

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

DIPARTIMENTO DI AGROBIOLOGIA E AGROCHIMICA

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

TESI SPERIMENTALE:

**EFFETTI IMMUNOLOGICI DI ORZO, SEGALE ED AVENA
SULLA MUCOSA INTESTINALE DI SOGGETTI AFFETTI DA
MALATTIA CELIACA: ATTIVAZIONE SPECIFICA IN VITRO**

Settore scientifico-disciplinare: AGR/07

Coordinatore:
Prof. Domenico Lafiandra
Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica
Università della Tuscia - Viterbo

Tutor:
Dott. Antonio Picarelli
Dipartimento di Scienze Cliniche
Università "La Sapienza" - Roma

Dottorando:
Dott. Marco Di Tola

Anno Accademico 2004-2005

1. LA MALATTIA CELIACA: UNA COLLISIONE EVOLUTIVA TRA UOMO E AMBIENTE

La Malattia Celiaca (MC) è un'intolleranza permanente del piccolo intestino al glutine, un complesso proteico contenuto nella cariosside del frumento. In fase di attiva malattia, il glutine causa lesioni a livello della mucosa dell'intestino tenue, con conseguente alterazione della funzione di assorbimento. L'espressione tipica di MC è rappresentata, infatti, da atrofia dei villi intestinali associata ad iperplasia delle cripte del Lieberkühn, quadro che recede dopo eliminazione dell'agente causale dalla dieta (1).

Dal punto di vista storico, se la prima definizione di MC come sindrome da malassorbimento risale al 1888 ad opera di Samuel Gee (2), il ruolo etiologico del glutine nella patogenesi della malattia stessa è stato identificato negli anni '50 dal pediatra olandese Willem Karel Dicke (3). Questo ricercatore osservò che le condizioni dei bambini affetti da celiachia migliorarono nel cosiddetto "inverno del digiuno" (1944-1945) durante il quale, a causa della guerra, i piccoli pazienti erano stati alimentati con patate, banane ed altri alimenti privi di glutine come i bulbi di tulipano. Terminata la guerra, il ritorno alla normalità alimentare provocò il ripresentarsi dei sintomi. Questa brillante osservazione portò all'identificazione del glutine come agente causale della MC.

E' oggi noto che l'anomala sensibilità nei confronti del glutine è conferita da una predisposizione associata sia a geni di tipo HLA che non appartenenti a tale sistema. Nei soggetti geneticamente predisposti, il consumo alimentare di glutine innesca una risposta immunitaria sia di tipo umorale che cellulo-mediata, la quale porta al rimodellamento mucosale responsabile del quadro istologico tipico di malattia (1).

1.1 Dati epidemiologici

I continui sviluppi nel campo della ricerca e la disponibilità di test diagnostici a sempre più alta sensibilità e specificità hanno permesso di definire la celiachia come la malattia infiammatoria cronica più frequente del genere umano (4), con un rapporto uomo/donna pari a 1:2 (5).

Dal punto di vista storico, i primi studi epidemiologici sulla MC sono stati eseguiti nell'Europa degli anni '50 sulla base dell'osservazione clinica dei sintomi tipici di malassorbimento (diarrea cronica e perdita di peso). In quegli anni, la prevalenza nei diversi paesi europei oscillava tra 1:4000 e 1:8000 (6). Poiché i bambini risultavano essere i soggetti maggiormente colpiti, la MC venne inizialmente definita come una condizione di competenza prettamente pediatrica. Studi successivi, effettuati in Irlanda, Scozia e Svizzera tra gli anni '70 e '80, dimostrarono un incremento nella prevalenza della MC con picchi compresi tra 1:450 e 1:500 (7-9). Questo aumento di prevalenza fu

il risultato dell'utilizzo dei primi test diagnostici, quali la valutazione dei grassi fecali e la prova di assorbimento intestinale dello xilosio. In ogni caso, anche se in Europa la MC era divenuta una realtà, nel resto del mondo veniva considerata ancora una condizione rara. Negli U.S.A., infatti, i primi studi epidemiologici sono stati eseguiti tra il 1993 e il 1994, stimando una prevalenza di circa 1 caso ogni 5000 persone (10,11). Solo negli ultimi anni, con l'introduzione di nuovi marcatori sierologici altamente sensibili e specifici quali gli anticorpi anti-gliadina (AGA), anti-endomisio (EMA) ed anti-transglutaminasi tessutale (anti-tTG), in associazione alla tipizzazione dei geni HLA, è stato possibile registrare un drastico aumento nelle diagnosi di MC, soprattutto a carico dei soggetti adulti. Inoltre, grazie a questi strumenti, si è potuto dimostrare come la celiachia sia distribuita in modo piuttosto omogeneo (teoria del villaggio globale), ferme restando le differenze nelle abitudini alimentari e nella frequenza della predisposizione genetica esistenti tra le diverse popolazioni del mondo (4).

La prevalenza stimata oggi in Italia è di 1:106 (12) mentre, in Europa, è compresa tra 1:85 (Ungheria) e 1:500 (Croazia e Germania), con un valore medio di circa 1:220 (4,12,13). Nella tabella 1.1, sono riportati i valori di prevalenza calcolati negli ultimi dieci anni di studio sulla MC.

Tabella 1.1 - Prevalenza della MC in Europa

Paese	Prevalenza	Campione	Metodo
Croazia	1:500	?	?
Danimarca	1:394	1573	Screening
Estonia	1:88	1461	Screening + biopsia
Finlandia	1:99	3654	Screening + biopsia
Germania	1:500	3004	Screening + biopsia
Gran Bretagna	1:100	7550	Screening
Irlanda	1:122	1823	Screening + biopsia
Italia	1:106	3188	Screening + biopsia
Norvegia	1:340	2096	Screening + biopsia
Olanda	1:198	6127	Screening + biopsia
Portogallo	1:134	536	Screening + biopsia
Repubblica Ceca	1:222	1312	Screening
Spagna	1:389	1170	Screening + biopsia
Svezia	1:190	1894	Screening + biopsia
Svizzera	1:132	1450	Screening + biopsia
Ungheria	1:85	427	Screening + biopsia
Prevalenza media	1:220		

Come è avvenuto per l'Europa, anche in altre regioni del mondo si è assistito ad un notevole aumento nel numero delle diagnosi. E' il caso degli U.S.A., in cui la prevalenza della MC è stata recentemente stimata nella misura di 1:133 (14). Non sempre, però, la situazione è così indicativa. Anche se le indagini epidemiologiche e le segnalazioni cliniche esistenti oggi in letteratura testimoniano l'esistenza della MC in quasi tutte le regioni del globo (4,15,16), spesso si tratta di studi occasionali, approssimativi e, qualche volta, perfino contraddittori (Tabella 1.2). La celiachia è dunque un problema sanitario che non conosce confini, ma le cui dimensioni su scala mondiale sono ancora tutte da stabilire.

