, infatti, alterazioni anche minime rivelabili attraverso l'analisi immunoistochimica possono essere marcatori affidabili di enteropatia glutine-sensibile.

Tali alterazioni sono tipicamente rappresentate da un aumento degli IEL con ritorno a valori normali dopo esclusione del glutine dalla dieta, dall'incremento del numero di IEL con TCR γ/δ e/o da un aumento dell'espressione dei marcatori di attivazione immunitaria sulle cellule mononucleate nella lamina propria [5, 10, 82].

Proprio grazie ad accurati studi di queste alterazioni è stata molto ben caratterizzata una delle forme atipiche di malattia celiaca, la cosiddetta celiachia "latente" in cui la mucosa, pur apparendo normale da un punto di vista morfologico, mostra fenomeni di attivazione immunologica del tutto sovrapponibili a quelli osservati nei soggetti che presentano la classica lesione istologica, pur in presenza di positività per i marcatori sierologici della malattia stessa [82].

Questa presentazione della malattia può, però, anche essere un artefatto strumentale, correlabile alla piccola estensione della lesione ed alla casualità del prelievo biotico. In

questi casi si parla di malattia celiaca con atrofia zonale o a placche (la cosiddetta “*patchy atrophy*”).

6. GENETICA

L'interazione, ancora non del tutto chiarita tra fattori genetici e fattori ambientali nella malattia celiaca, la fa considerare chiaramente una malattia multifattoriale.

Il coinvolgimento genetico nello sviluppo della patologia è stato evidenziato dall'alta prevalenza (10%) tra i familiari di primo grado dei pazienti celiaci e dall'alta concordanza (70-100%) della malattia nei gemelli monozigoti [83, 84].

Il parametro preso in considerazione per valutare il grado di aggregazione familiare è il λ_s (prevalenza di una malattia tra fratelli di probandi/prevalenza della malattia nella popolazione generale). Quanto più tale indice è alto, tanto più è probabile che la malattia abbia una forte componente genetica [85].

Il valore di λ_s nella malattia celiaca è stato stimato intorno a 30-60, valore che, comparato con altre malattie multifattoriali, come artrite reumatoide, diabete mellito insulino-dipendente di tipo 1 e sclerosi multipla, risulta essere molto alto [85, 86].

Il fattore genetico maggiormente conosciuto e studiato è rappresentato dai geni appartenenti al sistema HLA.

L'aggregazione di tipo familiare attribuibile all'HLA (λ_s -HLA) presenta un valore stimato tra 2.3 e 5, pertanto il contributo dei geni HLA nella malattia celiaca è importante, ma sicuramente altri fattori genetici devono essere coinvolti [85, 86]. Infatti diversi studi di linkage hanno evidenziato il coinvolgimento di altri geni non-HLA che contribuiscono nel conferire suscettibilità alla malattia [4].

6.1 I GENI HLA NELLA MALATTIA CELIACA

Il maggior complesso di istocompatibilità (Major Histocompatibility Complex, MHC) codifica per diverse glicoproteine di membrana, la cui funzione è quella di presentare antigeni ai linfociti T. Il recettore dei linfociti T (TCR, T-Cell Receptor) è in grado di riconoscere un antigene solo se è associato ad una molecola dell'MHC.

Le molecole dell'MHC svolgono un ruolo fondamentale nel riconoscimento cellulare, nella discriminazione tra "self" e "non self" e nello sviluppo delle risposte immunitarie.

Il sistema maggiore di istocompatibilità nell'uomo viene detto sistema HLA (Human Leukocyte Antigen Complex) ed è codificato da un complesso di geni localizzati in un ampio tratto di DNA sul braccio corto del cromosoma 6.

I geni per l'HLA sono organizzati in regioni che codificano tre diverse classi di molecole: la classe I, la classe II e la classe III.

I geni di classe I codificano per glicoproteine espresse su quasi tutte le cellule nucleate e la loro funzione è quella di presentare peptidi antigenici endogeni ai linfociti T CD8+ (citotossici).

Le molecole HLA di classe I sono costituite da una catena α di 44 kDa associata non covalentemente ad una catena di 12 kDa, la β 2-microglobulina, codificata da una regione genica distinta dell'HLA, situata sul cromosoma 15.

I geni di classe II codificano per glicoproteine presenti fundamentalmente sulle cellule presentanti l'antigene (Antigen Presenting Cells, APC), queste ultime hanno la funzione di presentare peptidi derivati da antigeni esogeni ai linfociti T CD4+ (helper).

Strutturalmente le molecole HLA di classe II sono costituite da una catena α di 32-34 kDa e da una catena β di 29-32 kDa, associate in modo non covalente.

Più del 90% dei pazienti celiaci portano gli alleli HLA -DQA1*0501 e -DQB1*0201, i quali codificano per la molecola variante DQw2, mentre solo il 20-30% di questi alleli sono associati ai controlli [84].

L'antigene DQw2 è quello più strettamente legato alla malattia (in alcune popolazioni è stata descritta un'associazione del 100% tra questo antigene e la malattia celiaca, mentre in altre popolazioni questa frequenza di associazione è più bassa, risultando intorno al 25-30%), mentre le precedenti associazioni trovate con il DR3, il DR4 ed il DR7, e con i relativi fenotipi HLA DR3/DR7, DR3/DR3 e DR5/DR7 sono in realtà da attribuire allo stretto linkage disequilibrium esistente tra di essi ed il DQw2 [87].

I rari pazienti celiaci negativi per il DQw2 sono positivi per il DQw3, che si associa all'antigene DR4 [88].

Il gene DQw2 tuttavia è presente anche nel 20-30% della popolazione generale; ciò ha portato ad indagare la struttura molecolare dei geni di classe II associati alla malattia celiaca, nell'ipotesi che individui con gli stessi antigeni HLA sierologici possano differire sul piano molecolare.

L'analisi molecolare dei geni HLA-DQ ha dimostrato che la celiachia è strettamente associata ad un particolare eterodimero DQ codificato dagli alleli DQ A1*0501 e DQ B1*0201 anche se finora non è stata individuata una sequenza nucleotidica specifica per la malattia [89].

Il sequenziamento dei geni HLA-DQ ha permesso di osservare che l'aplotipo DR3-DQ2 porta gli alleli DQA1*0501 e DQB1*0201 mentre l'aplotipo DR5-DQ7 porta gli alleli DQA1*0501 e DQB1*0301 e l'aplotipo DR7-DQ2 porta gli alleli DQA1*0201 e DQB1*0201, di conseguenza gli alleli DQA1 degli aplotipi DR3-DQ2 e di quelli DR5-DQ7 e gli alleli DQB1 degli aplotipi DR3-DQ2 e DR7-DQ2 sono identici.

Gli individui eterozigoti DR5-DQ7/DR7-DQ2 portano in trans gli stessi alleli portati in cis dagli individui DR3-DQ2 e, conseguentemente, possono esprimere la stessa molecola DQ che nella fattispecie corrisponderebbe all'eterodimero di cui sopra, ciò sembrerebbe confermare l'ipotesi della correlazione della malattia celiaca con questo particolare eterodimero DQ [84]. [Figura 6.1].

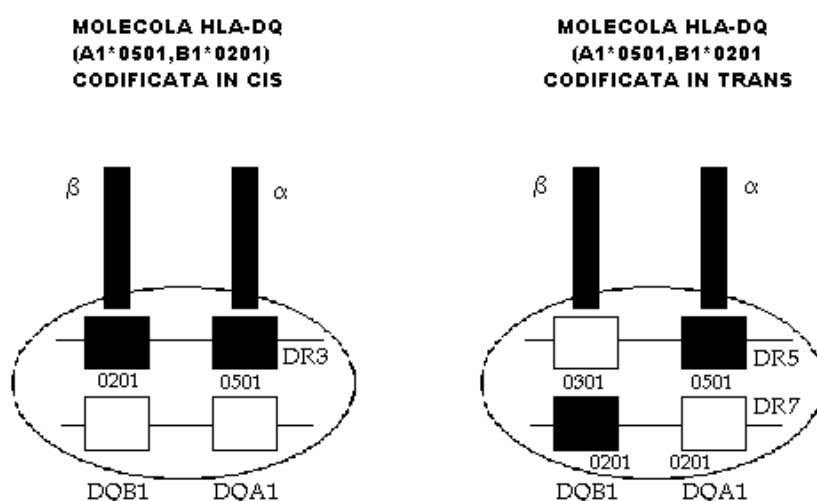


FIGURA 6.1 – CORRELAZIONE TRA LA MALATTIA CELIACA E L'ETERODIMERO HLA-DQ(α 1*0501, β 1*0201).

I pazienti celiaci omozigoti per HLA-DR3 o eterozigoti per HLA-DR5/DR7 possono esprimere la stessa molecola DQ.

I geni in questione si trovano in cis negli omozigoti DR3 ed in trans negli eterozigoti DR5/DR7.

6.2 GENI NON-HLA NELLA MALATTIA CELIACA

Recenti studi di screening genomico, in famiglie in cui più figli risultavano affetti da malattia celiaca, hanno evidenziato che anche altri geni, non appartenenti al sistema HLA, sono coinvolti nel conferimento della suscettibilità alla malattia stessa.

L'analisi di linkage ha dimostrato che appaiono essere coinvolti geni localizzati su cromosomi differenti [90].

Il primo possibile candidato è stato individuato sul braccio corto del cromosoma 6, in posizione telomerica a 30 cM dai loci HLA [91].

Altre regioni geniche che sembrano avere un legame con la malattia celiaca, sono situate sui cromosomi 7 (7q31), 11 (11p11), 15 (15q26) e 22.

In ogni caso, va sottolineato che i risultati ottenuti in diversi studi sono contrastanti, per cui l'eventuale legame di queste regioni geniche con la malattia celiaca è ancora tutto da chiarire [90, 92, 93].

D'altro canto, altri lavori hanno riportato un'associazione della malattia con regioni geniche localizzate sul cromosoma 11 (11qter), questo fattore potrebbe consentire di discernere la presentazione clinica, sintomatica o silente, della malattia [94]. Inoltre, anche un locus, recentemente individuato nella porzione terminale del cromosoma 5q, sembra essere coinvolto nelle differenti manifestazioni cliniche della malattia [92].

Nonostante l'elevato numero di studi condotti, ad oggi, il solo gene per cui sono stati effettuati in quantità studi di associazione con la malattia celiaca è certamente il gene che codifica per il CTLA-4 [95, 96]. Questo gene mappa sul cromosoma 2 (2q33) e codifica per una molecola di superficie dei linfociti T in grado di legarsi al B7 espresso dalle cellule presentanti l'antigene e di sviluppare, come conseguenza, un segnale negativo per le cellule T in grado di mediare la loro stessa apoptosi. Tale sistema potrebbe contribuire al mantenimento della tolleranza nei confronti degli antigeni "self".

Il coinvolgimento di questa molecola nella malattia è stato ipotizzato sulla base di diversi lavori in vitro che hanno dimostrato la variazione del singolo nucleotide nel primo esone del gene, in cui la transizione dall'allele A all'allele G comporta il cambiamento di un amminoacido, da treonina ad alanina, nella molecola codificata. La probabilità che questa variazione allelica del gene partecipi al meccanismo della malattia, modificando l'espressione di membrana della stessa, è ritenuta bassa [95].

Studi di associazione condotti in diverse popolazioni hanno però riportato dati differenti; infatti l'allele A è risultato associato con la malattia celiaca solo in alcune popolazioni, mentre in altre l'associazione con la malattia è stata supportata dalla scoperta di un microsatellite D2S116 localizzato immediatamente vicino al gene del CTLA-4 [97, 98].

Lo studio dei polimorfismi genetici di alcune citochine ha rivelato una stretta associazione della malattia celiaca con un particolare aplotipo codificante per un fenotipo altamente secretorio nel locus del TNF- α [99].

7. RISPOSTA IMMUNITARIA

È ormai consolidato il concetto che la malattia celiaca sia immunologicamente mediata e possa essere definita come malattia autoimmune.

Fattori chiari e qualificanti sono lo stretto legame col sistema HLA, la presenza nel siero di anticorpi antigliadina (AGA), antiendomisio (EMA), ed anti-transglutaminasi tissutale (anti-tTG) [5, 9, 10].

Gli EMA, autoanticorpi in quanto determinabili su sezioni di esofago umano [100], sono diretti verso un autoantigene, la transglutaminasi tissutale [43], anche se altri studi hanno dimostrato che quest'ultima potrebbe non essere l'unico autoantigene responsabile della produzione degli EMA [46, 101].

La malattia celiaca è quindi caratterizzata da una potente risposta immune sia cellulo-mediata che umorale, scatenata dall'introduzione per via alimentare della gliadina.

La risposta immunitaria inizia quando le cellule presentanti l'antigene (APC) riconoscono l'antigene primario (peptidi della gliadina), lo processano e lo presentano ai linfociti T CD4+, in associazione a molecole MHC di classe II. Questo processo avviene all'interno dei grandi aggregati di tessuto linfoide associato all'intestino (GALT) e nei linfonodi mesenterici che si trovano sparsi nel tratto gastrointestinale. I linfociti T CD4+ attivati migrano nella lamina propria attraverso i vasi sanguigni, pronti al contatto con l'antigene.

I linfociti T CD4+ si dividono in due sottopopolazioni distinte, Th1 e Th2. I linfociti Th1 indirizzano la risposta immunitaria attraverso il rilascio di citochine quali γ -interferone (γ -IFN) ed interleuchina 2 (IL-2) che stimolano la proliferazione ed il differenziamento dei linfociti T citotossici (CTL). I linfociti appartenenti alla sottopopolazione Th2, invece, indirizzano la risposta immunitaria in senso umorale, secernendo fattori quali interleuchina 4 (IL-4), interleuchina 5 (IL-5) ed interleuchina 10 (IL-10) che inducono la proliferazione e la differenziazione dei linfociti B.

In ogni caso, entrambi i tipi cellulari sembrano derivare da precursori comuni a profilo citochinico intermedio: i linfociti Th0.

Recenti lavori hanno indicato che i principali imputati nella produzione delle lesioni istologiche, caratteristiche della malattia celiaca, sono le cellule T CD4+ a profilo Th1, anche se il meccanismo che porterebbe alla polarizzazione delle cellule T in senso Th1 rimane ancora poco chiaro. Infatti, paradossalmente, la principale citochina coinvolta nella polarizzazione in senso Th1, l'interleuchina 12 (IL-12) non è riscontrabile nella mucosa intestinale dei soggetti celiaci [102, 103]. Sembra che questa funzione inducente le cellule T

verso Th1 sia svolta da altre citochine quali α -IFN ed IL-18 [104]. Come la gliadina scateni tale sequenza di eventi non è ancora del tutto noto.

In condizioni fisiologiche normali, le giunzioni serrate ("tight junction") dell'epitelio intestinale rappresentano una barriera selettiva per il passaggio di macromolecole come la gliadina. Il suo trasporto, così come quello del 90% delle proteine, è di tipo transcellulare, in cui l'azione litica dei lisosomi sui peptidi gliadinici, li rende più piccoli e, conseguentemente, non immunogenici.

Nella mucosa intestinale dei pazienti in fase attiva di malattia celiaca, invece, il trasporto dei peptidi gliadinici sembra avvenire attraverso una via paracellulare, per cui i peptidi stessi, non venendo in contatto con i lisosomi, passerebbero come tali, mantenendo quindi le loro proprietà immunogeniche, nella lamina propria [105].

Il cambiamento della via di trasporto sembra essere una conseguenza dell'aumento di permeabilità intestinale, causata dall'alterata integrità delle giunzioni serrate [106].

Diversi lavori hanno indagato i motivi dell'alterata integrità giunzionale della mucosa in fase attiva di malattia celiaca, ma ancora non è stato possibile chiarire tutti i dubbi relativi a questo fenomeno.

Alcuni autori suggeriscono, a tale proposito, che le citochine rilasciate nella mucosa in fase acuta di malattia, ovvero il fattore di necrosi tumorale- α (TNF- α), il fattore di crescita trasformante- β (TGF- β), il γ -IFN e le interleuchine IL-1 ed IL-2, possano ridurre i livelli di trascrizione dell'E-caderina, allentando così le giunzioni [105].

L'azione di queste citochine è stata studiata su un modello in vitro di cellule tumorali derivate da colon umano (CaCO2), confermando il loro possibile ruolo nel processo di alterazione della permeabilità intestinale [105].

Un ulteriore studio effettuato su biopsie intestinali di pazienti celiaci, al fine di valutare l'espressione della zonulina, una proteina normalmente espressa dagli enterociti ed implicata nella modulazione endogena delle giunzioni serrate, ha dimostrato un suo interessamento nella patogenesi della malattia celiaca.

Sembra che la zonulina interagendo con uno specifico recettore di superficie intestinale, riesca ad alterare la polimerizzazione dei microfilamenti di actina, regolando così la via paracellulare [107].

Sebbene gli studi menzionati documentino il ruolo centrale svolto dall'alterazione della barriera intestinale nella patogenesi, non è da escludere che accanto a questa causa ci possa essere anche un'alterazione del meccanismo di induzione della tolleranza orale nei confronti della gliadina.

L'induzione della tolleranza orale in seguito all'ingestione di cibo, un sistema di “down regulation” antigene-specifico delle risposte immuni potenzialmente dannose, forma una parte integrante della capacità immunoregatoria del GALT, di conseguenza è possibile ipotizzare che la reazione nei confronti della gliadina nei soggetti celiaci, possa essere dovuta ad una mancata induzione della tolleranza da parte delle cellule T regolatorie, presenti nelle placche di Peyer, o ad una mancata delezione clonale delle cellule T specifiche per la gliadina negli organi linfoidi secondari dopo esposizione alla gliadina [108].

7.1 RISPOSTA IMMUNITARIA CELLULO-MEDIATA

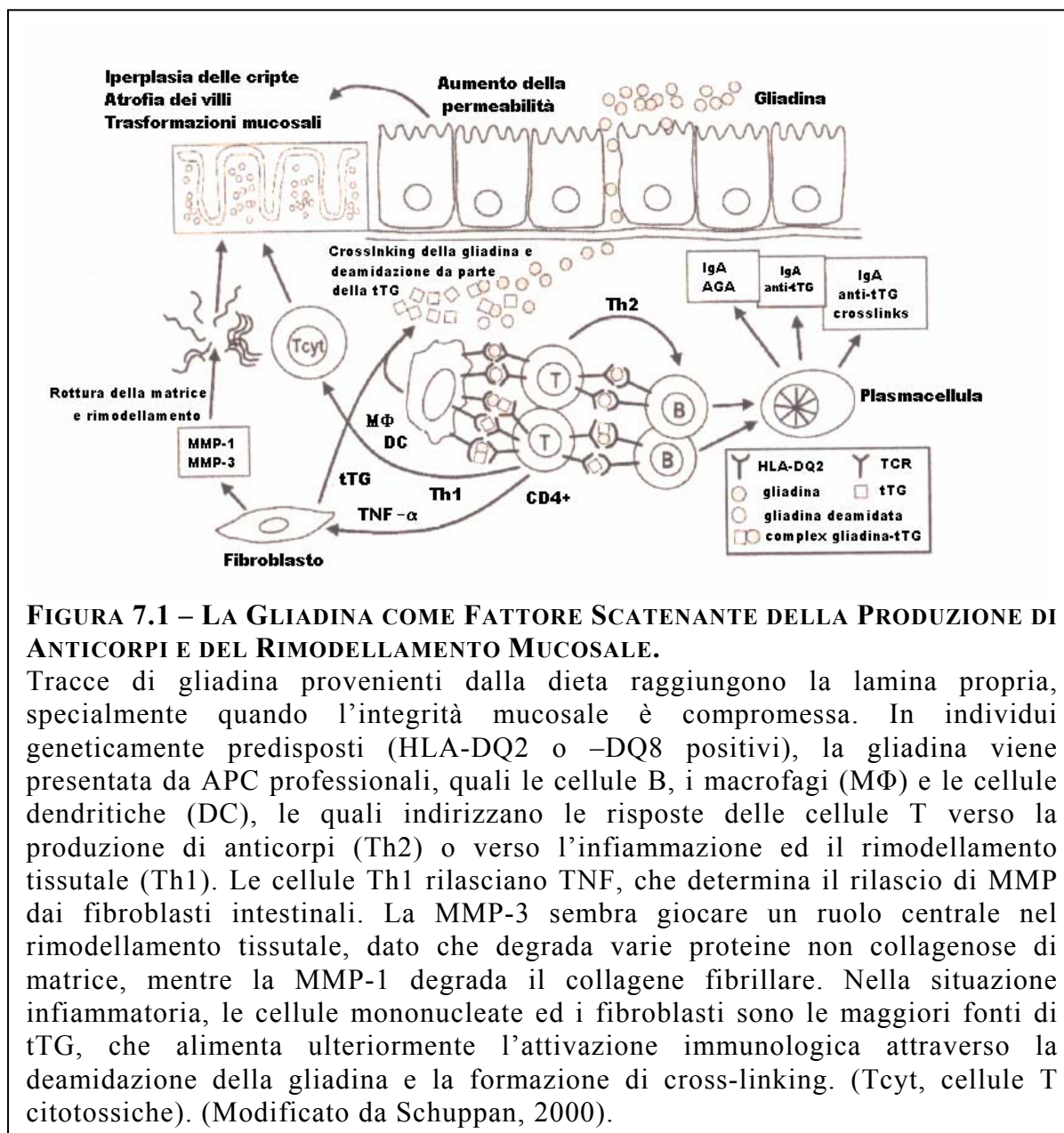
È noto che la risposta immunitaria cellulo-mediata, indirizzata dai linfociti CD4+ Th1, gioca un ruolo centrale nella genesi della lesione tissutale a livello della mucosa intestinale.

Ciò è confermato dall'infiltrazione della mucosa intestinale da parte di linfociti T CD4+ e dalla presenza di cloni di cellule T che riconoscono specificamente la gliadina e i peptidi da essa derivati ristretti per HLA-DQ($\alpha 1^*0501$, $\beta 1^*0201$). Il profilo citochinico di queste cellule riflette quello tipico dei linfociti Th0 e Th1 [109].

Ulteriore evidenza a conferma viene fornita dalla presenza di cellule immunitarie attivate nel sangue periferico dei pazienti celiaci, con prevalenza di cellule T di memoria, che esprimono il CD45RO, così come quella del recettore per l'interleuchina 2 (IL-2R) solubile [110].

I primi studi sembravano dimostrare che, tra le citochine prodotte, un ruolo importante nelle modificazioni istologiche in senso degenerativo a carico della mucosa intestinale fosse rivestito dal γ -interferone, ciò venne confermato dalla dimostrazione che queste modificazioni potevano essere bloccate in vitro utilizzando anticorpi anti γ -IFN [111].

Ad oggi, il quadro sembra essere diverso, infatti, è stato recentemente dimostrato che, in vitro, le cellule T a profilo Th1 gliadina-specifiche rilascino fattore di necrosi tumorale α che determinerebbe, a sua volta, la secrezione di metalloproteinasi di matrice (MMPs) da parte dei fibroblasti intestinali. Le metalloproteinasi di matrice così rilasciate causerebbero la dissoluzione del tessuto connettivo [112, 113]. [Figura 7.1].



Nell'attivazione della risposta Th1 sono riconoscibili due fasi:

- Attivazione e differenziamento delle cellule T citotossiche quiescenti in CTL effettori funzionali;
- Distruzione delle cellule bersaglio da parte dei CTL attivati.

Una completa attivazione della cellula T richiede almeno due differenti e complementari segnali molecolari. Il primo è rappresentato dal riconoscimento, da parte del complesso TCR-CD3/CD8, del complesso MHC-peptide sulla cellula presentante l'antigene (APC). Questo processo è, quindi, specifico per ogni singolo clone T. Tuttavia il solo riconoscimento da parte del TCR non è sufficiente a determinare una completa attivazione della cellula T; tale evento richiede infatti un secondo segnale molecolare. Questo secondo segnale è costituito

dal riconoscimento del CD28 sul linfocita T da parte delle molecole costimolatorie B7 (CD80/CD86) espresse dalle APC. Se tale segnale costimolatorio è alterato, si altera nel suo complesso il processo di attivazione della cellula T e ciò può portare ad una condizione di non responsività o anergia.

Un'altra molecola, fondamentale in questo processo, espressa sul linfocita T è il CTLA-4, costitutivamente espressa a bassi livelli, ed indotta durante il processo di attivazione. Il CTLA-4 ha una elevatissima affinità per il B7 ed è pertanto in grado di competere con il CD28. Quando una cellula T è attivata a causa del riconoscimento dell'antigene da parte del TCR e la contemporanea interazione del segnale costimolatorio, l'espressione del CTLA-4 è indotta sulla cellula T ed, a causa della sua elevatissima affinità per le molecole B7, il CTLA-4 stesso compete progressivamente con il CD28 ed, in ultima analisi, controlla il processo di attivazione T cellulare.

A conferma di quanto detto, è stato recentemente dimostrato che l'uso di CTLA-4 solubile (CTLA-4 Ig) rappresenta, in vitro, l'approccio più conveniente per controllare una attivazione T cellulare indesiderata.

Lo studio in questione ha evidenziato che l'uso del CTLA-4 Ig solubile può indurre una condizione di tolleranza della cellula T e potrebbe essere in grado di prevenire e controllare lo sviluppo di patologie autoimmuni [114].

Anche nella malattia celiaca il CTLA-4 riveste un ruolo molto importante. Il modello di coltura in vitro descritto prima è utilizzato per controllare, nella mucosa intestinale dei pazienti celiaci in remissione, l'abnorme ed indesiderata risposta immunologica T linfocitaria indotta dal challenge con gliadina [114].

La coltura d'organo è stata utilizzata come sistema in vitro per lo studio dei meccanismi immunologici e patogenetici alla base della malattia celiaca. In questi esperimenti, i frammenti bioptici di pazienti celiaci in remissione, a dieta priva di glutine, sono stati coltivati in presenza di digesto peptico-triptico (PT) di gliadina a tempi di incubazione diversi.

Non è stato ancora del tutto chiarito come l'antigene primario, la gliadina, scateni la serie di eventi che portano alle tipiche lesioni della mucosa.

Dopo due ore di incubazione con la gliadina, si osserva, a livello della lamina propria, un aumento del numero delle cellule mononucleate (linfociti e macrofagi) che esprimono ICAM-1 e CD25 (recettore per l'IL-2), distinti in linfociti T (marcati con anticorpi anti-CD3) ed in macrofagi (marcati con anticorpi anti-CD68). Tra le 4 e le 12 ore d'incubazione si osserva, invece, la migrazione di tali cellule dalla lamina propria verso lo strato epiteliale. Il fenotipo delle cellule T migranti è CD4⁺/CD25⁺, mentre la distribuzione dei linfociti T CD8⁺ rimane

inalterata nei vari strati della mucosa. Inoltre, le cellule CD68+ (monociti e macrofagi) iniziano ad esprimere sulla loro superficie sia l'antigene B7 che le molecole MHC di classe II DQ2.

Dopo 24 ore di coltura, si osserva un'ulteriore migrazione di linfociti T e di macrofagi all'interno del compartimento subepiteliale. A livello epiteliale si evidenzia sugli enterociti delle cripte un'aumentata espressione delle molecole HLA-DR e del recettore per la transferrina (TFR). Infine, si osserva un'infiltrazione dell'epitelio a livello sia dei villi che delle cripte, da parte dei linfociti T con fenotipo CD8+/CD25- [115].

Sebbene da un punto di vista strettamente immunologico questo modello in vitro rappresenta una situazione di richiamo della risposta, e non esamina l'evento primario che induce la sensibilizzazione verso la gliadina, quest'ultimo resta, comunque, estremamente valido per studiare la dinamica immunologica della risposta all'antigene stesso.

Oltre quanto detto finora, è necessario tenere presente che la lesione mucosale, tipica della malattia, potrebbe essere anche dovuta a meccanismi diversi dalla semplice attivazione delle cellule T mucosali.

È stato, infatti, recentemente riportato che il danno morfologico potrebbe essere dovuto ad un'inappropriata apoptosi degli enterociti [116].

Le molecole coinvolte in questi fenomeni sono state identificate come membri della famiglia dei recettori del TNF (TNFR) e denominate Fas o CD95 e Fas Ligando (FasL o CD95L).

Studi recenti hanno riportato, infatti, che nella maggior parte degli enterociti dei soggetti celiaci con atrofia dei villi è possibile rilevare un'elevata frammentazione del DNA, evento centrale del fenomeno apoptotico, e che questo pattern reverte verso i valori normali dopo l'eliminazione del glutine dalla dieta e la conseguente restaurazione dello "*status quo*" mucosale [117].

Ulteriore conferma sperimentale a questa ipotesi viene da un recente studio in vitro, in cui è stata osservata l'interazione fra il recettore Fas espresso dagli enterociti (cellule bersaglio) dei pazienti celiaci ed il suo ligando, FasL, espresso dalle cellule mononucleate della lamina propria (effettori).

Secondo questi autori, tale interazione porterebbe alla morte degli enterociti e determinerebbe la conseguente lesione tissutale [118].

In questo fenomeno, è stato riportato anche il coinvolgimento di un'ulteriore citochina, l'interleuchina 15 (IL-15), rilasciata principalmente dai macrofagi che, come verrà spiegato successivamente, sembra giocare un ruolo molto importante nella patogenesi della malattia.

La IL-15 è capace di indurre l'espressione di Fas sugli enterociti. È stato dimostrato che la stimolazione in vitro di frammenti di mucosa intestinale di pazienti celiaci in remissione in presenza di IL-15, è in grado di riprodurre i risultati che si hanno quando la mucosa è stimolata in presenza di gliadina [119].

Tutte le considerazioni finora effettuate, che rappresentano una fase preliminare nello studio dei meccanismi che portano all'atrofia della mucosa intestinale, sembrano tuttavia inficiare l'attuale concetto "dogmatico" che i meccanismi immunopatogenetici della malattia celiaca siano centrati sul ruolo cruciale dei linfociti T.

Seppure l'attivazione dei linfociti T gliadina ristretti assolve un fondamentale ruolo chiave nella malattia celiaca, non è ancora del tutto chiaro del perché soltanto una piccola porzione di individui HLA-DQ2 e HLA-DQ8 positivi sviluppino un'attivazione delle cellule T gliadina ristrette ed il conseguente innesco del meccanismo immunopatogenetico.

Recenti studi in vitro hanno evidenziato la capacità dei frammenti di gliadina di indurre una risposta immunitaria innata nella mucosa intestinale dei soggetti celiaci.

Sembra che questa risposta innata sia la prima risposta immunitaria ad intervenire nei confronti della gliadina così come avviene normalmente in risposta a stimoli quali LPS (lipopolisaccaridi batterici), proteine virali e DNA batterico.

La risposta innata è particolarmente importante a livello della superficie mucosale, in quanto rappresenta la prima linea di difesa contro gli antigeni patogeni esterni.

Nei soggetti celiaci sembra che le cellule epiteliali e le cellule della lamina propria con capacità fagocitaria siano caratterizzate dalla presenza, sulle loro superfici, di specifici recettori definiti "pattern recognition receptors", i quali, dopo aver riconosciuto e legato i peptidi gliadinici, innescano il rilascio di citochine e chemochine proinfiammatorie, quale, ad esempio, IL-15.

Il rilascio di IL-15, come emerge da questi studi, attiverebbe le cellule presentanti l'antigene MHC-ristrette per i frammenti di glutine deamidati dalla transglutaminasi tissutale ed innescerebbe la risposta immunitaria adattativa precedentemente descritta.