Tabella 1.2 - Prevalenza della MC nel resto del mondo

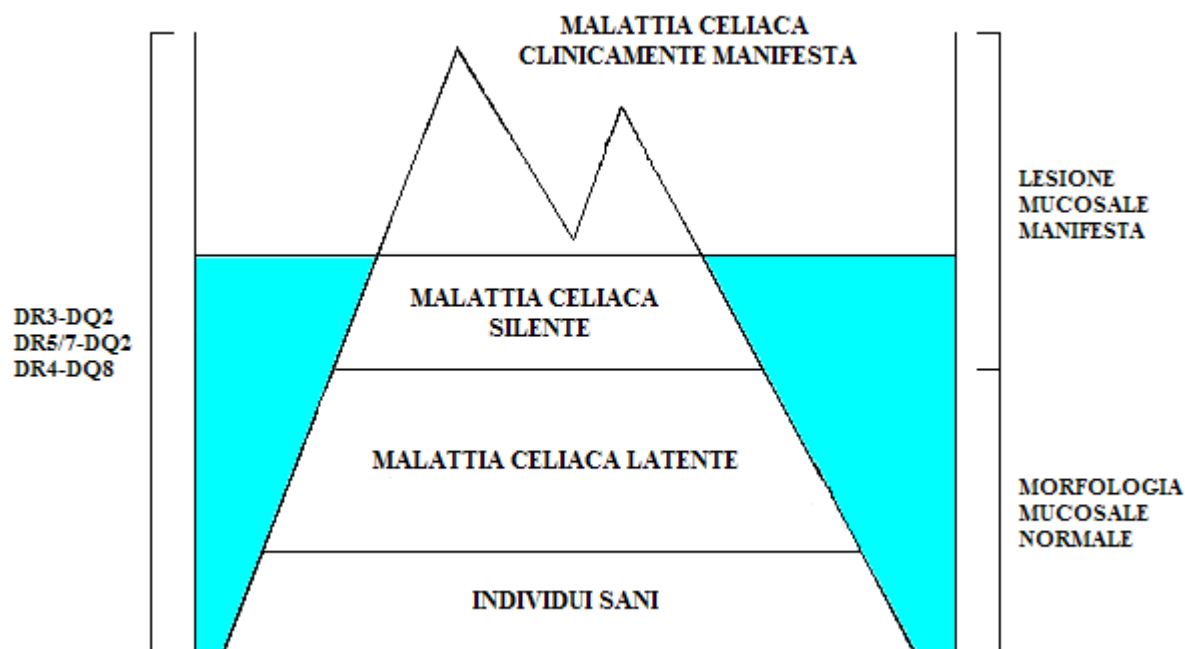
Continente	Paese	Prevalenza	Campione	Metodo
Africa	Algeria (Saharawi)	1:18	989	Screening + biopsia
	Burkina Faso (Mossi)	0:600	600	Screening
America	Argentina	1:167	2000	Screening + biopsia
	Brasile	1:681	2045	Screening + biopsia
	U.S.A.	1:133	4126	Screening + biopsia
Asia	Anatolia centrale	1:100	906	Screening + biopsia
	Iran	1:166	2000	Screening + biopsia
	Israele	1:157	1571	Screening + biopsia
	Turchia	1:77	2000	Screening + biopsia
Australia	Australia occidentale	1:430	3011	Screening + biopsia

Si ritiene infine che l'aumento di prevalenza della MC sia dovuto, oltre che allo sviluppo di test diagnostici altamente sensibili e specifici, anche a nuove abitudini alimentari quali la diminuzione dell'allattamento al seno, la quantità di glutine e il tempo di introduzione dello stesso durante il divezzamento e, infine, la quantità e la qualità del glutine ingerito in età adulta (17). Questi cambiamenti alimentari, in associazione all'elevata frequenza della predisposizione genetica alla malattia, potrebbero spiegare il caso "endemico" documentato tra i Saharawi, una popolazione nordafricana in cui la prevalenza della MC è stata stimata nella misura di 1:18 (18,19). Quello dei Saharawi resta comunque un caso isolato e, per il momento, unico al mondo.

Le conoscenze acquisite dopo decenni di studi epidemiologici sulla MC sono sintetizzate nel modello ad iceberg proposto da Richard Logan nel 1992 (20), in cui viene considerata l'esistenza delle forme subcliniche e latenti le quali, essendo ancora oggi di difficile identificazione, necessitano di un protocollo di diagnosi attento e sempre al passo con i tempi (Figura 1.1).

Figura 1.1 - Modello ad iceberg della MC

La dimensione totale dell'iceberg rappresenta i soggetti geneticamente predisposti alla MC (a sinistra sono riportati gli aplotipi HLA interessati). I casi con evidenza clinica di MC rappresentano la porzione emersa dell'iceberg. Nella porzione sommersa sono rappresentati i casi che, a causa di una sintomatologia sfumata o assente (MC silente) o di una morfologia mucosale normale (MC latente), sfuggono alla diagnosi. Più in basso sono rappresentati i soggetti che, pur avendo una predisposizione alla MC, sono sani. A destra è riportata la morfologia mucosale nelle diverse condizioni.



1.2 Fattori genetici

Poiché la MC colpisce individui geneticamente predisposti ed è caratterizzata da processi immuno-mediati diretti contro il glutine, può essere definita come una patologia di tipo multifattoriale (21), in cui l'intestino (sede della risposta immunitaria e, allo stesso tempo, organo bersaglio) agisce da interfaccia tra i fattori genetici e quelli ambientali (Figura 1.2).

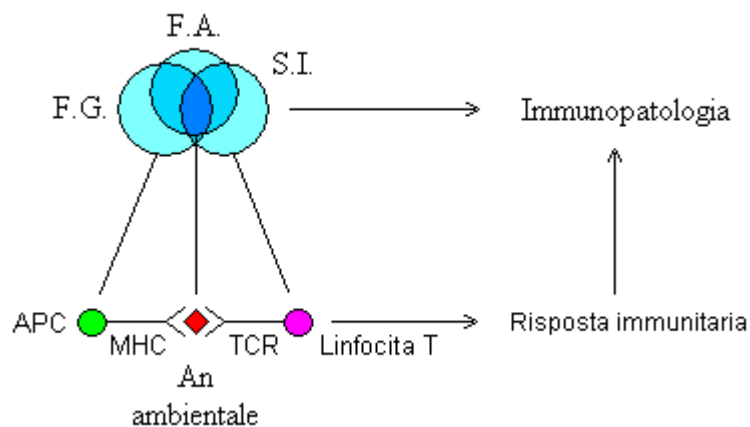
Inizialmente, il coinvolgimento genetico nella MC è stato suggerito dall'alta prevalenza della stessa (10%) tra i fratelli dei pazienti celiaci e dalla quasi assoluta concordanza (70-100%) tra i gemelli monozigoti (22,23). Il parametro usato per valutare questo aspetto è il λ_s (rischio di MC nei fratelli di celiaci/rischio di MC nella popolazione generale), il cui valore varia tra 20 e 60 a seconda degli studi considerati (24-26). Tali valori, se paragonati con i corrispettivi misurati in altre patologie multifattoriali come l'artrite reumatoide, il diabete di tipo 1 e la sclerosi multipla, risultano essere molto alti. Qualche decennio fa, si riteneva inoltre che i geni implicati nella MC fossero del solo tipo HLA. In contrapposizione a questa tesi, il λ_{sHLA} (rischio di MC nei fratelli di celiaci con HLA predisponente/rischio di MC nella popolazione generale con HLA predisponente) è decisamente inferiore al λ_s , con valori compresi tra 2,3 e 5,5 (24-26). Il contributo alla MC dei geni HLA rispetto a quello dei geni non-HLA dipende dal tipo di interazione tra i loci interessati. Assumendo un

modello moltiplicativo, il quale prevede un effetto sinergistico tra i geni, i valori di λ_s e λ_{sHLA} indicano che il contributo dei geni non-HLA (λ_s/λ_{sHLA}) è maggiore rispetto a quello dei geni HLA. Questo aspetto suggerisce che, oltre a quella dell'HLA, altre regioni geniche devono essere coinvolte nella predisposizione alla MC. Ciò nonostante, dal momento che la scelta del modello moltiplicativo è arbitraria e che la condivisione dei fattori ambientali all'interno delle famiglie (principalmente l'alimentazione) può sottostimare il valore del λ_{sHLA} e, di conseguenza, sovrastimare il contributo dei geni non-HLA, quello di cui sopra resta un calcolo puramente teorico. In ogni caso, studi recenti hanno evidenziato il coinvolgimento di regioni geniche non-HLA nella predisposizione alla MC (21).

Figura 1.2 - Esempio di patologia multifattoriale

La celiachia rientra nel campo delle malattie infiammatorie croniche, caratterizzate da un'etiologia multifattoriale che coinvolge sia fattori ambientali che genetici, inclusi i geni HLA. In genere, la complessa interfaccia tra i fattori genetici e quelli ambientali rende arduo il compito di identificare i meccanismi molecolari della malattia stessa. E' per questo motivo che le conoscenze patogenetiche sulle malattie infiammatorie croniche sono piuttosto limitate anche se, come vedremo meglio in seguito, la MC offre un buon modello di studio per la comprensione di tali meccanismi bio-molecolari.

Legenda: F.G. = fattori genetici; F.A. = fattori ambientali; S.I. = sistema immunitario; APC = cellula presentante l'antigene; MHC = complesso maggiore di istocompatibilità; An ambientale = antigene ambientale; TCR = recettore dei linfociti T.



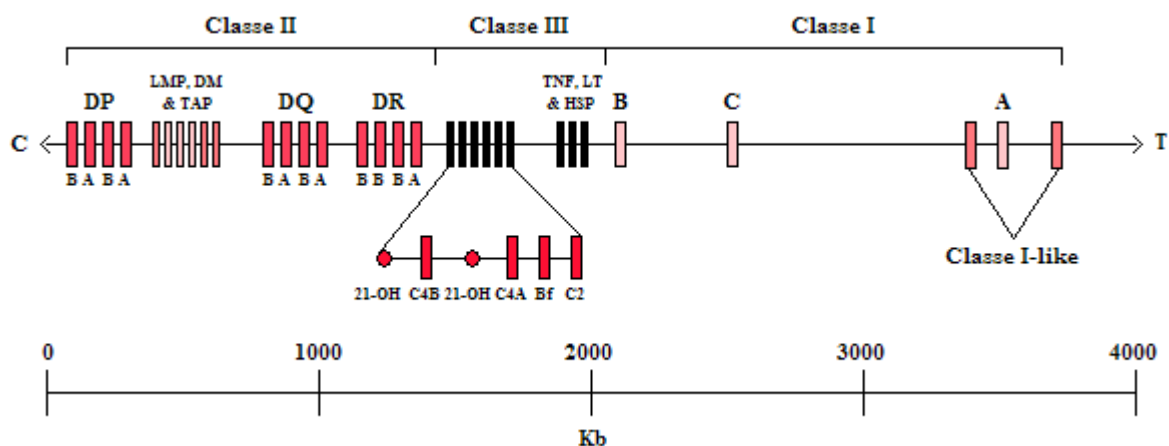
1.2.1 Il sistema HLA

Il Complesso Maggiore di Istocompatibilità (Major Histocompatibility Complex, MHC) è un insieme di geni che codificano per diverse glicoproteine di membrana, le cui funzioni principali rientrano nel riconoscimento cellulare, nella discriminazione tra “self” e “non self” e, grazie alla capacità di presentare gli antigeni ai linfociti T, nello sviluppo delle risposte immunitarie in molte specie animali. Il Recettore dei Linfociti T (T Cell Receptor, TCR) è infatti in grado di riconoscere un antigene solo se associato a una molecola MHC. L'MHC umano (Human Leukocyte Antigen, HLA) è anch'esso un insieme di geni distribuiti in un ampio tratto di DNA (circa 4000 paia di

kilobasi) localizzato sul braccio corto del cromosoma 6. I geni dell'HLA sono organizzati in regioni che codificano per quattro diverse classi di molecole: I, I-like, II e III (Figura 1.3).