Da questi lavori emerge che le due branche della risposta immunitaria, l'innata e l'adattativa, seppure con differenti funzioni, partecipano nella patogenesi della malattia celiaca.

L'importanza di queste nuove ricerche è data, inoltre, dalla scoperta che all'interno delle sequenze proteiche dei frammenti della gliadina si possono distinguere due diversi epitopi: non-immunodominante ed immunodominante, capaci uno di attivare la risposta immunitaria innata e l'altro quella adattativa [120].

Questa particolare ed inaspettata risposta innata al glutine potrebbe spiegare il perché soltanto una parte degli individui HLA-DQ2 e HLA-DQ8, positivi presenti nella popolazione generale sviluppano la malattia celiaca.

Forse in aggiunta ai geni già noti coinvolti nella patogenesi, potrebbero essercene altri, ad oggi ignoti, che predisporrebbero verso questa risposta innata. [Figura 7.2].

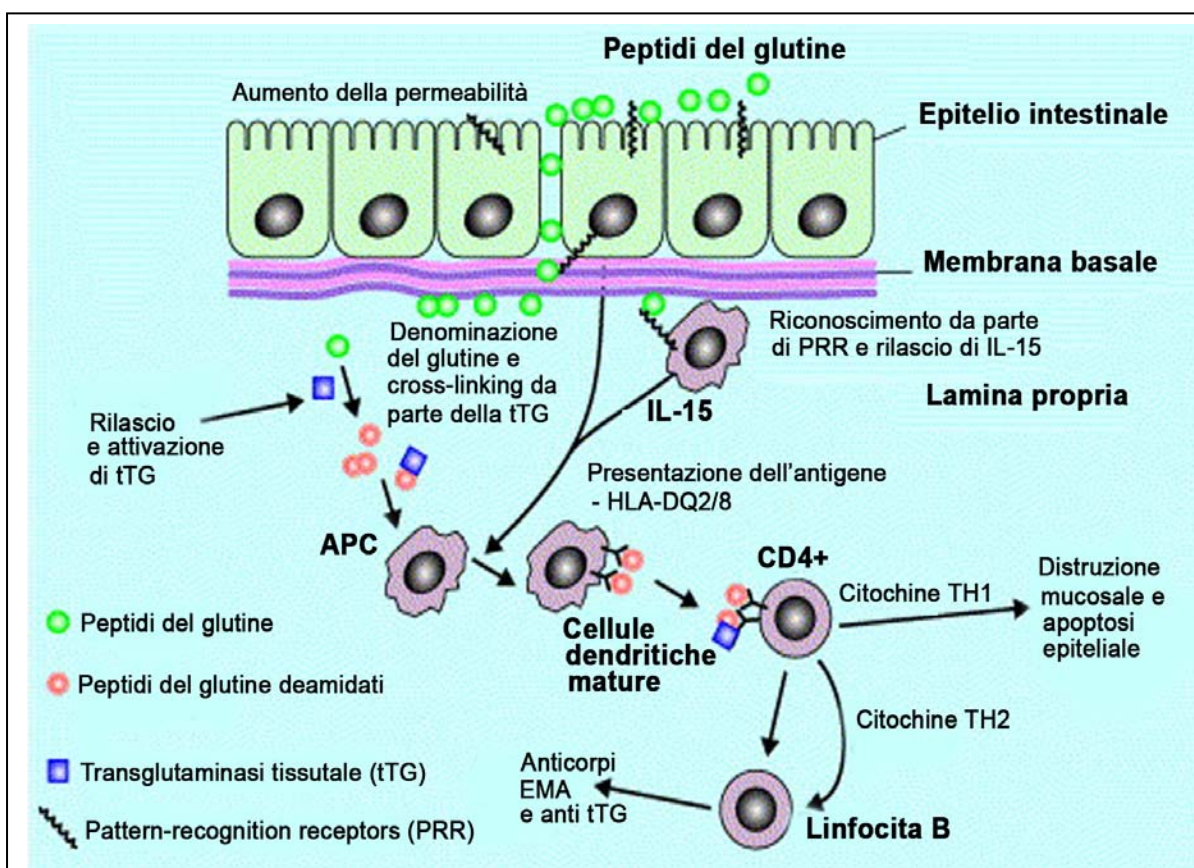


FIGURA 7.2 – RISPOSTE INNATA ED ADATTATIVA NELLA MALATTIA CELIACA

Formazione degli antigeni gliadinici dopo deaminazione da parte della tTG.

Le cellule presentanti l'antigene (APC) HLA-DQ2 o -DQ8 attivano le risposte delle cellule T del sistema adattativo (infiammazione e degenerazione del tessuto -Th1- o produzione di anticorpi -Th2-). Le cellule del sistema innato riconoscono i peptidi del glutine direttamente attraverso i recettori di ricognizione (pattern-recognition receptors, PRR) e rilasciano IL-15 che modula la risposta adattativa. Le cellule dendritiche ed i linfociti T migrano verso i linfonodi mesenterici (dove avviene la loro espansione clonale) e successivamente ritornano alla lamina propria. (Modificato da Maiuri et al., 2003).

7.2 RISPOSTA IMMUNITARIA UMORALE

La risposta umorale inizia quando i linfociti B quiescenti, presenti nella lamina propria, vengono in contatto con l'antigene grazie alle loro immunoglobuline di membrana a funzione

recettoriale. Per una completa attivazione e differenziazione in plasmacellule secernenti anticorpi o in linfociti B di memoria sono necessari ulteriori segnali forniti dai linfociti T CD4+.

Come precedentemente detto, le cellule T implicate nello sviluppo della risposta immunitaria di tipo umorale, sono le cellule Th2.

Il contatto fra linfocita B e linfocita T avviene in seguito alla riesposizione dell'antigene processato in associazione a molecole MHC di classe II da parte della cellula B ed è mediato da altre molecole, sia di adesione, quali LFA1 ed LFA3 presenti sulla cellula B che si legano con ICAM-1 ed il CD2 presente, invece, sulla cellula T, che di costimolazione, quali B7/BB1 presente sulla cellula B che si lega al CD28 espresso sulla cellula T. In seguito a questo contatto, il linfocita T rilascia diverse citochine (IL-4, IL-5, IL-10) che favoriscono l'ulteriore sviluppo delle cellule B ed influenzano la commutazione di classe immunoglobulinica.

Nei pazienti celiaci è stata rilevata una abnorme espressione sia di IL-10 che di TGF- β , che insieme cooperano al fine di incrementare la secrezione di anticorpi di isotipo IgA da parte delle cellule B attivate [120].

In ogni caso, per lo sviluppo, l'espansione clonale e la commutazione di classe, è necessario il legame tra il recettore CD40 espresso sulle cellule B ed il suo ligando (CD40L) che viene espresso esclusivamente sui linfociti T CD4+ attivati. L'interazione tra CD40 e CD40L è indispensabile per la corretta trasduzione dei segnali che portano all'attivazione delle cellule B ed alla sintesi anticorpale.

È noto che la gliadina induce un'attivazione del sistema immunitario nei soggetti affetti da malattia celiaca, ciò è supportato dall'esistenza di cloni di cellule T ristrette per la gliadina nella mucosa intestinale di pazienti celiaci e dalla produzione di anticorpi antigliadina (AGA) [5, 109].

Non è, però, ancora completamente chiaro il legame tra la gliadina e la sintesi di anticorpi antiendomisio (EMA), i marcatori di più alta specificità e sensibilità di malattia celiaca.

Non ci sono evidenze che supportano una cross-reattività o un mimetismo molecolare fra la gliadina e l'autoantigene responsabile della produzione degli EMA, di contro, diverse altre evidenze lasciano pensare che la gliadina possa essere implicata nello smascheramento di antigeni "self" [48, 121, 122].

La gliadina, pertanto, non costituirebbe di fatto l'antigene della malattia celiaca, ma rappresenterebbe solo una sorta di "avvio" che renderebbe disponibili per il riconoscimento immunologico epitopi criptici normalmente nascosti al sistema immunitario.

Quanto appena evidenziato potrebbe giustificare in qualche modo anche la presenza di diversi altri autoanticorpi (ad esempio anti-zonulina, anti-calreticulina, anti-actina) normalmente presenti nel siero dei pazienti celiaci in fase attiva di malattia [107, 123, 124].

Diversi studi sono stati effettuati al fine di capire il meccanismo con cui la gliadina possa dare luogo a questo smascheramento di autoantigeni.

Gli ultimi lavori hanno focalizzato l'attenzione sulla transglutaminasi tissutale (tTG). È stato, infatti, ipotizzato che la tTG, recentemente identificata come l'autoantigene responsabile della produzione degli EMA, giocherebbe un ruolo molto importante nella sintesi di questi ultimi [43].

La tTG è un enzima calcio-dipendente localizzato principalmente nel citoplasma delle cellule endoteliali, delle cellule della muscolatura liscia di vene e arterie, delle cellule mesangiali e dei fibroblasti [125], ed, in misura minore sulle membrane cellulari, nei nuclei e nella matrice extracellulare [126]. Essa catalizza la formazione di legami crociati ϵ -(γ -glutamil)-lisina tra il gruppo γ -carbossiammidico di un residuo glutamminico di una proteina e l' ϵ -amminogruppo di una lisina di un altro peptide [127].

La gliadina, proteina ricca in residui glutamminici, si presenta come un ottimo substrato per l'attività enzimatica della tTG.

L'ipotesi attualmente più accreditata sostiene che la gliadina penetrata nella lamina propria, a causa di un'alterata permeabilità epiteliale, verrebbe deamidata dall'enzima tissutale. La deamidazione dei frammenti della gliadina da parte della tTG porterebbe ad un cambiamento di carica nella molecola proteica del glutine incrementando così l'affinità di legame alle molecole HLA-DQ2 o HLA-DQ8 ed alla generazione di un nuovo epitopo che verrebbe presentato ai linfociti T, innescando la risposta immunitaria [113].

Questa risposta immunitaria porterebbe allo sviluppo di cloni di cellule T a profilo sia Th1 che Th2, questi ultimi, a loro volta, promuoverebbero lo sviluppo e l'attivazione di cloni di cellule B specifiche. I linfociti B attivati evolverebbero, quindi, in plasmacellule secernenti autoanticorpi [113]. [Figura 7.1].

8. SCOPO DEL LAVORO

Come precedentemente accennato, la malattia celiaca è una delle patologie gastroenterologiche più diffuse nel mondo, essa è definita come un'intolleranza permanente del piccolo intestino al glutine [5, 8, 10, 84].

L'evento cardine nella patogenesi della malattia è considerato essere un'anomala risposta immunitaria cellulo-mediata a livello della mucosa intestinale negli individui geneticamente predisposti [8, 10, 84].

I pazienti affetti da malattia celiaca mostrano una risposta immunitaria mediata da cellule T diretta contro la gliadina [128] ed inoltre, producono anticorpi diretti sia contro la gliadina stessa (anticorpi antigliadina, AGA) [31-33] che contro componenti della matrice cellulare di primati (anticorpi antiendomizio, EMA) [32, 129] e di tessuti umani [36, 130]. Quest'ultimo riscontro costituisce la prova della natura autoimmune della malattia celiaca.

A supporto della precedente osservazione, recentemente la transglutaminasi tissutale (t-TG) è stata identificata come il principale autoantigene correlato alla malattia celiaca [43], anche se altri autori hanno riportato che essa non può essere l'unico autoantigene responsabile della malattia e che, quindi, altre componenti autoimmuni devono necessariamente essere coinvolte nella sua patogenesi [37, 46, 101, 131, 132].

Negli ultimi anni è stata verificata per gli EMA una specificità prossima al 100%, mentre per la loro sensibilità sono stati riportati valori compresi tra il 74 ed il 100% [31, 32, 34, 39-42]. Questa sensibilità tendenzialmente più bassa rispetto alla specificità può essere aumentata a valori prossimi al 100% ricercando gli EMA non solo di isotipo IgA, ma anche di isotipo IgG1, come recentemente riportato [39-41].

La correlazione esistente tra gli EMA ed il danno della mucosa intestinale è nota, infatti tutti i pazienti con EMA positivi presentano cambiamenti della morfologia dei villi intestinali e/o segni di attivazione immunologica glutine-dipendenti rilevabili a livello della lamina propria [82, 115].

La presenza degli EMA nei pazienti affetti da malattia celiaca a dieta contenente glutine e la loro scomparsa dopo trattamento con dieta priva di glutine giustificano l'uso degli EMA stessi come marcatore fondamentale nello screening e nel follow-up dei pazienti celiaci.

Recentemente la mucosa intestinale è stata identificata come uno dei siti di produzione degli EMA, infatti è stato dimostrato che questi anticorpi vengono neosintetizzati e rilasciati nel mezzo di coltura di biopsie intestinali di pazienti celiaci in dieta priva di glutine dopo coltura, in opportune condizioni, in presenza di gliadina [48-50, 133].

In aggiunta a quanto detto, gli studi di coltura d'organo in vitro hanno anche dimostrato che il piccolo intestino dei pazienti celiaci è sensibile al glutine, riproducendo in vitro le caratteristiche tipiche della mucosa intestinale celiaca infiammata dopo coltura in presenza di gliadina [115].

Nonostante quanto detto, è stato riportato che la sensibilità al glutine può essere presente anche in presenza di un'architettura mucosale apparentemente normale [82].

Utilizzando il sistema di coltura d'organo in vitro è stato anche dimostrato che gli EMA appaiono ben prima dell'atrofia dei villi intestinali nella mucosa del piccolo intestino quando la dieta priva di glutine non è seguita in maniera corretta [115, 134].

In altri lavori sono stati investigati i cambiamenti degli AGA e degli EMA in bambini celiaci durante stimolazione in vivo con glutine come possibili predittori di ricaduta della malattia. Durante la stimolazione, gli EMA diventano positivi dopo gli AGA, suggerendo che essi non siano i primi anticorpi prodotti durante la ricaduta [134, 135].

In ogni caso, è necessario sottolineare che a tutt'oggi non c'è ancora modo di verificare la reale compliance alla dieta priva di glutine durante il trattamento e/o le piccole trasgressioni alla dieta stessa prima della completa guarigione.

In quest'ottica, un lavoro recente ha dimostrato una cross-reattività tra proteine del grano ed un autoantigene nucleare del peso di 55 KDa [136].

Questi autori hanno riportato che questa autoreattività IgA, specificamente correlata alla malattia celiaca, sparisce dopo una dieta priva di glutine ben condotta.

In aggiunta a quanto riportato, è stata osservata dal nostro gruppo nei pazienti celiaci testati per gli EMA IgA, la presenza di un pattern di reattività di fluorescenza nucleare (Nuclear Fluorescence Reactivity, NFR) sulla muscolatura liscia dell'esofago di scimmia, di significato tuttora ignoto.

Allo scopo di capire l'eventuale significato di questa osservazione e per caratterizzarne l'eventuale ruolo, è stata studiata una popolazione di pazienti celiaci in dieta priva di glutine per mezzo della determinazione degli EMA durante il trattamento.

È stato osservato che gli EMA sparivano progressivamente nei primi tempi della dieta priva di glutine. In tutti i pazienti studiati, durante la prosecuzione della dieta aglutinata, gli anticorpi antiendomio venivano sostituiti dalla NFR. Quest'ultima, così come avveniva per gli EMA, progressivamente diminuiva, fino a sparire in tempi più lunghi.

Scopo di questo lavoro è, quindi, studiare la NFR ed investigare se essa possa essere utilizzata nel follow-up dei pazienti celiaci durante il trattamento.

Inoltre, il lavoro è volto a verificare l'esistenza di un'eventuale correlazione della NFR con le trasgressioni alla dieta priva di glutine, al fine della verifica della tossicità in vivo di diversi alimenti, con un'attenzione particolare al ruolo dei diversi cereali.

9. **MATERIALI E METODI**

9.1 **PAZIENTI**

Gruppo 1: 20 pazienti adulti affetti da malattia celiaca (7 maschi e 13 femmine, età mediana 22,3 anni, range 18-46 anni).