Figura 1.3 - Schema del sistema HLA sul cromosoma 6p

Legenda e spiegazioni: C = centromero; Classe II = regione comprendente i geni di classe II; DP, DQ e DR = geni delle molecole di classe II; LMP (Low Molecular Mass Polypeptide o Large Multifunctional Proteinase, LMP2/LMP7) = geni dei componenti della grande proteasi multifunzionale (proteasoma); DM (DMA/DMB) = geni della molecola necessaria a legare il peptide antigenico alle molecole di classe II; TAP (Transporter Associated with Antigen Presentation, TAP1/TAP2) = geni del trasportatore associato con il peptide antigenico; Classe III = regione comprendente i geni di classe III; 21-OH (un locus genico e 1 locus pseudogenico) = geni della 21-idrossilasi; C4B, C4A e C2 = geni degli omonimi elementi del sistema complementare; Bf = gene del fattore B della properdina; TNF (Tumor Necrosis Factor) = gene dell'omonima citochina; LT (Linfotossina) = gene dell'omonima citochina; HSP (Heat Shock Protein) = geni delle omonime proteine di 70 kD; Classe I = regione comprendente i geni di classe I e I-like; B, C e A = geni delle molecole di classe I; Classe I-like = geni delle molecole di classe I-like; T = telomero; Kb = kilobasi.



I geni di classe I codificano per glicoproteine espresse su quasi tutte le cellule nucleate e costituite da una catena α di 44 kD e da un'altra di 12 kD, detta β 2-microglobulina, codificata da una regione genica distinta situata sul cromosoma 15. La loro funzione è quella di presentare peptidi antigenici endogeni, della lunghezza di 8-10 aminoacidi, ai linfociti T Cluster Determinant (CD)8+ (linfociti T citotossici o CTL).

I geni di classe I-like, così chiamati perché localizzati tra quelli di classe I, codificano per proteine isolate e caratterizzate solo di recente, anch'esse implicate nei processi immunologici.

I geni di classe II codificano per glicoproteine espresse sulle Cellule Presentanti l'Antigene (APC) e costituite da una catena α di 32-34 kD e da una β di 29-32 kD. La loro funzione è quella di presentare peptidi antigenici esogeni, della lunghezza di 13-17 aminoacidi, ai linfociti T CD4+ (linfociti T helper o Th). Specifiche varianti alleliche di due di questi geni codificano per proteine in grado di presentare frammenti di glutine ai linfociti Th, influenzando la risposta immunitaria verso questi stessi antigeni e conferendo, così, parte della predisposizione genetica alla MC. La regione di classe II comprende, inoltre, alcuni geni che codificano per proteine accessorie (LMP, DM e TAP), le quali partecipano attivamente al processo di presentazione antigenica.

I geni di classe III codificano per gli elementi del sistema complementare C2, C4 e Bf. Infine, tra questa regione genica e quella codificante per le proteine di classe I, sono localizzati i geni di alcune citochine come il Tumor Necrosis Factor (TNF) e la Linfotossina (LT), nonché i geni che codificano per la famiglia delle Heat Shock Protein di 70 kD (HSP70) (21,27,28).

1.2.2 I geni HLA associati alla MC

Più del 90% dei pazienti celiaci presentano gli alleli HLA-DQA1*0501 e -DQB1*0201 (regione genica 6p21.3), i quali codificano, rispettivamente, per le catene α e β della molecola di classe II DQ2, mentre gli stessi alleli sono associati alla popolazione generale nel 20-30% dei casi (23). L'antigene DQ2 è, quindi, strettamente legato alla MC, mentre le precedenti associazioni trovate con gli antigeni DR3, DR5 e DR7, o con i relativi fenotipi HLA DR3/DR3 e DR5/DR7 sono, in realtà, da attribuire allo stretto disequilibrio tra questi e il DQ2 (29). I pazienti celiaci negativi per il DQ2 sono generalmente positivi per il DQ8 (codificato dagli alleli HLA-DQA1*0301 e -DQB1*0302), associato all'antigene DR4 (30).

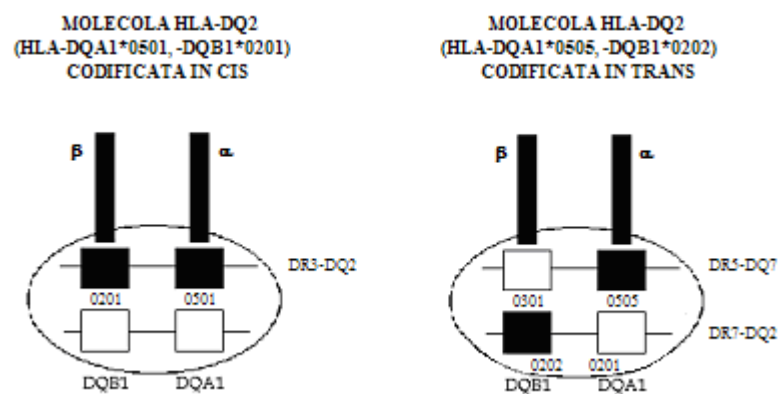
Il sequenziamento dei geni HLA-DQ ha rivelato che l'aplotipo DR3-DQ2 porta gli alleli DRB1*0301-DQA1*0501-DQB1*0201, l'aplotipo DR5-DQ7 porta gli alleli DRB1*11/12-DQA1*0505-DQB1*0301, l'aplotipo DR7-DQ2 porta gli alleli DRB1*07-DQA1*0201-DQB1*0202 e l'aplotipo DR4-DQ8 porta gli alleli DRB1*04-DQA1*0301-DQB1*0302. Pertanto, gli alleli DQA1 degli aplotipi DR3-DQ2 e DR5-DQ7 e gli alleli DQB1 degli aplotipi DR3-DQ2 e DR7-DQ2 sono quasi identici. In altre parole, gli individui eterozigoti per DR5-DQ7/DR7-DQ2 portano in trans alleli quasi uguali a quelli portati in cis dagli individui omozigoti per DR3-DQ2/DR3-DQ2 e, quindi, sono in grado di esprimere una molecola DQ pressoché identica. Le catene DQ α codificate dagli alleli DQA1*0501 e DQA1*0505 differiscono per un residuo nel peptide leader, mentre le catene DQ β codificate dagli alleli DQB1*0201 e DQB1*0202 differiscono per un residuo nel dominio membrana-prossimale. Poiché è molto improbabile che queste differenze minime possano riflettersi in una conseguenza funzionale, i celiaci che si distinguono per le combinazioni DR-DQ sopra menzionate esprimono, sulla superficie delle proprie APC, molecole in grado di svolgere la stessa funzione, le quali in un caso vengono codificate da alleli genici arrangiati in cis e, nell'altro, in trans (Figura 1.4). Quest'evidenza conferma ulteriormente la correlazione tra la MC e l'eterodimero HLA-DQ2 (21).