Tutti i pazienti al momento dell'ingresso nello studio presentavano atrofia dei villi della mucosa duodenale ed EMA sierici positivi.

Questi pazienti sono stati sottoposti a dieta priva di glutine e seguiti per 12 mesi consecutivi. Durante questo periodo, ogni 15 giorni è stato prelevato un campione di sangue da ogni paziente al fine di valutare l'aderenza alla dieta.

Tutti e 20 i pazienti hanno dimostrato una buona compliance alla dieta senza glutine e, quindi, hanno completato lo studio.

Gruppo 2: 87 pazienti adulti affetti da malattia celiaca in stato di remissione completa della malattia (clinica, sierologica ed istologica) (31 maschi e 56 femmine, età mediana 31,3, range 19-54), dopo almeno 12 mesi di dieta priva di glutine.

Questi pazienti sono stati seguiti al fine di valutare la compliance alla dieta senza glutine dopo completa guarigione e le eventuali trasgressioni alla dieta stessa.

Tutti i pazienti sono stati seguiti per 12 mesi.

Gruppo 3: 15 soggetti non affetti né da malattia celiaca né da qualsiasi altra malattia autoimmune e che, inoltre, non erano familiari di primo grado di pazienti celiaci o di pazienti affetti da altre condizioni autotimmuni.

Campioni di sangue di questi soggetti sono stati prelevati ed utilizzati per la ricerca di EMA ed NFR.

Due di questi soggetti, che mostravano un pattern NFR-like, accettarono di sottoporsi ad una stretta dieta priva di glutine per almeno 12 mesi.

Ogni mese è stato prelevato un campione di sangue da questi soggetti per determinare EMA ed NFR.

9.2 **DETERMINAZIONE EMA E NFR**

Per il dosaggio degli anticorpi antiendomisio è stato utilizzato un kit commerciale (Eurospital, Trieste, Italia) che sfrutta la tecnica di immunofluorescenza indiretta su sezioni di esofago di scimmia.

Gli EMA IgA totali, IgA1 ed IgA2 sono stati determinati in campioni di siero diluiti 1:5 e nei surnatanti di coltura indiluiti.

Nella prima fase è stato incubato il campione in esame sulla sezione sopra descritta, a temperatura ambiente, per 30 minuti per i campioni di siero e per 45 minuti per i surnatanti di coltura, in camera umida.

Dopo una fase di lavaggio con PBS, è stato incubato l'anticorpo secondario. L'incubazione dell'anticorpo secondario è stata condotta a temperatura ambiente per 30 minuti in camera umida.

L'incubazione di un eventuale anticorpo terziario, ove richiesto, è stata condotta con le stesse modalità appena descritte per l'anticorpo secondario.

Una ulteriore fase di lavaggio ha preceduto il montaggio di un vetrino coprioggetto su quello contenente la sezione di esofago di scimmia, tra i due vetrini è stato interposto un medium di montaggio costituito da una soluzione di PBS-glicerolo.

I diversi anticorpi sono stati utilizzati alle seguenti diluizioni:

- anti-human IgA FITC (fluoresceina)-coniugato diluito 1:100 (Sigma, St. Louis, USA);
- anti-human IgA1 FITC-coniugato diluito 1:20 (Sigma);
- anti-human IgA2 non coniugato diluito 1:10 (ICN Biomedicals, Aurora, USA) ed il suo terziario (anti-mouse Fc γ) TRITC (rodamina)-coniugato diluito 1:20 (Sigma).

Anticorpi antiendomizio ed NFR sono stati valutati in cieco da tre differenti osservatori. Il grado di concordanza è stato del 99.6%.

9.3 DOPPIO STAINING

Allo scopo di valutare se le due differenti reattività osservate (EMA e NFR) erano dovute a differenti anticorpi e se le due reattività erano presenti simultaneamente, è stata eseguita un'analisi di doppio staining su campioni di siero di 11 pazienti celiaci appartenenti al gruppo 1 selezionati casualmente.

L'analisi è stata eseguita utilizzando due differenti antisieri (anti-human IgA1 ed anti-human IgA2) marcati con due differenti fluorocromi (rispettivamente FITC e TRITC) come definito nella sezione precedente.

9.4 ANTICORPI ANTINUCLEO

Al fine di definire in maniera puntuale l'identità della reattività di fluorescenza nucleare NFR, è stata preliminarmente studiata la possibilità di interferenza con i noti anticorpi antinucleo (ANA), correlati nell'uomo a tutta una serie di patologie autoimmuni non legate alla malattia celiaca.

Gli anticorpi antinucleo sono stati ricercati nei sieri di tutti i pazienti appartenenti al gruppo 1 in tre diversi momenti: quando gli EMA erano positivi, durante la scomparsa degli EMA e la comparsa della NFR ed alla scomparsa di quest'ultima.

La determinazione degli ANA è stata eseguita utilizzando un kit commerciale sfruttante la metodica dell'immunofluorescenza indiretta su sezioni di fegato di ratto e su cellule epiteliali umane (Sigma) secondo la metodologia descritta in letteratura [137, 138].

I risultati, valutati in cieco, sono stati comparati con controlli presentanti pattern omogeneo (ANA-H, homogenous), nucleolare (ANA-N, nucleolar) e puntiforme (ANA-S, speckled).

9.5 **COLTURA D'ORGANO**

Campioni biotici di mucosa duodenale sono stati ottenuti mediante esofagogastroduodenoscopia (EGDS) eseguita a scopi diagnostici.

Al fine di investigare se, così come per gli EMA, la mucosa intestinale è un sito di produzione della NFR, campioni biotici degli stessi 11 pazienti sottoposti all'analisi di doppio staining sono stati sottoposti a coltura d'organo in presenza ed in assenza di digesto peptico-triptico (PT) di gliadina (1 g/l) come precedentemente riportato per 48 ore a 37°C [50].

In breve, è stata utilizzata una metodica orientata principalmente all'ottenimento della maggior sensibilità possibile per la determinazione degli anticorpi antiendomizio (metodica di coltura in "batch").

Il frammento biotico è stato lavato in soluzione fisiologica e delicatamente posto in una provetta sterile contenente 500 µl di terreno di coltura. Il frammento è stato lasciato libero nel terreno e così coltivato per tempi variabili a 37°C.

La buona ossigenazione del campione è stata assicurata dalla colonna d'aria sovrastante il terreno di coltura [50].

Al termine della coltura i surnatanti di coltura sono stati prelevati e conservati a -70° C, quindi utilizzati per la ricerca degli EMA e della NFR.

Tutte le fasi operative della coltura d'organo sono state eseguite in ambiente sterile.

Il terreno di coltura è stato preparato come segue (preparazione per circa 20 ml di terreno):

- | | |
|--|--------|
| ▪ Trowel T8 medium (Eurobio, Les Ulis Cedex B, Francia) | 13 ml |
| ▪ NCTC 135 medium (Eurobio) | 4 ml |
| ▪ Siero di vitello fetale (FCS) (Eurobio) | 3 ml |
| ▪ l-glutamina 2 mmol/l (Eurobio) | 0.2 ml |
| ▪ PIS (penicillina 10000 KUI/l e streptomicina 10 g/l) (Eurobio) | 2 ml |

- Gentamicina 10 g/l (Eurobio) 0.04 ml

Il terreno è stato portato a pH 7.4 e quindi sterilizzato per mezzo di filtri sterili monouso da 0.22 µm.

In questa fase è stato aggiunto, quando richiesto, digesto peptico-triptico (PT) di gliadina fino ad una concentrazione finale di 1 g/l.

Per valutare la cinetica di produzione in vitro degli anticorpi responsabili della NFR, la loro eventuale presenza è stata determinata utilizzando un anticorpo monoclonale anti-human IgA2 a tempi differenti di coltura nei surnatanti di 9 pazienti appartenenti al gruppo 2, durante coltura con gliadina.

Di contro, la cinetica di produzione degli EMA in coltura è stata valutata attraverso l'utilizzo di un anticorpo monoclonale anti-human IgA1 agli stessi tempi e negli stessi pazienti studiati per la NFR.

La coltura è stata eseguita per tempi variabili da 30 minuti a 48 ore (con break points ad 1, 2, 4, 6, 12 e 24 ore) a 37°C, in presenza di PT di gliadina (1 g/l) utilizzando il metodo "in batch" sopra descritto [50].

Un campione biotico di ognuno di questi pazienti è stato coltivato anche in solo terreno privo di gliadina per 48 ore a 37°C come controllo interno.

9.6 ESAME ISTOLOGICO E MORFOMETRICO

Un frammento biotico, fissato in formaldeide al 10%, incluso in paraffina e tagliato in sezioni dello spessore di 3-5 µm è stato sottoposto a colorazione con ematossilina ed eosina seguita da analisi istologico-morfometrica al fine di valutare la presenza di cellule infiammatorie infiltranti la lamina propria della mucosa duodenale e di misurare il rapporto tra altezza dei villi e profondità delle cripte del Lieberkühn, che rappresenta un indice di atrofia della mucosa duodenale stessa.

Un rapporto tra altezza dei villi e profondità delle cripte <3:1 è considerato suggestivo di malattia celiaca.

Il grado di lesioni ed atrofia è stato valutato secondo classificazione di Marsh modificata da Oberhuber e collaboratori [47] [Tabella 1].

9.7 LINEE CELLULARI ED ESTRATTI PROTEICI

Linee cellulari cancerose umane di colon CaCO2 sono state coltivate in terreno Eagle modificato da Dulbecco (DMEn) supplementato con 2 mM di l-glutamina, 100 U/ml di

penicillina, 100 µg/ml di streptomycin (Gibco, Gaithersburg, USA) e 10% di siero di vitello fetale (FCS) (Sigma).

Le cellule sono state coltivate a 37°C in un'atmosfera costituita per il 95% di aria e per il 5% di CO₂. Dopo coltura le cellule sono state lavate 2 volte in PBS per rimuovere proteine eventualmente provenienti dal terreno e le proteine totali sono state estratte utilizzando il buffer di estrazione TNE (50 mM Tris/HCl a pH 7.8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% TRITON X-100) addizionato di inibitori delle proteasi, dopo incubazione in ghiaccio per 30 minuti.

Le proteine estratte (100 µg) sono state risolte per mezzi di SDS-PAGE (10% Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) e, quindi, trasferite su una membrana di nitrocellulosa (Protran-Nitrocellulose Transfer Membrane Schleicher & Schuell, Dassel, Germany).

9.8 FRAZIONAMENTO CELLULARE

Le cellule CaCO₂ sono state raccolte e sottoposte a due cicli di lavaggio in PBS al fine di rimuovere i componenti del terreno di coltura.

Per la preparazione delle frazioni nucleari e citosoliche si è proceduto come segue: il pellet cellulare è stato risospeso in 3 ml di medium RBS (10 mM Tris/HCl pH 7.4, 10 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF) ed incubato in ghiaccio per 10 minuti.

Le cellule sono state rotte utilizzando detergenti (NP-40 e Na-Desossicolato in concentrazioni, rispettivamente, 0.5% e 0.15%). Dopo incubazione in ghiaccio per 30 minuti, le cellule sono state omogeneizzate e l'omogenato ottenuto è stato centrifugato per 10 minuti a 2800 rpm, alla temperatura di 4°C.

Il surnatante, rappresentante la frazione citosolica è stato conservato a -20°C fino all'uso. Il rimanente pellet, contenente la frazione nucleare cruda è stato risospeso in 3 ml di medium RBS e centrifugato in un gradiente di saccarosio (30% di saccarosio in medium RBS) per 30 minuti a 4200 rpm a 4°C. Il pellet è stato risospeso in 500 µl di buffer di estrazione (10 mM Tris/HCl pH 7.4, 3 mM MgCl₂, 2 mM mercaptoetanolo, 1 mM PMSF) contenente 0.4 M di NaCl ed incubato in ghiaccio per 20 minuti. Dopo centrifugazione alla temperatura di 4°C, a 12000 rpm per 5 minuti, il pellet è stato risospeso in 500 µl di buffer di estrazione contenente 1 M NaCl, incubato in ghiaccio per 20 minuti e centrifugato ulteriormente alla temperatura di 4°C, a 12000 rpm per 5 minuti.

Il surnatante ottenuto dopo quest'ultima centrifugazione, rappresentante la frazione nucleare, è stato conservato a -20°C fino al momento dell'uso.

La purezza delle frazioni nucleare e citosolica è stata testata esponendo le frazioni su nitrocellulosa ad un antisiero di coniglio anti-human istone H2B (Chemicon, Temecula, CA).

9.9 CARATTERIZZAZIONE DEGLI AUTOANTIGENI IgA (IMMUNOBLOTTING)

Sieri ottenuti da 6 pazienti appartenenti al gruppo 1 selezionati casualmente sono stati analizzati per la reattività IgA contro proteine ottenute da cellule umane della linea CaCO2 a due tempi diversi.

Un campione di ognuno di questi pazienti è stato analizzato quando la NFR era presente, mentre un secondo è stato analizzato quando la NFR era scomparsa.

Gli estratti proteici totali e le frazioni nucleare e citosolica sono stati bolliti per 3 minuti e sottoposti ad SDS-PAGE.

Le proteine separate nel gel sono state trasferite su membrane di nitrocellulosa (Protran). Strisce di nitrocellulosa di 2 cm di ampiezza sono state tagliate dalle membrane e bloccate in buffer A (blocking buffer: 50 mM buffer sodio-fosfato pH 7.4, aggiunto di 0.5% Tween 20 e 0.5% BSA).

Le strisce sono state incubate overnight a 4°C con i sieri dei pazienti in esame diluiti 1:500 nello stesso blocking buffer, quindi sono state sciacquate 2 volte per 5 minuti ed una terza per 15 minuti con buffer B (50 mM di buffer sodio-fosfato pH 7.4, aggiunto di 0.5% Tween 20) e reincubate overnight a temperatura ambiente con un anticorpo policlonale di capra anti-human IgA perossidasi-coniugato (Chemicon) diluito 1:8000 in blocking buffer A. Le strisce sono state, quindi, lavate, asciugate ed infine esposte ad Hyperfilms ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) per circa 3-5 secondi.

10. RISULTATI

10.1 TIME-COURSE DELLA NFR

Tutti i pazienti appartenenti al gruppo 1 mostravano, dopo 76 ± 34 giorni di stretta dieta priva di glutine, la scomparsa degli EMA nel siero [Fig. 10.1*a*].

Al momento della scomparsa degli EMA, è stata osservata la presenza di NFR in tutti questi pazienti [Fig. 10.1*b*].

La NFR spariva completamente dopo ulteriori 75 ± 41 giorni di dieta priva di glutine [Fig. 10.2].

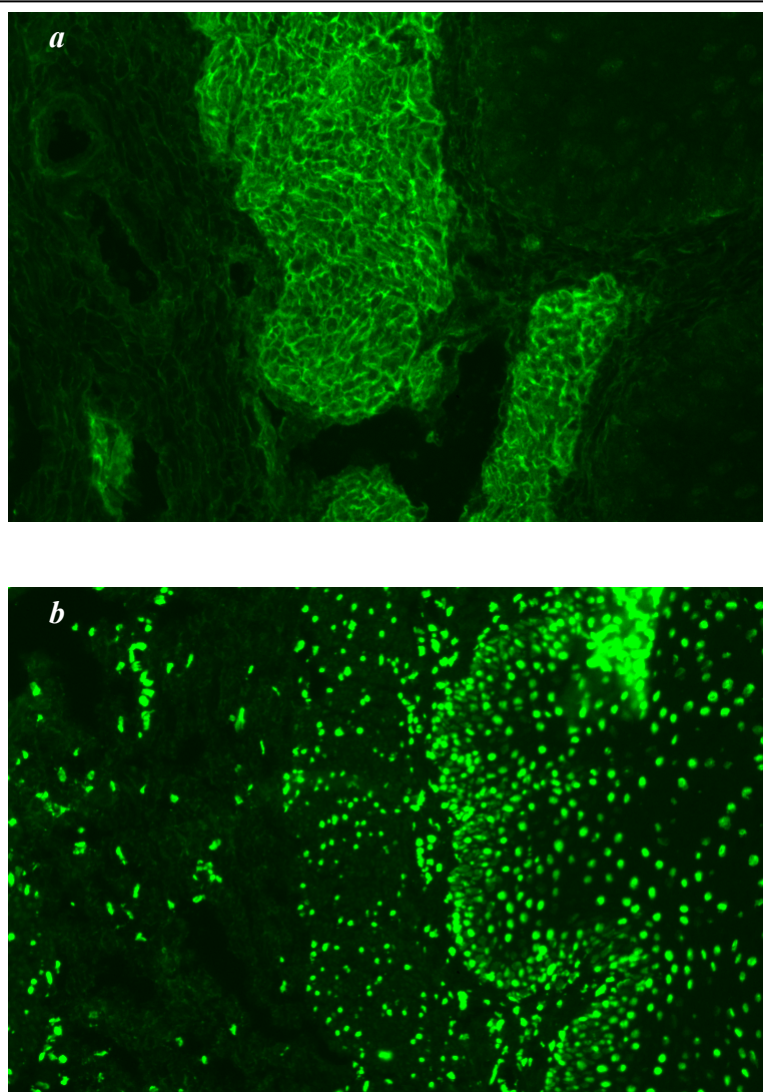
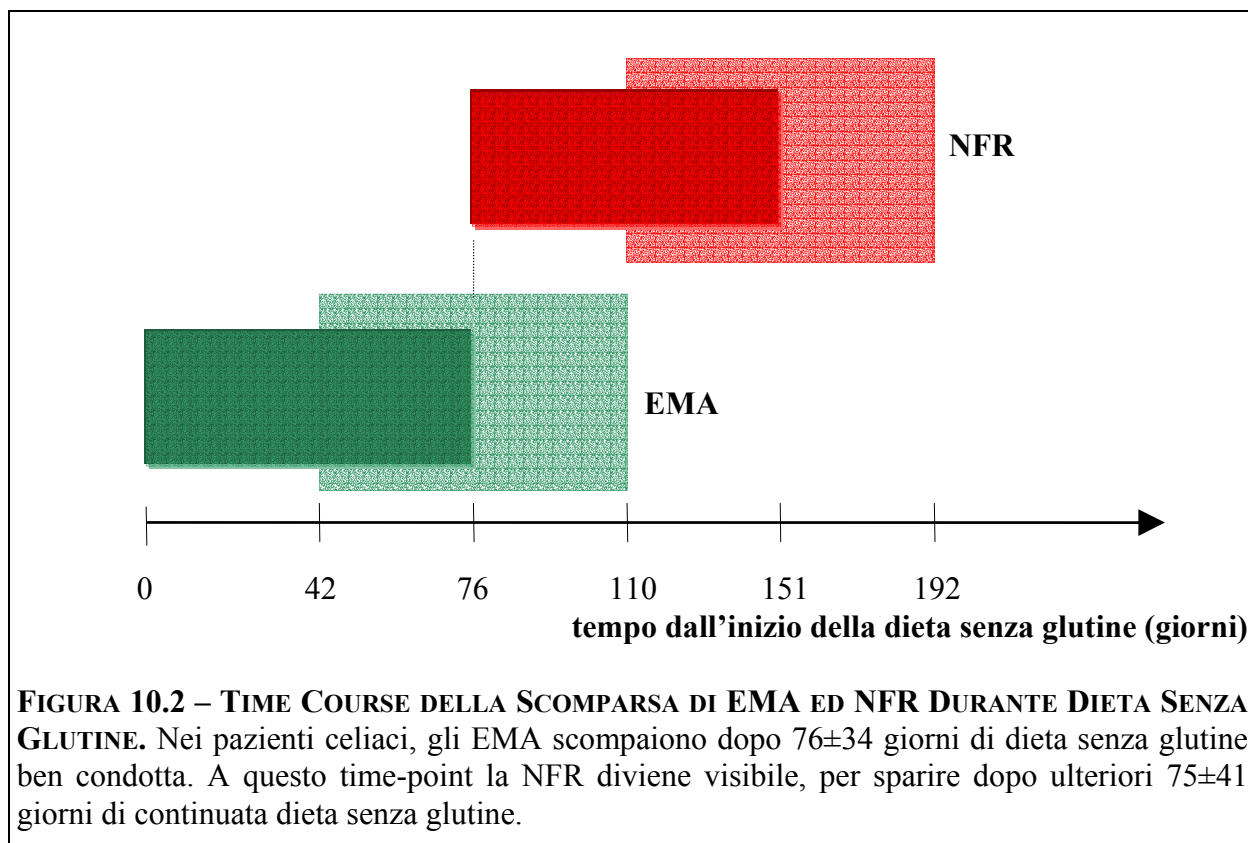


FIGURA 10.1 – ASPETTO MICROSCOPICO DI EMA ED NFR.

a) EMA positivo. Si osserva il caratteristico pattern di fluorescenza reticolare verde-mela che circonda la muscolaris mucosæ dell'esofago di scimmia. **b)** NFR positivo. La positività NFR è caratterizzata da un pattern puntiforme di fluorescenza sui nuclei delle cellule muscolari ed epiteliali dell'esofago di scimmia. (Ingrandimento 200X).



La NFR è stata anche studiata negli 87 pazienti celiaci trattati, sia EMA che NFR negativi, appartenenti al gruppo 2.

In questo gruppo, 24 pazienti sono stati trovati NFR positivi ma EMA negativi, in un certo momento durante il follow-up. Un'accurata valutazione anamnestica ha permesso di dimostrare che questi pazienti avevano introdotto piccole quantità di glutine nella loro dieta durante l'ultimo mese di follow-up.

Dieci di questi pazienti hanno continuato ad introdurre piccole quantità di glutine ed in 2-3 mesi sono diventati EMA positivi. D'altro canto, i rimanenti 14 pazienti, che hanno ricominciato una stretta dieta priva di glutine, hanno mostrato la scomparsa della NFR dopo 2 mesi.

10.2 CARATTERIZZAZIONE DELLA NFR

In tutti gli 11 pazienti studiati la NFR era sempre associata all'isotipo IgA2, mentre gli EMA erano sempre associati all'isotipo IgA1, con l'eccezione di 3 pazienti che presentavano EMA sia IgA1 che IgA2 [Tabella 2].

Gli anticorpi testati reagivano su due differenti strutture tissutali non sovrapposte ed erano presenti contemporaneamente nei sieri dei pazienti celiaci non a dieta senza glutine [Figure 10.3*a*, 10.3*b*, 10.3*c*].

TABELLA 2

CARATTERIZZAZIONE IMMUNOGLOBULINICA DI EMA ED NFR.

Gli stessi risultati sono stati ottenuti sia nei campioni di siero che nei surnatanti di coltura analizzati.

	EMA	NFR
Total IgA	11/11	0/11
IgA1	11/11	0/11
IgA2	3/11	11/11

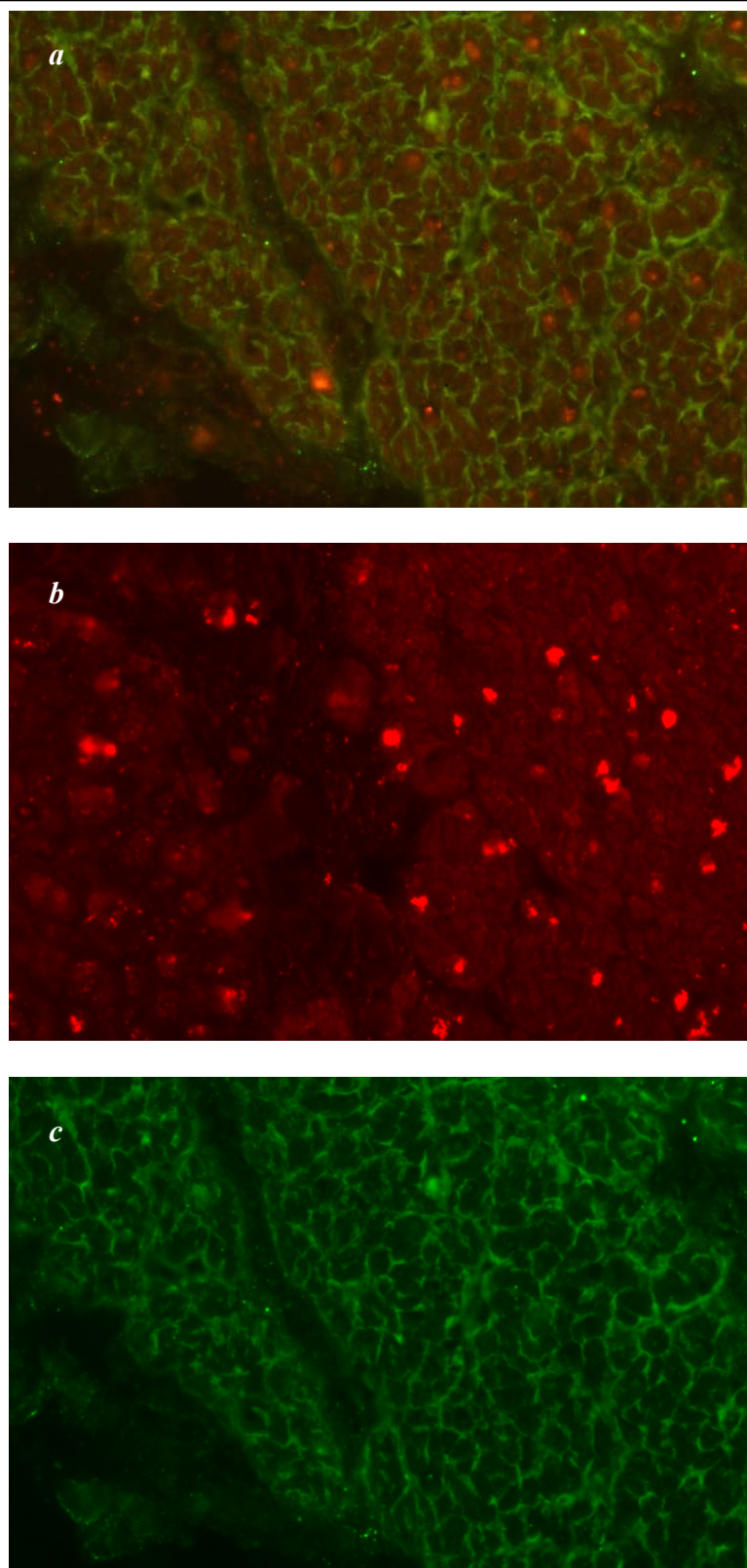


FIGURA 10.3 – DOPPIO STAINING DI EMA ED NFR.

a) Doppio staining di EMA ed NFR su sezioni di esofago di scimmia. Gli EMA sono stati marcati con anti-human IgA1 FITC-coniugato (verde), mentre la NFR con anti-human IgA2 rivelato con un anticorpo TRITC-coniugato (rosso). EMA ed NFR reagiscono su due strutture differenti e non sovrapposte, ed appartengono a due diverse sottoclassi IgA. *b)* La stessa sezione marcata solo per NFR. *c)* La stessa sezione marcata solo per EMA.

I sieri di 6 pazienti testati per la reattività IgA contro proteine da cellule CaCO₂ su strisce di nitrocellulosa, mostravano una reattività specifica a 65 e 49 KDa al primo time-point, quando la NFR era presente.

La reattività descritta non era più rilevabile in sieri ottenuti dagli stessi pazienti al secondo time-point, ovvero quando la NFR era scomparsa.

Gli studi di frazionamento cellulare hanno dimostrato che la specifica reattività a 65 e 49 KDa era presente negli estratti cellulari totali e nella loro frazione nucleare, mentre non era invece determinabile nella loro frazione citosolica [Figura 10.4a].

La dimostrazione della corretta separazione delle frazioni nucleari e citosoliche è stata verificata attraverso la reazione del siero di coniglio anti-istone umano H2B con gli estratti cellulari totali e con la loro frazione nucleare, ma non con la loro frazione citosolica [Figura 10.4b].

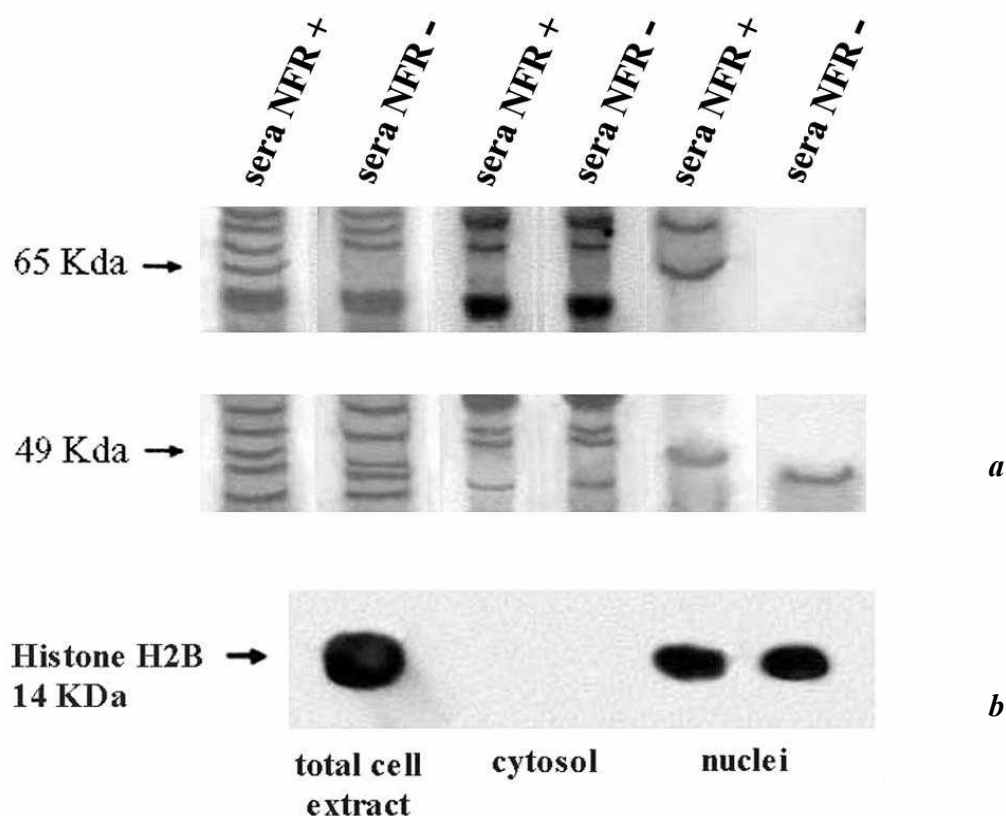


FIGURA 10.4 – REATTIVITÀ SIERICA IgA DI PAZIENTI CELIACI CONTRO PROTEINE DERIVATE DA CELLULE INTESTINALI UMANE SU NITROCELLULOSA.

a) Strisce di nitrocellulosa contenenti le proteine umane sono state incubate con sieri NFR positivi e con sieri degli stessi pazienti dopo GFD alla scomparsa della NFR. Le frecce indicano la posizione delle componenti cross-reattive a 65 e 49 KDa. La reattività sierica IgA è stata rilevata negli estratti cellulari totali e nelle loro frazioni nucleari, ma non in quelle citosoliche. Essa spariva con la scomparsa della NFR stessa dopo GFD. I pesi molecolari sono indicati sul lato sinistro.

b) Per verificare la purezza delle frazioni nucleare e citosolica, gli estratti cellulari totali e loro frazioni nucleari e citosoliche dopo blot su nitrocellulosa sono stati testati con un siero di coniglio anti-istone umano H2B.