Recentemente, sono state suggerite delle correlazioni tra la MC e alcune regioni geniche HLA fisicamente distinte sia dal DQ che dal DR. Lo studio dei polimorfismi genetici di alcune citochine ha rilevato, infatti, un'associazione tra la MC e un aplotipo, localizzato tra i geni di classe III, codificante per un fenotipo altamente secretorio del TNF- α (31). Altre associazioni sono state evidenziate tra la MC, un allele del gene MIC-A (Major Histocompatibility Complex Class I-like

gene A) e un altro del gene MIC-B, rispettivamente MIC-A5.1 e MIC-B0106, entrambi localizzati tra i geni di classe I. In particolare, si è visto che questi due alleli correlano con le forme atipiche di malattia, nelle quali la sintomatologia è sfumata o del tutto assente (32). In ogni caso, si è dimostrato che sia la variante del gene del TNF- α sopra indicata che gli alleli MIC-A5.1 e MIC-B0106 sono in forte linkage disequilibrium con l'aplotipo DR3-DQ2 (32,33), indicando che la suscettibilità alla MC è conferita in primo luogo dall'antigene HLA-DQ2 o, in alternativa, dal -DQ8 (33).

Figura 1.4 - Eterodimero HLA-DQ2 associato alla MC

I pazienti celiaci omozigoti per DR3-DQ2/DR3-DQ2 o eterozigoti per DR5-DQ7/DR7-DQ2 sono in grado di esprimere la stessa molecola funzionale DQ. Gli alleli codificanti l'eterodimero HLA-DQ2 si trovano in cis (sullo stesso cromosoma) negli omozigoti DR3-DQ2/DR3-DQ2 e in trans (su cromosomi opposti) negli eterozigoti DR5-DQ7/DR7-DQ2.



1.2.3 I geni non-HLA associati alla MC

Utilizzando analisi di screening genomico nell'ambito di famiglie con più di un figlio celiaco, numerosi ricercatori hanno suggerito che alcune regioni geniche non HLA-relate possono conferire parte della suscettibilità alla MC (21).

Una delle prime regioni geniche è stata evidenziata sul braccio corto del cromosoma 6 (regione 6p23), in posizione telomerica rispetto ai loci HLA (34). Altre regioni geniche che sembrano avere un legame con la MC sono state individuate sui cromosomi 7 (regione 7q31.3), 11 (regione 11p11), 15 (regione 15q26) e 22 (regione 22cen), anche se i risultati ottenuti nei relativi studi sono incompleti e, in alcuni casi, contrastanti fra loro (34-36). E' stato inoltre descritto un certo grado di associazione tra la MC e due regioni distinte che mappano sui cromosomi 5q e 11q, entrambi codificanti alcuni fattori responsabili della presentazione clinica di malattia (36). In realtà, la regione individuata sul braccio lungo del cromosoma 5 (regione 5q31-33) contiene un "focolaio" di geni già noti per essere candidati a varie suscettibilità, come il cluster delle citochine a profilo Th2 implicato nel morbo di Crohn, il gene dell'Interleuchina (IL)-12b implicato nel diabete di tipo I e

nella sclerosi multipla, il gene del Tim implicato nell'asma e altri ancora, come il gene del recettore dei lipopolisaccaridi (CD14), il gene del Tmp1, il gene dell'Interferon Regulatory Factor (IRF)-1, etc. Fatta eccezione del gene dell'IL-12b (polimorfismo Taq1), dell'IRF-1 (polimorfismo Hinf1) e di quattro polimorfismi che caratterizzano più del 90% delle variazioni nel cluster delle citochine a profilo Th2, il cui coinvolgimento nella celiachia è stato già escluso in vari studi sperimentali, è ragionevole pensare che uno o più geni localizzati in questa regione cromosomica possano conferire parte della suscettibilità alla MC (21,32).

Un altro gene indagato nell'ambito della MC è quello che codifica per il Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen (CTLA)-4 (37,38), una molecola di superficie dei linfociti T in grado di legare il complesso antigenico B7/BB-1 espresso sulle APC e di sviluppare, come conseguenza, un segnale negativo che indirizza le stesse cellule T verso uno stato di anergia, contribuendo al mantenimento della tolleranza nei confronti degli antigeni "self" (27). Si tratta di un gene che mappa sul cromosoma 2q (regione 2q33), in cui la sostituzione di un nucleotide nel primo esone (dimorfismo CTLA-4 +49 → transizione dall'allele A all'allele G) comporta il cambiamento di un aminoacido (da treonina ad alanina) nella molecola codificata. E' stato documentato che l'allele G associa con diabete di tipo I, la malattia di Graves, l'artrite reumatoide e la sclerosi multipla, mentre l'allele A associa con la MC (38). Se da un lato l'associazione tra l'allele A e la MC non trova consistenza in tutte le popolazioni (39), dall'altro si è notato che questo legame si rende più evidente nei pazienti celiaci negativi per le molecole HLA-DQ ad alto rischio (40). E' oggi noto che, oltre al gene del CTLA-4, altri interessanti candidati mappano nella regione 2q33: il gene del CD28, dell'Inducible Costimulator (ICOS) e del Programmed Death (PD)-1, tutte molecole regolanti l'attivazione dei linfociti T (32).