10.3 CINETICA DI PRODUZIONE DELLA NFR

I risultati della tipizzazione delle sottoclassi IgA1 ed IgA2, rispettivamente, per la determinazione degli EMA e della NFR nei surnatanti di coltura sono coincidenti con quelli riportati per le determinazioni nei campioni di siero [Tabella 2].

La NFR appare dopo sole 4 ore di coltura in 3 campioni sui 9 testati (33.3%) ed è determinabile nel 100% dei campioni dopo 6 ore di coltura.

Agli stessi time points gli EMA non erano, invece, mai determinabili.

Per tempi di coltura più lunghi (24 e 48 ore) si osserva la presenza simultanea di EMA ed NFR [Figura 10.5].

Agli stessi time points appena esaminati, né EMA né NFR erano determinabili dopo coltura eseguita in solo mezzo di coltura senza aggiunta di gliadina.

Dodici dei 24 pazienti in dieta senza glutine che in un certo momento del follow-up presentarono risultati positivi per NFR ma negativi per EMA, sono stati sottoposti ad EGDS ed i campioni biotici, così ottenuti sono stati posti in coltura in presenza ed in assenza di PT-gliadina.

In questi pazienti sia EMA che NFR erano determinabili nei surnatanti di coltura indipendentemente dalla presenza o dall'assenza di gliadina.

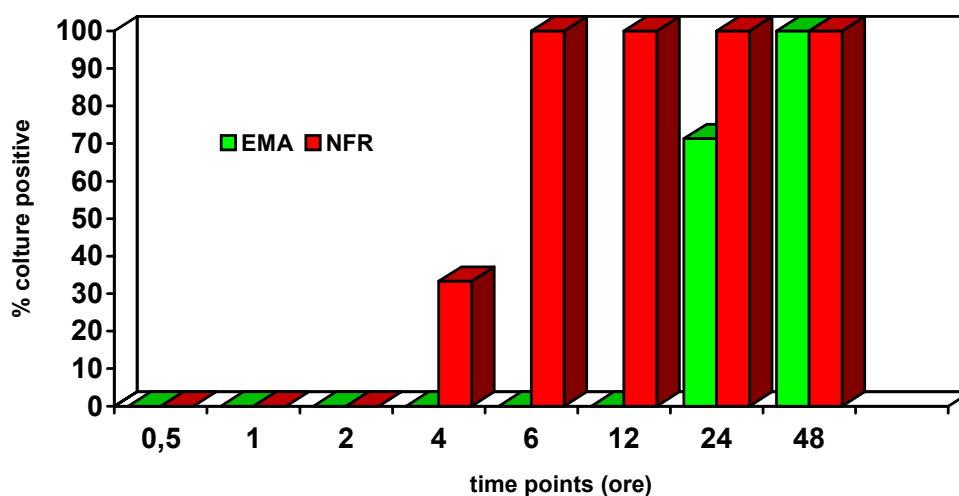


FIGURA 10.5 – TIME COURSE DELLA PRODUZIONE IN VITRO DI EMA ED NFR DURANTE CULTURA CON GLIADINA.

Campioni biotici di mucosa intestinale di pazienti celiaci in GFD sono stati stimolati con PT-gliadina (1 g/l). La NFR appare prima degli EMA durante la coltura. Dopo 6 ore NFR era neosintetizzata da tutti i campioni esaminati, mentre gli EMA non appaiono prima di 24 ore di stimolo (71,3% dei campioni) e sono presenti in tutti i campioni solo dopo 48 h.

10.4 ANTICORPI ANTINUCLEO

Gli anticorpi antinucleo (ANA) sono risultati positivi in 2 pazienti sui 20 totali testati (10,0%).

In entrambi i casi la positività era relativa al pattern puntiforme (ANA-S) ed i campioni erano sempre positivi indipendentemente dal time point a cui veniva effettuata la ricerca.

10.5 CONTROLLI

Nessuno dei 15 soggetti esaminati presentava positività per gli EMA, mentre 11 di essi presentavano un pattern NFR-like sulle sezioni di esofago di scimmia.

Due dei soggetti con pattern sierico NFR-like hanno accettato di sottoporsi ad una stretta dieta senza glutine per 12 mesi.

Ogni mese è stata eseguita una determinazione di EMA ed NFR, che ha dimostrato l'assenza di qualsiasi cambiamento nel pattern NFR-like, che quindi, risultava del tutto glutine-indipendente.

La caratterizzazione immunoglobulinica del pattern NFR-like ha permesso di rilevare che questi anticorpi erano indifferentemente di isotipo IgA1 ed IgA2 e che la loro localizzazione era comunque nucleare.

11. DISCUSSIONE

La natura autoimmune della malattia celiaca è, ad oggi, ampiamente accettata [36, 130] ed il più importante autoantigene coinvolto sembra essere la transglutaminasi tissutale [43], nonostante alcuni autori abbiano riportato che essa non può essere l'unico autoantigene responsabile dello sviluppo di questa patologia, ipotizzando che altre componenti autoimmuni, al momento ancora sconosciute, devono essere coinvolte nella patogenesi della malattia stessa [37, 46, 101, 131, 132].

In quest'ottica, un recente lavoro ha dimostrato l'esistenza di una cross-reattività IgA-mediata, specificamente correlata alla malattia celiaca, tra proteine del grano ed un autoantigene nucleare di 55 KDa. Questa cross-reattività spariva completamente dopo rigorosa dieta senza glutine [136].

In aggiunta a quanto appena evidenziato, il nostro gruppo ha rilevato, durante la determinazione degli anticorpi antiendomisio (EMA), l'esistenza di una reattività di fluorescenza nucleare (NFR) sulla muscolatura liscia dell'esofago di scimmia di significato inizialmente ignoto.

La natura nucleare di questo pattern di fluorescenza è stata evidenziata attraverso gli esperimenti di frazionamento cellulare. Infatti, tutti i sieri ottenuti da pazienti mentre la NFR era presente hanno mostrato la presenza di una specifica reattività IgA negli estratti delle proteine cellulari totali e nella loro frazione nucleare, che era invece assente nella frazione citosolica [Figura 10.4].

La reattività nucleare IgA descritta appare diretta contro autoantigeni ancora ignoti a 65 e 49 KDa ed, essendo stata determinata contro proteine estratte da cellule della linea umana di carcinoma colonico CaCO₂, è definibile come autoimmune.

In questo lavoro, inoltre, è stato anche dimostrato che questa autoreattività è glutine-dipendente e, quindi, altamente specifica per la malattia celiaca. Essa era, infatti, presente in tutti i campioni di siero esaminati quando la NFR era positiva, mentre spariva con la scomparsa della NFR stessa [Figura 10.4].

Gli anticorpi antiendomisio sono ad oggi comunemente accettati come marcatore sierologico della malattia celiaca, sulla base dei loro elevati valori di sensibilità e specificità [31, 32, 34, 39-42].

La presenza degli EMA nel siero risulta essere strettamente correlata, nella cosiddetta enteropatia glutine-sensibile, con la presenza di segni di attivazione immunologica della

mucosa intestinale, indipendentemente sia dall'assenza di atrofia dei villi intestinali che dall'assenza di una predisposizione genetica per la malattia celiaca [82, 115].

Gli anticorpi antiendomio scompaiono durante il ripristino della normalità fisiologica a livello della mucosa intestinale, mentre dopo stimolazione con gliadina, la loro ricomparsa è in grado di predire la ricaduta mucosale [134].

Nel loro insieme, tutti questi dati permettono di stabilire che gli EMA possono essere utilizzati in sicurezza come marcatori sierologici affidabili nello screening e nel follow-up dei pazienti affetti da malattia celiaca.

La cinetica degli EMA, a tutt'oggi, non è ancora ben definita, in quanto mancano studi sufficienti al riguardo.

In questo lavoro è stato dimostrato che la loro scomparsa dal siero dei pazienti celiaci è completa nel giro di 75 ± 34 giorni dall'inizio di una stretta dieta senza glutine. A questo time-point, la reattività di fluorescenza nucleare NFR diviene visibile e persiste per ulteriori 75 ± 41 giorni, durante il proseguimento della dieta senza glutine [Figura 10.2].

Sulla base della differente localizzazione dei pattern di fluorescenza [Figure 10.1 e 10.3] e della differente cinetica di comparsa-scomparsa [Figure 10.2 e 10.5], è ipotizzabile che le due reattività in studio siano correlate a due differenti autoanticorpi.

Infatti, i due differenti pattern di fluorescenza non sono mai osservabili contemporaneamente durante la determinazione degli EMA, suggerendo così che la NFR abbia tempi di comparsa differenti dagli EMA o che gli EMA stessi possano mascherare la sottostante NFR, comunque presente [Figure 10.1 e 10.3]. Ciò potrebbe essere giustificato dalla caratterizzazione immunoglobulinica, per cui gli EMA in massima parte IgA1, che costituiscono fino al 70-80% delle IgA totali, competerebbero in maniera preponderante rispetto alla NFR, totalmente di sottotipo IgA2, per l'anticorpo secondario utilizzato nel dosaggio antiendomio standard, costituito da un antisiero anti IgA umane totali.

I dati ottenuti dall'analisi di doppio staining dimostrano, inoltre, che i due differenti pattern di fluorescenza evidenziati non sono mai sovrapposti [Figura 10.3].

Questa evidenza, suggerisce ulteriormente che la NFR è dovuta ad autoanticorpi differenti dagli EMA e che le due reattività sono presenti simultaneamente, quantomeno nei pazienti celiaci non trattati.

Per tutto quanto finora detto, si può concludere che questi ultimi risultati cambiano il time-course della NFR [Figure 10.2 e 10.5].

La comparsa degli anticorpi responsabili della NFR durante la sospensione del glutine dalla dieta, insieme alla persistenza dei segni e sintomi clinici della malattia celiaca quando questi anticorpi sono positivi, mentre gli EMA sono già scomparsi dal siero, suggerisce che la determinazione della NFR stessa potrebbe rappresentare un utile strumento al fine di determinare il momento giusto per eseguire la biopsia di conferma diagnostica, dopo dieta senza glutine.

I dati ottenuti in questo lavoro dimostrano che, dopo la reintroduzione di piccoli quantitativi di glutine nella dieta di pazienti celiaci in remissione, la NFR diviene positiva nel giro di pochi giorni. Di contro, dopo la comparsa della NFR, gli EMA persistono negativi per almeno altri due mesi.

Gli anticorpi della NFR, pertanto, sembrano essere molto più sensibili degli EMA come marcatore precoce di riattivazione, suggerendo l'ulteriore possibilità di utilizzarli nell'accurato follow-up dei pazienti celiaci trattati dopo guarigione completa.

Come già precedentemente dimostrato, gli anticorpi antiendomizio sono determinabili nei surnatanti di colture di biopsie intestinali di pazienti celiaci non trattati e, dopo stimolazione con peptidi della gliadina, nei surnatanti di coltura di campioni bioptici di pazienti celiaci trattati [48-50].

La caratterizzazione del sottoisotipo IgA ha rivelato che gli EMA sono sempre e rigorosamente IgA1.

Gli anticorpi responsabili della NFR non erano determinabili nei surnatanti di coltura da biopsie di pazienti celiaci trattati quando non veniva eseguita stimolazione in vitro con gliadina, ma essi erano neosintetizzati e, quindi, determinabili dopo stimolazione con gliadina, suggerendo che, così come per gli EMA, anche essi siano prodotti dalla mucosa intestinale.

In aggiunta a quanto appena detto, i dati di questo lavoro dimostrano che gli anticorpi della NFR appartenevano sempre al sottoisotipo IgA2.

Gli studi di cinetica dei marcatori anticorpali in esame, dimostrano che gli anticorpi della NFR vengono prodotti in tempi piuttosto precoci (4-6 ore) durante stimolazione in vitro con gliadina, mentre gli EMA iniziano ad essere determinabili dopo almeno 24 ore di stimolo [Figura 10.5].

Questi risultati ottenuti attraverso studi in vitro sono totalmente coincidenti con quelli ottenuti durante la ricaduta glutine-dipendente osservabile in vivo nei pazienti celiaci dopo trasgressioni alla dieta priva di glutine.

In ultima analisi, in questo lavoro è stato altresì dimostrato che la prevalenza degli anticorpi antinucleo “classici” (ANA), di norma correlati ad altre patologie autoimmuni, tra cui spicca il lupus eritematoso sistemico (LES), è estremamente minore rispetto a quella osservata per la NFR, quindi è ragionevolmente ipotizzabile che gli anticorpi della NFR siano differenti ed indipendenti dai noti ANA.

La presenza di un pattern definito NFR-like in alcuni dei controlli esaminati potrebbe suggerire una bassa specificità della NFR nel monitoraggio dei pazienti celiaci, nella realtà, però, è opportuno sottolineare che, prima di tutto, gli anticorpi della NFR appartengono ad un sottoisotipo IgA differente da quello a cui appartengono quelli responsabili del pattern NFR-like osservati nei controlli.

In aggiunta, nei soggetti appartenenti alla popolazione di controllo, il pattern NFR-like non è mai associato agli EMA, differentemente da quanto osservato per quel che concerne le relazioni tra EMA ed NFR nei pazienti celiaci.

Prova ulteriore della presenza “casuale” del pattern NFR-like nei controlli è stata ottenuta grazie allo studio di due pazienti della popolazione di controllo che, sottoposti a 12 mesi di dieta senza glutine, non hanno evidenziato nessun cambiamento nel pattern NFR-like stesso, dimostrandone così l’assoluta mancanza di glutine-dipendenza, mentre in tutti i pazienti celiaci la NFR è strettamente glutine-dipendente, carattere questo fondamentale per qualsivoglia ipotetico marcatore eventualmente utilizzabile nell’armamentario diagnostico della malattia celiaca.

In conclusione, in questo studio è stato dimostrato che la reattività di fluorescenza nucleare è dovuta ad un nuovo autoanticorpo, in precedenza ignoto, glutine-dipendente e, quindi, correlato alla malattia celiaca.

La valutazione diagnostica di questo anticorpo potrebbe assumere notevole rilevanza al fine di indirizzare correttamente la dieta priva di glutine nei pazienti affetti da malattia celiaca durante il trattamento, nonché al fine di un eventuale utilizzo per aumentare l’accortezza del follow-up nei pazienti celiaci già trattati, nei casi aperti al sospetto di piccole trasgressioni dietetiche dovute all’introduzione più o meno consapevole di glutine o di altri cereali considerati “tossici”.

In quest'ultima ottica, quindi, è possibile pensare anche ad un utilizzo della NFR come marcatore sierologico “in vivo” di eventuali effetti tossici dovuti all'ingestione dei diversi cereali da parte di pazienti celiaci in fase di guarigione.

12. BIBLIOGRAFIA

1. Gee S. On the coeliac affection. St. Bartholomew Hosp Rep 1888;24:17-20.
2. Dicke WK, Weijer HA, Van de Kamer JH. Celiac disease. II. The presence in wheat of the factor having a deleterious effect in cases of celiac disease. Acta Paediatr 1953;42:34-42.
3. Van de Kamer JH, Weijer HA, Dicke WK. Celiac disease. IV. An investigation into the injurious constituents of wheat in connection with their action on patients with celiac disease. Acta Paediatr 1953;42:223-231.
4. Sollid LM, McAdam SN, Molberg O, Queasten H, Arentz-Hansen H, Louka AS, Lundin KEA. Genes and environment in celiac disease. Acta Odontol Scand 2001;59:183-186.
5. Murray JA. The widening spectrum of celiac disease. Am J Clin Nutr 1999;69:354-365.
6. Greco L, Maki M, Di Donato F, Visakorpi JK. Epidemiology of coeliac disease in Europe and in the Mediterranean area in "Common food intolerances 1: epidemiology of coeliac disease". A cura di Auricchio S e Visakorpi JK in "Dynamic Nutrition Research", Karger, Basel, vol. 2, pp. 25-44, 1992.
7. Greco L. From the Neolithic revolution to gluten intolerance: benefits and problems 1997;24:S14-S16
8. Maki M, Collin P. Coeliac disease. Lancet 1997;349:200-203.
9. Picarelli A, Sabbatella L, Di Tola M, Anania MC. 2001 odyssey in celiac disease. Gastroenterol Internat 2000;13:154-158.
10. Fasano A, Catassi C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. Gastroenterology 2001;120:636-651.
11. Ciclitira PJ. AGA technical review on celiac sprue. Gastroenterology 2001;120:1526-1540.
12. De Block CEM, De Leeuw IH, Vertommen JJF, Rooman RPA, Du Caju MVL, Van Campenhout CM, Weyler JJ, Winnock F, Van Autreve J, Gorus FK. Beta-cell, thyroid, gastric, adrenal and coeliac autoimmunity and HLA-DQ types in type I diabetes. Clin Exp Immunol 2001;126:236-241.
13. Not T, Tommasini A, Tonini G, Buratti E, Pocecco M, Tortul C, Valussi M, Crichiutti G, Berti I, Trevisiol C, Azzoni E, Neri E, Torre G, Martellosi S, Soban M, Lenhardt A, Cattin L, Ventura A. Undiagnosed coeliac disease and risk of autoimmune disorders in subjects with type I diabetes mellitus. Diabetologia 2001;44:151-155.
14. Valentino R, Savastano S, Tommaselli AP, Dorato M, Scarpitta MT, Gigante M, Micillo M, Paparo F, Petrone E, Lombardi G, Troncone R. Prevalence of coeliac disease in patients with thyroid autoimmunity. Horm Res 1999;51:124-127.
15. Hadjivassiliou M, Gibson A, Davies-Jones GA, Lobo AJ, Stephenson TJ, associated with the cultivation of wheat. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1997;24:S14-S16
16. Ventura A, Magazzù G, Greco L for the SIGEP Study Group for autoimmune disorders in celiac disease. Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. Gastroenterology 1999;117:297-303.
17. Kristiansen OP, Larsen ZM, Pociot F. CTLA-4 in autoimmune diseases: a general susceptibility gene to autoimmunity? Genes Immun 2000;1:170-184.
18. Wucherpfennig KW. Insight into autoimmunity gained from structural analysis of MHC-peptide complexes. Curr Opin Immunol 2001;13:650-656.
19. Catassi C, Ratsch IM, Fabiani E, Rossin M, Bordicchia F, Candela F, Coppa GV, Giorgi PL. Coeliac disease in the year 2000, exploring the iceberg. Lancet 1994;343:200-203.
20. Davidson LSP, Fountain JR. Incidence of sprue syndrome with some observations on the natural history. BMJ 1950;1:1157-1161.
21. Mylotte M, Egan-Mitchell B, McCarthy CF, McNicholl B. Incidence of celiac disease in the West of Ireland. BMJ 1973;1:703-705.
22. Logan RFA, Rifking EA, Busuttill A, Gilmours HM, Ferguson A. Prevalence and incidence of celiac disease in Edinburgh and the Lothian region of Scotland. Gastroenterology 1986;90:334-342.
23. Van Stirum J, Baerlocker K, Fanconi A, Gugler E, Shmerling DH. The incidence of celiac disease in children in Switzerland. Helv Pediatr Acta 1982;37:421-430.
24. Catassi C, Fabiani E, Ratsch IM, Coppa GV, Giorgi PL, Pierdomenico R. The coeliac iceberg in Italy. A multicentre antigliadin antibodies screening for coeliac disease in school-age subjects. Acta Paediatr Suppl 1996;412:29-35.
25. Talley NJ, Valdovinos M, Petterson TM, Carpenter HA, Melton L Jr. Epidemiology of celiac sprue: a community-based study. Am J Gastroenterol 1994;89:843-846

26. Kolho KL, Farkkila MA, Savilahti E. Undiagnosed celiac disease is common in Finnish adults. *Scand J Gastroenterology* 1998;33:1280-1283.
27. Not T, Horvath K, Hill D, Partanen J, Hammed A, Magazzu G, Fasano A. Celiac disease risk in the USA: high prevalence of antiendomysium antibodies in healthy blood donors. *Scand J Gastroenterol* 1998;33:494-498.
28. Farrell RJ, Kelly CP. Diagnosis of celiac sprue. *Am J Gastroenterol* 2001;96:3237-3246.
29. Logan RFA. Problems and pitfalls in epidemiological studies of celiac disease. *Din Nutr Res* 1992;2:14-24.
30. Walker-Smith JA, Guandalini S, Schmitz J, Schmerling DM, Visakorpi JK. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. *Arch Dis Child* 1990;65:909-911.
31. Corrao G, Corazza GR, Andreani ML, Torchio P, Valentini RA, Galatola G, Quaglino D, Gasbarrini G, Di Orio F. Serological screening of celiac disease: choosing the optimal procedure according to various prevalence values. *Gut* 1994;35:771-775.
32. Bottaro G, Volta U, Spina M, Rotolo N, Sciacca A, Musumeci S. Antibody pattern in childhood celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997;24:559-562.
33. Picarelli A, Triglione P, Mariani P, Di Giovambattista F, Greco M, Gurnari M, Paoluzi P, Bonamico M, Ballati G. Use of a threshold serum level of anti-gliadin antibodies improves diagnostic efficiency of the test in adult coeliac disease but is unreliable as a screening test. *Ital J Gastroenterol* 1996;28:70-75.
34. Ferreira M, Lloyd Davies S, Butler M, Scott D, Clark M, Kumar P. Endomysial antibody: is it the best screening test for celiac disease? *Gut* 1992;33:1633-1637.
35. Karpati S, Stolz, Meurer M, Krieg T, Braun-Falco O. Extracellular binding sites of IgA anti-jejunal antibodies on normal small bowel detected by immunoelectronmicroscopy. *J Invest Dermatol* 1991;96:228-233.
36. Karpati S, Burgin-Wolff A, Krieg T, Meurer M, Stolz W, Braun-Falco O. Binding to human jejunum of serum IgA antibody from children with celiac disease. *Lancet* 1990;336:1335-1338.
37. Lock J, Gilmour JEM, Unsworth DJ. Anti-tissue transglutaminase, anti-endomysium and anti-R1-reticulin autoantibodies- the antibody trinity of coeliac disease. *Clin Exp Immunol* 1999;116:258-262.
38. Rostami K, Kerckhaert JP, Tiemessen R, Meijer JW, Mulder CJ. The relationship between anti-endomysium antibodies and villous atrophy in coeliac disease using both monkey and human substrate. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;11:439-442.
39. Cataldo F, Lio D, Marino V, Picarelli, Ventura A, Corazza GR. IgG(1) antiendomysium and IgG antitissue transglutaminase (anti-tTG) antibodies in coeliac disease patients with selective IgA deficiency. Working Groups on Celiac Disease of SIGEP and Club del Tenue. *Gut* 2000;47:366-369.
40. Picarelli A, Sabbatella L, Di Tola M, Gabrielli F, Greco R, Di Cello T, Mastracchio A, Anania MC. Celiac disease diagnosis in misdiagnosed children. *Pediatr Res* 2000;48:590-592.
41. Picarelli A, Di Tola M, Sabbatella L, Mastracchio A, Trecca A, Gabrielli F, Di Cello T, Anania MC, Torsoli A. Identification of a new coeliac disease subgroup: antiendomysial and anti-transglutaminase antibodies of IgG class in the absence of selective IgA deficiency. *J Intern Med* 2001;249:181-188.
42. Valdimarsson T, Frazen L, Grodzinsky E, Skogh T, Strom M. Is small bowel biopsy necessary in adults with suspected coeliac disease and IgA antiendomysial antibodies? *Dig Dis Sci* 1996;41:83-87.
43. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, Schuppan D. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med* 1997;3:797-801.
44. Dieterich W, Laag E, Shopper H, Volta U, Ferguson A, Gillett H, Riecken EO, Schuppan D. Autoantibodies to "tissue"-transglutaminase as predictors of celiac disease. *Gastroenterology* 1998;115:1317-1321.
45. Sulkanen S, Haltunen T, Laurika K, Kolho KL, Korponay-Szabo IR, Sarnesto A, Savilahti E, Collin P, Maki M. Tissue transglutaminase antibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease. *Gastroenterology* 1998;115:1222-1228.
46. Uhlig HH, Lichtenfeld J, Osman AA, Richter T, Mothes T. Evidence for existence of coeliac disease autoantigens apart from tissue transglutaminase. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000;12:1017-1020.
47. Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H. The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;11:1185-94.
48. Picarelli A, Maiuri L, Frate A, Greco M, Auricchio S, Londei M. Production of antiendomysial antibodies after in-vitro gliadin challenge of small intestine biopsy samples from patients with coeliac disease. *Lancet* 1996;348:1065-1067.

49. Picarelli A, Di Tola M, Sabbatella L, Anania MC, Di Cello T, Greco R, Silano M, De Vincenzi M. 31-43 amino acid sequence of the alpha-gliadin induces antiendomysial antibody production during in vitro challenge. *Scand J Gastroenterol* 1999;34:1099-1102.
50. Picarelli A, Sabbatella L, Di Tola M, Vetrano S, Maffia C, Picchi C, Mastracchio A, Paoluzi P, Anania MC. Forty-eight hours of biopsy culture improve the sensitivity of the in vitro gliadin challenge in the diagnosis of celiac disease. *Clin Chem* 2001;47:1841-1843.
51. Loft DE, Marsh MN, Crowe PT. Rectal gluten challenge and diagnosis of coeliac disease. *Lancet* 1990 ;336:953.
52. Lahteenoja H, Maki M, Viander M, Raiha I, Vilja P, Rantala I, Toivanen A, Syrjanen S. Local challenge on oral mucosa with an alpha-gliadin related synthetic peptide in patients with celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 2000;95:2880-7.
53. Lahteenoja H, Maki M, Viander M, Toivanen A, Syrjanen S. Local challenge of oral mucosa with gliadin in patients with coeliac disease. *Clin Exp Immunol.* 2000;120:38-45.
54. Colot V, Bartels D, Thompson R, Flavell R. Molecular characterization of an active LMW glutenin gene and its relation to other wheat and barley prolamin genes. *Mol Gen Genet* 1989;216:81-90.
55. Auricchio S, Cardelli M, De Ritis G, De Vincenzi M, Latte F, Silano V. An in vitro animal model for the study of cereal components toxic in coeliac disease. *Pediatr Res* 1984;18:1372-8
56. De Ritis G, Auricchio S, Jones HW, Lew EJL, Bernardin JE, Kasarda DD. In vitro (organ culture) studies of the toxicity of specific A-gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology* 1988;94:41-49.
57. Kreis M, Forde BG, Rahman S, Mifflin BJ, Shewry PR. Molecular evolution of the seed storage proteins of barley, rye and wheat. *J Mol Biol* 1985;183:499-502.
58. De Vincenzi M, Luchetti R, Peruffo AD, Curioni A, Pogna N, Gasbarrini G. In vitro assessment of acetic-acid-soluble proteins (glutenin) toxicity in celiac disease. *J Biochem Toxicol* 1996;11:205-210.
59. Wieser H, Seilmeier W, Belitz HD. Comparative investigations of partial amino acid sequences of prolamines and glutelins from cereals. II. Fractionation of glutelins. *Z Lebensm Unters Forsch* 1980;171:430-436.
60. Wieser H, Springer G, Belitz HD, Ashkenazi A, Idar D. Toxicity of different wheat gliadins in coeliac disease. *Z Lebensm Unter Forsch* 1982;175:321-326.
61. Wieser H, Seilmeier W, Eggert M, Belitz HD. Tryptophan content of cereal proteins. *Z Lebensm Unters Forsch* 1983;177:457-60.
62. Kick F, Berlitz HD, Wieser H, Kieffer R. Comparative studies of the Osborne protein fraction of wheat varieties with different dough and baking properties. *Z Lebensm Unters Forsch* 1992;195:437-442.
63. Kumar PJ, Sinclair TS, Farhing MJG. Clinical toxicity testing of pure gliadin in coeliac disease. *Gastroenterology* 1984;86:1147A.
64. De Vincenzi M, Dessi MR, Luchetti R., Pogna N, Redaelli R, Galterio G. Toxicity of bread wheat lines lacking prolamins encoded by the Gli-B1/Gli-B5/Glu-B3 and Gli-D1/Glu-D3 loci in coeliac disease as determined by their agglutinating activity. *ATLA* 1996;24:39-48.
65. Kasarda DD; Okita DW, Bernardin JE, Baecker PA, Nimmo CC, Lew EJL, Dietler MD, Green FC. Nucleic acid (cDNA) and amino acid sequences of α -type gliadins from wheat (*Triticum aestivum*). *Proc Nat Acad Sci USA* 1984;81:4712-4716.
66. Kagnoff MF, Austin RK, Johnson HC, Bernardin JE, Dietler MD, Kasarda DD. Coeliac sprue: correlation with murine T cell responses to wheat gliadin components. *J Immunol* 1982;129:2693-2697.
67. Shidrawi RG, Day P, Przemioslo R, Ellis HJ, Nelufer JM, Ciclitira PJ. In vitro toxicity of gluten peptides in coeliac disease assessed by organ culture. *Scand J Gastroenterol* 1995;30:758-761.
68. Sturgess R, Day P, Ellis HJ, Lundin KE, Gjertsen HA, Kontakou M, Ciclitira PJ. Wheat peptide challenge in coeliac disease. *Lancet* 1994;343:758-761.
69. Marsh MN, Morgan S, Ensary A, Wardel T, Lobely T, Millis C. In vivo activity of peptides 31-43, 44-55, 56-68 of α -gliadin in gluten sensitive enteropathy (GSE). *Gastroenterology* 1995;108:A871.
70. Wieser H. Prolamins in cereals. *Proceedings of Changing features of Coeliac Disease, Tampere 1998*. Eds. Lohiniemi S, Collin P, Maki M. The Finnish Coeliac Society, Tampere, pp. 25-30, 1998.
71. Dissanayake AS, Truelove SC, Whitehead R. Lack of harmful effects of oats on small-intestinal mucosa in celiac disease. *Br Med J* 1974;4:189-191.
72. Baker PG, Read AE. Oats and barley toxicity in celiac patients. *Postgrad Med J* 1976;52:264-268.