Altre regioni geniche che sono state recentemente correlate alla MC mappano sui cromosomi 6 (regioni 6q21-22 e 6q25.3), 9 (regione 9p21-13) e 19 (regione 19p13.1). Una variante genica del Fas, una proteina che gioca un importante ruolo nei meccanismi apoptotici, è stata inoltre associata al grado di atrofia dei villi intestinali. In questo senso, si ipotizza che il polimorfismo Fas-670A incrementi l'apoptosi Fas-indotta a carico delle cellule dell'epitelio intestinale, aggravando così il danno mucosale tipico di MC. Un'associazione degna di nota è infine quella trovata tra la MC e il gene della Propil Endopeptidasi (PREP), una serin-proteasi in grado di idrolizzare i peptidi ricchi di prolina (come, ad esempio, quelli derivati dal glutine) al fine di dividerli in frammenti più piccoli. Si ipotizza che, in presenza di MC, questo gene codifichi per un enzima incapace di dividere i peptidi derivati dal glutine in frammenti abbastanza piccoli da non essere riconosciuti dal sistema immunitario come eventuali antigeni. Per quanto intriganti, queste ultime associazioni tra la MC e i geni non HLA-relati necessitano di ulteriori evidenze sperimentali (32).

In generale, è possibile assumere che i geni non-HLA associati alla MC codifichino per prodotti in grado di influenzare la risposta immunitaria verso il glutine, come è stato già dimostrato per i geni HLA. Ciò nonostante, regioni cromosomiche che raggiungano un livello di significatività verso la MC simile a quello mostrato dai geni HLA, non sono state ancora individuate. Probabilmente, quest'evidenza indica che ognuno dei geni non-HLA sopra menzionato presenta, di per sé, un effetto modesto. Le interazioni gene-gene e le molteplici caratteristiche di malattia possono, in definitiva, giustificare questi dati (21).

1.2.4 Le regioni geniche associate alla MC: classificazione internazionale

Le regioni geniche associate alla MC, sia di tipo HLA che non HLA-relate, sono oggi denominate e classificate come segue:

- CELIAC 1: regione 6p21.3 (HLA-DQ2 o, in alternativa, -DQ8)
- CELIAC 2: regione 5q31-33
- CELIAC 3: regione 2q33

Nel caso delle regioni CELIAC 2 e 3, i singoli geni che predispongono alla MC non sono stati ancora individuati con assoluta certezza (32).

1.3 Fattori ambientali

L'unico fattore ambientale a tutt'oggi riconosciuto per la MC è rappresentato dall'ingestione di cereali contenenti le frazioni proteiche tossiche e/o immunogeniche, le quali costituiscono gli antigeni scatenanti la malattia (41).

A oltre cinquant'anni dalla scoperta del ruolo etiologico del glutine nella MC (3), soltanto il frumento (grano tenero), e ultimamente l'avena, sono stati analizzati estensivamente con i metodi scientifici più avanzati (41-43). Per quanto concerne gli altri cereali, a causa della stretta relazione tassonomica con il frumento, l'orzo e la segale sono ritenuti tossici mentre, per la ragione opposta, l'ingestione da parte dei pazienti celiaci di altre specie cerealicole come il riso e il mais è considerata sicura (44).

1.3.1 I cereali e altre specie da cui si ricavano farine: tassonomia, cenni storici e maggiori impieghi alimentari

Dal punto di vista botanico, le piante vengono suddivise in Crittogame se prive di semi e fiori (ad esempio, alghe e funghi) e in Fanerogame se fornite di queste strutture. Le Fanerogame vengono a loro volta suddivise in Gimnosperme se presentano semi nudi e foglie aghiformi (ad esempio, pino, abete, ginepro, etc) e in Angiosperme se caratterizzate da semi racchiusi in un frutto e foglie non aghiformi. Le Angiosperme vengono ulteriormente suddivise in Monocotiledoni, i cui semi sono provvisti di un cotiledone e le cui foglie sono per lo più a venatura parallela, tra cui possono essere

annoverate le Glumiflore, caratterizzate a loro volta da fusto cavo e dall'assenza di calice e corolla. Tra le Glumiflore sono rappresentate le Graminacee (Poacee), a loro volta suddivise in Festucoidacee (Avenacee → avena; Cloridacee → teff; Ordacee o Triticacee → frumento, orzo, segale, farro, kamut e triticale; Orizacee → riso) e in Panicoidacee (Andropogonacee → sorgo; Panicacee → miglio; Tripsacee → mais e lacrima Jobi). Sono qui di seguito riportate e analizzate alcune specie cerealicole da cui è possibile ricavare farine di vitale importanza per l'alimentazione umana.

Avena (*Avena sativa*) → conosciuta fin dal neolitico, cominciò ad imporsi nell'età del bronzo, anche se a quel tempo la sua coltivazione era decisamente sporadica. Successivamente, con il passaggio dall'età del bronzo a quella del ferro, l'avena si impose come cereale importante. Attualmente viene utilizzata per l'alimentazione del bestiame (biada) ma, per il suo alto contenuto in fibre, trova ampio spazio anche nell'alimentazione umana. Nei paesi anglosassoni viene utilizzata per lo più in fiocchi mentre la sua farina, miscelata a quella del frumento, fornisce un buon pane.

Grano o frumento (*Triticum vulgare*) → originario dell'Asia Minore, comparve nell'età del bronzo, momento in cui se ne coltivava una forma primitiva, il frumento nano (*T. aestivum compactum*). Nei periodi successivi, il frumento evolse rapidamente ed acquistò un ruolo di massima importanza tra le coltivazioni cerealicole. Attualmente è il cereale che detiene il primo posto nell'agricoltura mondiale ed è, in assoluto, il più consumato in Italia. Se ne coltivano circa 20.000 varietà raggruppate in grani teneri (*T. aestivum*), dalle cui farine si ricava il pane, e duri (*T. turgidum*), dalle cui farine si ricava la pasta.