73. Janatuinen EK, Pikkarainen PH, Kemppainen TA, Kosma VM, Jarvinen RM, Uusitupa MI, Julkunen RJ. A comparison of diets with and without oats in adults with celiac disease. *N Engl J Med* 1995;333:1033-1037.
74. Srinivasan U, Leonard N, Jones E, Kasarda DD, Weir DG, O'Farrelly C, Feighery C. Absence of oats toxicity in adult coeliac disease. *BMJ* 1996;313:1300-1301.
75. Hardman CM, Garioch JJ, Leonard JN, Thomas HJ, Walker MM, Lortan JE, Lister A, Fry L. Absence of toxicity of oats in patients with dermatitis herpetiformis. *N Engl J Med* 1997;337:1884-1887.
76. Janatuinen EK, Kemppainen TA, Pikkarainen PH, Holm KH, Kosma VM, Uusitupa MI, Maki M, Julkunen RJ. Lack of cellular and humoral immunological responses to oats in adults with coeliac disease. *Gut* 2000;46:327-331.
77. Picarelli A, Di Tola M, Sabbatella L, Gabrielli F, Di Cello T, Anania MC, Mastracchio A, Silano M, De Vincenzi M. Immunological evidence of no harmful effect of oats in celiac disease. *Am J Clin Nutr* 2001;74:137-40.
78. Janatuinen EK, Kemppainen TA, Julkunen RJ, Kosma VM, Maki M, Heikkinen M, Uusitupa MI. No harm from five year ingestion of oats in coeliac disease. *Gut* 2002;50:332-5.
79. De Vincenzi M, Stammati A, Luchetti R, Silano M, Gasbarrini G, Silano V. Structural specificities and significance for coeliac disease of wheat gliadin peptides able to agglutinate or to prevent agglutination of K562(S) cells. *Toxicology* 1998;127:97-106.
80. Mayer M, Troncone R, Mazzarella G, Pogna N, De Vincenzi M, Esposito V, Greco L, Auricchio S. Oats prolamines induce lymphocytic infiltration when instilled in the coeliac rectal mucosa. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997;24:3-7.
81. Ferguson A, Murray D. Quantitation of intraepithelial lymphocytes in human jejunum. *Gut* 1971;12:988-994.
82. Picarelli A, Maiuri L, Mazzilli MC, Coletta S, Ferrante P, Di Giovambattista F, Greco M, Torsoli A, Auricchio S. Gluten-sensitive disease with mild enteropathy. *Gastroenterology* 1996;111:608-616.
83. Ellis A. Coeliac disease: previous family studies. In: McConnell RB, editor. *The genetics of coeliac disease*. Lancaster: MTP Press, Copenhagen, pp. 197-199, 1981.
84. Sollid LM, Thorsby E. HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. *Gastroenterology* 1993;105:910-922.
85. Risch N. Assessing the role of HLA-linked and unlinked determinants of disease. *Am J Hum Genet* 1987;40:1-14.
86. Petronzelli F, Bonamico M, Ferrante P, Grillo R, Mora B, Mariani P, Apollonio I, Gemme G, Mazzilli MC. Genetic contribution of the HLA region to the familial clustering of coeliac disease. *Ann Hum Genet* 1997;61:307-317.
87. Kagnoff MF. Coeliac disease: genetic, immunological and environmental factors in disease pathogenesis. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1985;114:45-54.
88. Mearin ML, Mulder CJJ. HLA-DR, -DP and -DQ antigens in coeliac disease. In *Coeliac Disease*, Kluwer Academy Publisher, Boston, pp. 27-34, 1991.
89. Sollid LM, Markussen G, Ek J, Gjerde H, Vartdal F, Thorsby E. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ α/β heterodimer. *J Exp Med* 1989;23:271-279.
90. Clot F, Babron MC. Genetics of celiac disease. *Molec Genet Metabol* 2000;71:76-80.
91. Zhong F, McCombs CC, Olson JM, Elston RC, Stevens FM, McCarthy CF, Michalsky JP. An autosomal screen for genes that predispose to celiac disease in the western countries of Ireland. *Nat Genet* 1996;14:329-333.
92. Houlston RS, Tomlinson IP, Ford D, Seal S, Marossy AM, Ferguson A, Holmes GK, Hosie KB, Howdle PD, Jewell DP, Godkin A, Kerr GD, Kumar P, Logan RF, Love AH, Johnston S, Marsh MN, Mitton S, O'Donoghue D, Roberts A, Walker-Smith JA, Stratton MF. Linkage analysis of candidate regions for coeliac disease genes. *Hum Mol Genet* 1997;6:1335-1339.
93. Babron MC, Truy F, Eichenbaum-Voline S, Clerget-Darpoux F. Behavior of the maximum likelihood score when many affected sibpairs are issued from a few untyped patients. *Genet Epidemiol* 1997;14:518A4.
94. Greco L, Corazza GR, Clot F, Babron MC, Fulchignoni-Lataud MC, Percopo S, Zavattari P, Bouguerra F, Dib C, Tosi R, Troncone R, Ventura A, Mantovani W, Magazzù G, Gatti R, Lazzari R, Giunta A, Perri F, Iacono G, Cardi E, De Virgiliis S, Cataldo F, De Angelis G, Musumeci S, Ferrari L, Balli F, Bardella MT, Volta U, Catassi C, Torre G, Eliaou JF, Serre JL, Clerget-Darpoux F. Genome search in coeliac disease. *Am J Hum Genet* 1998;62:669-675.

95. Djilali-Saiah I, Schmitz J, Harfouch-Hammoud E, Mougenot JF, Bach JF, Caillat-Zucman S. CTLA-4 gene polymorphism is associated with predisposition to coeliac disease. *Gut* 1998;43:187-189.
96. Torinsson Naluai Å, Nilsson S, Samuelsson L, Gudjonsdottir AH, Ascher, Ek J, Hallberg B, Kristiansson B, Martinsson T, Nerman O, Sollid LM, Wahlström J. The CTLA4/CD28 gene region on chromosome 2q33 confers susceptibility to celiac disease in a way possibly distinct from that of type I diabetes and other chronic inflammatory disorders. *Tissue Antigens* 2000;56:350-355.
97. Holopainen P, Arvas M, Sistonen P, Mustalahti K, Collin P, Maki M, Partanen J. CD28/CTLA4 gene region on chromosome 2q33 confers genetic susceptibility to celiac disease. A linkage and family-based association study. *Tissue Antigens* 1999;53:470-475.
98. Clot F, Fulchignoni-Lataud MC, Renoux C, Percopo S, Bouguerra F, Babron MC, Djilali-Saiah I, Caillat-Zucman S, Clerget-Darpoux F, Greco L, Serre JL. Linkage and association study of the CTLA-4 region in coeliac disease for Italian and Tunisian populations. *Tissue Antigens* 1999;54:527-530.
99. De La Concha EG, Fernandez-Arquero M, Vigil P, Rubio A, Maluenda C, Polanco I, Fernandez C, Figueredo MA. Celiac disease and TNF promoter polymorphism. *Hum Immunol* 2000;61:513-517.
100. Uibo O, Lambrechts A, Mascart-Lemone F. Human oesophagus: a convenient antigenic substrate for the determination of anti-endomysium antibodies in the serological diagnosis of coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995;7:37-40.
101. Brusco G, Muzi P, Ciccocioppo R, Biagi F, Cifone MG, Corazza GR. Transglutaminase and coeliac disease: endomysial reactivity and small bowel expression. *Clin Exp Immunol* 1999;118:371-375.
102. Monteleone G, Pender SLF, Alstead E, Hauer AC, Lionetti P, MacDonald TT. Role of interferon- α in promoting T helper cell type 1 responses in the small intestine in coeliac disease. *Gut* 2001;48:425-429.
103. Monteleone G, Pender SLF, Wathen NC, MacDonald TT. Interferon- α drives T cell-mediated immunopathology in the intestine. *Eur J Immunol* 2001;31:2247-2255.
104. Salvati VM, MacDonald TT, Bajaj-Elliott M, Borrelli M, Staiano A, Auricchio S, Troncone R, Monteleone G. Interleukin 18 and associated markers of T helper cell type 1 activity in coeliac disease. *Gut* 2002;50:186-90.
105. Perry I, Tselepis C, Hoyland J, Iqbal TH, Sanders DSA, Cooper BT, Jankowski JAZ. Reduced Cadherin/Catenin complex expression in celiac disease can be reproduced in vitro by cytokine stimulation. *Lab Invest* 1999;79:1489-1499.
106. Schulzke JD, Bentzel CJ, Schulzke I, Riecken EO, Fromm M. Epithelial tight junction structure in the jejunum of children with acute and treated celiac sprue. *Pediatr Res* 1998;43:435-441.
107. Fasano A, Not T, Wang W, Uzzau S, Berti S, Tommasini A, Goldblum SE. Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. *Lancet* 2000;355:1518-1519.
108. Strober W, Kelsall B, Marth T. Oral tolerance. *J Clin Immunol* 1998;18:1-30.
109. Nilsen EM, Lundin KEA, Krajci P, Scott H, Sollid LM, Brandtzaeg P. Gluten-specific, HLA-DQ restricted T cells from coeliac mucosa produce cytokines with Th1 or Th0 profile dominated by interferon γ . *Gut* 1995;37:766-776.
110. Lahat N, Shapiro S, Karban A, Gerstein R, Kinarty A, Lerner A. Cytokine profile in coeliac disease. *Scand J Immunol* 1999;49:441-446.
111. Przemioslo RT, Lundin KEA, Sollid LM, Nelufer J, Ciclitira PJ. Histological changes in small bowel mucosa induced by gliadin sensitive T lymphocytes can be blocked by anti-interferon γ antibody. *Gut* 1995;36:874-879.
112. Pender SL, Tickle SP, Docherty AJ, Howie D, Wathen NC, McDonald TT. A major role of matrix metalloproteinases in T cell injury in the gut. *J Immunol* 1997;158:1582-1590.
113. Schuppan D. Current concepts of celiac disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2000;119:234-242.
114. Maiuri L, Auricchio S, Coletta S, De Marco G, Picarelli A, Di Tola M, Quarantino S, Londei M. Blockage of T-cell costimulation inhibits T-cell action in celiac disease. *Gastroenterology* 1998;115:564-572.
115. Maiuri L, Picarelli A, Boirivant M, Coletta S, Mazzilli MC, De Vincenzi M, Londei M, Auricchio S. Definition of the initial immunological modifications upon in vitro gliadin challenge in the small intestine of celiac patients. *Gastroenterology* 1996;110:1368-1378.

116. Moss SF, Attia L, Scholes JV, Walters JR, Holt PR. Increased small intestinal apoptosis in coeliac disease. *Gut* 1996;39:811-817.
117. Maiuri L, Ciacci C, Raia V, Vacca L, Ricciardelli I, Raimondi F, Auricchio S, Quaratino S, Londei M. FAS engagement drives apoptosis of enterocytes of coeliac patients. *Gut* 2001;48:418-424.
118. Ciccocioppo R, Di Sabatino A, Parroni R, Muzi P, D'Alo S, Ventura T, Pistoia MA, Cifone MG, Corazza GR. Increased enterocyte apoptosis and Fas-Fas ligand system in celiac disease. *Am J Clin Pathol* 2001;115:494-503.
119. Maiuri L, Ciacci C, Auricchio S, Brown V, Quaratino S, Londei M. Interleukin 15 mediates epithelial changes in celiac disease. *Gastroenterology* 2000;119:996-1006.
120. Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V, Auricchio S, Picard J, Osman M, Quaratino S, Londei M. Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet*. 2003;362:3-4.
121. Molberg Ø, McAdam SN, Körner R, Quarsten H, Kristiansen C, Madsen L, Fugger L, Scott H, Norén O, Roepstorf P, Lundin KEA, Sjöström H, Sollid LM. Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognised by gut-derived T cells in celiac disease. *Nat Med* 1998;4:713-717.
122. Marsh MN. Transglutaminase, gluten and celiac disease: food for thought. *Nat Med* 1997;3:725-726.
123. Karska K, Tuckova, Steiner L, Tlaskalova-Hogenova H, Michalak M. Calreticulin – the potential autoantigen in celiac disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;209:597-605.
124. Clemente MG, Musu MP, Frau F, Brusco G, Sole G, Corazza GR, De Virgiliis S. Immune reaction against the cytoskeleton in celiac disease. *Gut* 2000;47:520-526.
125. Lesort M, Attanavanich K, Zhang J, Johnson GV. Distinct nuclear localization and activity of tissue transglutaminase. *J Biol Chem* 1998;273:11991-11994.
126. Akimov SS, Krylov D, Fleishman LF, Belkin AM. Tissue transglutaminase is an integrin-binding adhesion coreceptor for fibronectin. *J Cell Biol* 2000;148:825-838.
127. Piacentini M, Martinet M, Beninati S, Folk JE. Free and protein-conjugated polyamines in mouse epidermal cells. *J Biol Chem* 1988;263:3790-3794.
128. Lundin KEA, Scott H, Hansen T, Paulsen G, Halstensen TS, Fausa O, Thorsby E, Sollid EM. Gliadin-specific HLA-DQ(α 1*0501, β 1*0201) restricted T cells from the small intestinal mucosa of celiac disease patients. *J Exp Med* 1993;178:187-196.
129. Volta U, Molinaro N, Fratangelo D, Bianchi FB. IgA antibodies to jejunum. Specific immunity directed against target organ of gluten-sensitive enteropathy. *Dig Dis Sci* 1994;39:1924-1929.
130. Pittschieler K, Ladinser B. Coeliac disease: screened by a new strategy. *Acta Paediatr Suppl* 1996;412:42-45.
131. Borner H, Osman AA, Meergans T, Weiske T, Mothes T. Isolation of antigens recognized by celiac disease autoantibodies and their use in enzyme immunoassay of endomysium and reticulon antibodies-positive human sera. *Clin Exp Immunol* 1996;106:344-350.
132. Lerner A, Blank M, Lahat N, Schoyenfeld Y. Increased prevalence of autoantibodies in celiac disease. *Dig Dis Sci* 1998;43:723-726.
133. Vogelsang H, Schwarzenhofer M, Granditsch G, Oberhuber G. In vitro production of endomysial antibodies in cultured duodenal mucosa from patients with celiac disease. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1057-61.
134. Troncone R, Mayer M, Spagnuolo F, Maiuri L, Greco L. Endomysial antibodies as a unreliable markers for slight dietary transgression in adolescents with coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995;21:69-72.
135. Troncone R, Caputo N, Micillo M, Maiuri L, Poggi V. Immunologic and intestinal permeability tests as predictors of relapse during gluten challenge in childhood coeliac disease. *Scand J Gastroenterol* 1994;29:144-147.
136. Natter S, Granditsch G, Reichel GL, Baghestanian M, Valent P, Elfman L, Gronlund H, Kraft D, Valenta R. IgA cross-reactivity between a nuclear autoantigen and wheat proteins suggests molecular mimicry as a possible pathomechanism in celiac disease. *Eur J Immunol* 2001;31:918-928.
137. Husain M, Neff J, Daily E, Townsend J, Lucas F. Antinuclear antibodies: clinical significance of titres and fluorescence pattern. *Am J Clin Pathol* 1974;61:59-65.

138. Tan EM. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): their immunobiology and medicine. *Adv Immunol* 1982;33:167-240.

13. INDICE

Capitolo 1: INTRODUZIONE	3
Capitolo 2: EPIDEMIOLOGIA DELLA MALATTIA CELIACA	6
Capitolo 3: DIAGNOSI DI MALATTIA CELIACA	9
Capitolo 4: RUOLO DEI CEREALI NELLA MALATTIA CELIACA	14
Capitolo 5: LA MUCOSA INTESTINALE	18
5.1 COMPONENTI CELLULARI DEL SISTEMA IMMUNITARIO ASSOCIATI ALLA MUCOSA INTESTINALE	19
5.2 MODIFICAZIONI DELLA MUCOSA INTESTINALE DEI SOGGETTI CELIACI	19
Capitolo 6: GENETICA	22
6.1 I GENI <i>HLA</i> NELLA MALATTIA CELIACA	22
6.2 GENI NON-<i>HLA</i> NELLA MALATTIA CELIACA	24
Capitolo 7: RISPOSTA IMMUNITARIA	26
7.1 RISPOSTA IMMUNITARIA CELLULO-MEDIATA	28
7.2 RISPOSTA IMMUNITARIA UMORALE	34
Capitolo 8: SCOPO DEL LAVORO	36
Capitolo 9: MATERIALI E METODI	39
9.1 PAZIENTI	39
9.2 DETERMINAZIONE EMA ED NFR	39
9.3 DOPPIO STAINING	40
9.4 ANTICORPI ANTINUCLEO	40
9.5 COLTURA D'ORGANO	41
9.6 ESAME ISTOLOGICO E MORFOMETRICO	42
9.7 LINEE CELLULARI ED ESTRATTI PROTEICI	42
9.8 FRAZIONAMENTO CELLULARE	43
9.9 CARATTERIZZAZIONE DEGLI AUTOANTIGENI IgA (IMMUNOBLOTTING)	44
Capitolo 10: RISULTATI	45
10.1 TIME-COURSE DELLA NFR	45
10.2 CARATTERIZZAZIONE DELLA NFR	46
10.3 CINETICA DI PRODUZIONE DELLA NFR	50
10.4 ANTICORPI ANTINUCLEO	51
10.5 CONTROLLI	52
Capitolo 11: DISCUSSIONE	53
Capitolo 12: BIBLIOGRAFIA	58
Capitolo 13: INDICE	65