Orzo (*Hordeum vulgare*) → conosciuto fin dal neolitico, assunse un ruolo di massima importanza nell'età del bronzo. La sua coltivazione cominciò a diminuire a partire dall'età del ferro, momento in cui dovette cedere il passo alle nuove specie. Attualmente viene coltivato nelle zone montuose per il foraggio e la biada, ma entra anche in altri impieghi alimentari come la preparazione del pane, malto, birra, whisky, etc. Con il malto, misto ad altre farine, si ottengono prodotti dietetici e alimenti per l'infanzia mentre l'orzo puro, unito alle mandorle, dà l'orzata. Questo cereale viene comunemente impiegato anche come surrogato del caffè.

Segale (*Secale cereale*) → conosciuta fin dal neolitico, la sua coltivazione cominciò ad intensificarsi verso la fine dell'età del ferro. In quel periodo rientrava fra le graminacee secondarie, ma a seguito di un peggioramento del clima si dimostrò particolarmente resistente, fino a diventare il principale raccolto in diverse aree geografiche. Soprattutto nel Nord Europa, la farina di segale viene oggi impiegata per la preparazione del pane, cracker e ciambelle, specialmente se miscelata a quella del frumento. Questo cereale è inoltre utilizzato nella preparazione di zuppe. In Italia, viene coltivato per lo più in zone di montagna.

Farro (*Triticum beoticum*) → conosciuto fin dal neolitico e ancora oggi spontaneo in molte regioni orientali (Anatolia, Iraq, Iran e Libano), è un progenitore del grano odierno. Già nel 4300 aC, si seminava infatti sia il farro piccolo (*T. monococcum*) che quello grande (*T. dicoccum*), facendo di queste le specie cerealicole più importanti del periodo, con una leggera preferenza della prima rispetto alla seconda. L'età del bronzo segnò un'inversione di questa tendenza, con una preferenza nella coltivazione del farro grande ai danni di quello piccolo. Successivamente, la resa del farro diminuì a favore di altri cereali. Ricco di proteine, vitamine e sali minerali, ancora oggi il farro trova numerosi impieghi alimentari.

Riso (*Oryza sativa*) → originario dell'Asia Orientale, viene generalmente coltivato nelle pianure irrigue. Durante le cerimonie pubbliche cinesi (2700 aC) questo cereale era già incluso fra le specie coltivate più importanti del momento (frumento, orzo, miglio e soia). Dopo il passaggio in Grecia a seguito della spedizione di Alessandro il Grande, il riso approdò in Italia nel 1468 mentre, le colture del novarese e del vercellese, presero il via all'inizio del XVI secolo. A tutt'oggi, il riso alimenta più della metà della popolazione mondiale. Può essere consumato lessato, in forma di farina o entrare nella preparazione della birra, sakè, distillazioni, etc.

Sorgo (*Sorghum vulgare*) → particolarmente diffuso nei paesi poveri (Africa e Asia), dove la Durrha comprende appunto speciali varietà di *Sorghum*, riveste un'importanza paragonabile a quella del frumento nel resto del mondo. Ricco di ferro, questo cereale viene impiegato anche nella preparazione del pane, della birra e di altre bevande alcoliche.

Miglio (*Panicum miliaceum*) → spontaneo dal Caucaso alla Siberia, era noto già ai tempi del neolitico, ma fu solo alla fine dell'età del bronzo che questo cereale raggiunse un certo livello d'importanza, ulteriormente in crescita nella prima età del ferro mentre, oggi, la sua produzione è in lieve regressione. Ricco di ferro, il miglio resta comunque l'alimento principale per molte popolazioni povere. L'affine panico (*Setaria italica*), la cui coltivazione ebbe inizio nell'età del ferro, viene generalmente utilizzato come nutrimento per gli uccelli.

Mais (*Zea mays*) → originario dell'America, la sua coltivazione è stata introdotta in Italia verso la fine del XVI secolo ed è, a tutt'oggi, uno dei cereali più diffusi nel mondo. Può essere consumato lessato, abbrustolito, in farina o in fiocchi. Dal germe si ottiene un olio ricco di acidi grassi essenziali e acido linoleico.

Le Angiosperme vengono ulteriormente suddivise in Dicotiledoni, i cui semi sono provvisti di due cotiledoni e le foglie si presentano con una venatura reticolata. Tra le Dicotiledoni possono essere annoverate le Archiclamidee, le quali possono essere apetale (con fiori senza petali). Quest'ultime comprendono le Poligonali che, a loro volta, comprendono le Polygonacee, caratterizzate da foglie partenti da una guaina membranosa distinta che circonda il fusto. Tra le Polygonacee può essere

menzionato il grano saraceno (*Fagopyrum vulgare*), una pianta spontanea dal Nepal alla Manciuria e coltivata soprattutto nell'Asia Orientale, anche se la sua coltura è attualmente in lieve regresso. Ricca di calcio, la sua farina può essere utilizzata per l'alimentazione umana, dove trova alto impiego nella preparazione di polente, pizzoccheri, pasta e pane. Il grano saraceno viene infine utilizzato come mangime per animali (soprattutto volatili) e per il foraggio verde.

Le Archiclamidee vengono ulteriormente suddivise in dialipetale (con fiori provvisti di calice e corolla e, spesso, anche di petali), tra le quali è possibile trovare le Centrospermali che, a loro volta, possono essere con petali (piante grasse) o senza petali. Tra le Centrospermali senza petali possono essere menzionate le Amarantacee, tra le quali troviamo l'amaranto (*Amarantus specie*) da cui è possibile ottenere farine alimentari. L'amaranto era, fra l'altro, alla base dell'alimentazione delle popolazioni inca e atzeca. Ricco di calcio, proteine, ferro, fosforo e magnesio, si utilizza oggi per primi piatti, insalate e zuppe.

Tra le Centrospermali senza petali possono essere annoverate le Chenopodiacee, tra le quali troviamo la quinoa (appartenente alla famiglia delle *Chenopodium specie*), da cui è possibile ricavare farine alimentari. Simile al sesamo e ricca di calcio e ferro, la quinoa viene oggi impiegata per la preparazione di pane, biscotti e sfarinati. Se ne può ricavare anche una bevanda alcolica.

Nella figura 1.5 sono schematizzate le relazioni e/o distanze tassonomiche tra i cereali e altre specie da cui si possono ricavare farine per uso alimentare (45).

1.3.2 Le proteine tossiche e/o immunogeniche

In base alla loro funzione e localizzazione, le proteine dei semi (o chicchi) del frumento possono essere classificate in tre tipi:

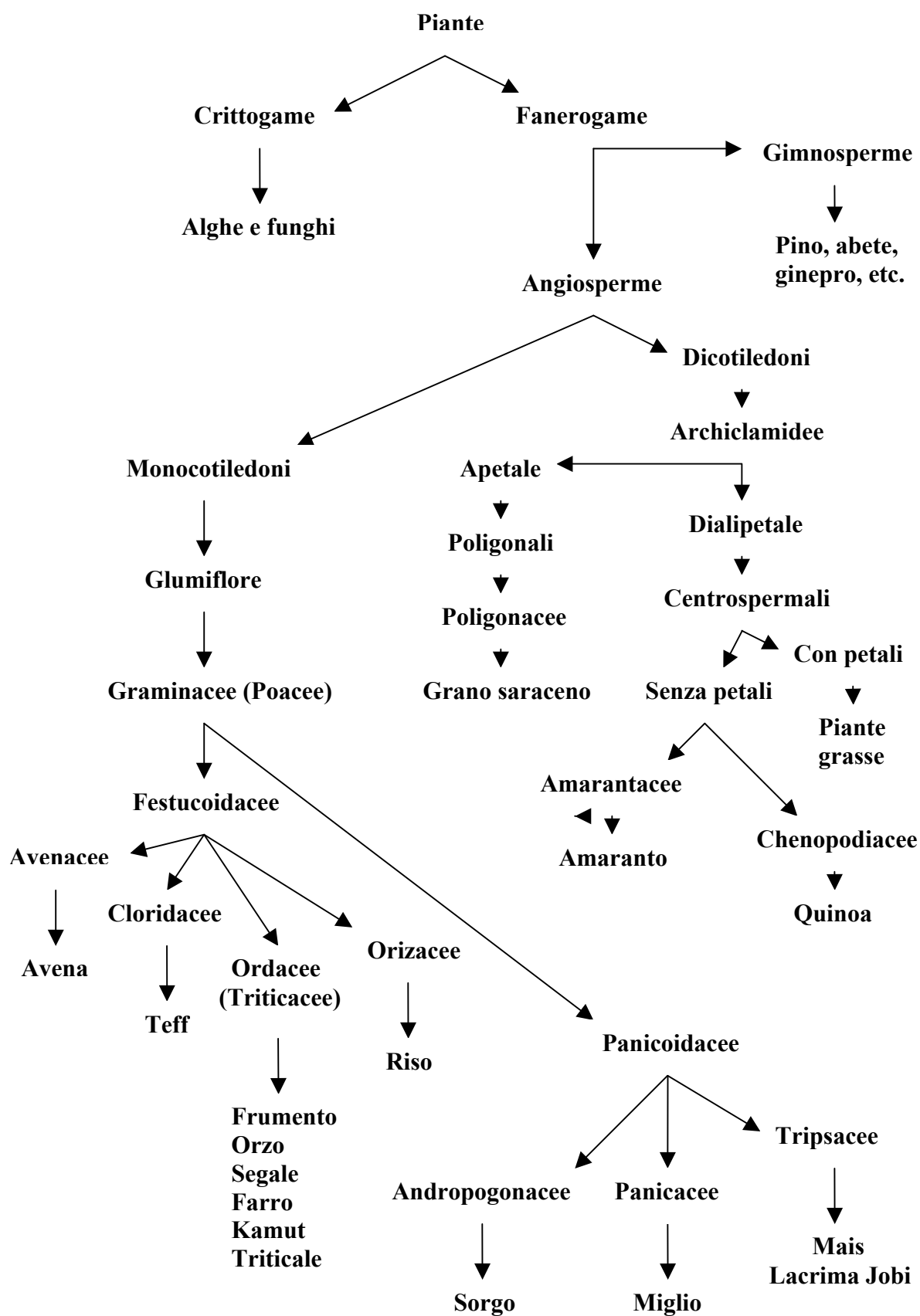
1. proteine di membrana, localizzate in tutte le parti del chicco;
2. proteine di deposito, presenti esclusivamente nello strato impermeabile (endosperma);
3. proteine metaboliche, localizzate sia nell'aleurone che nell'embrione.

Le sequenze di interesse per la MC sono comprese fra le proteine di deposito dell'endosperma che, in base alla loro solubilità, possono essere classificate in quattro tipi:

1. albumine, solubili in soluzioni acquose;
2. globuline, solubili in soluzioni saline;
3. gliadine, solubili in soluzioni alcoliche;
4. glutenine, solubili in soluzioni debolmente acide.

L'insieme delle gliadine e glutenine costituisce il glutine, che può essere definito come la massa coesiva che rimane dopo il lavaggio di un impasto farinoso in acqua. Le qualità reologiche degli impasti farinosi dipendono proprio dall'abilità del glutine di intrappolare il diossido di carbonio. Di norma, al glutine non viene attribuito alcun valore nutrizionale (46,47).

Figura 1.5 - Schema tassonomico dei cereali e altre specie da cui si ricavano farine



Le frazioni alcool-solubili provenienti dai semi di più cereali vengono chiamate collettivamente prolamine, un termine che riflette la loro composizione aminoacidica, il più delle volte caratterizzata da un alto contenuto in prolina e glutamina, mentre aminoacidi essenziali come l'acido glutamico, l'acido aspartico, la lisina, la metionina e il triptofano sono inaspettatamente rari. Per questa ragione, da un punto di vista nutrizionale, una dieta priva di glutine non è svantaggiosa per i pazienti celiaci (48-50). D'altra parte, a seconda del cereale di provenienza, le prolamine vengono designate come gliadine dal frumento, ordeine dall'orzo, secaline dalla segale, avenine dall'avena, orizine dal riso, zeine dal mais, etc. Il contenuto di prolamine nelle farine ottenute a partire da diversi cereali dipende dalla specie, dalla varietà e dalle condizioni di crescita. In questo senso, la farina di frumento esibisce il maggior contenuto in prolamine (4-5 g/100 g di farina) fino a giungere al riso che, di norma, ne è quasi privo (46,47). Come riportato nella tabella 1.3, le prolamine di alcuni di questi cereali sono ritenute responsabili delle lesioni che si generano nella mucosa intestinale dei pazienti celiaci (44,47,51).

Tabella 1.3 - Cereali e relative prolamine in relazione alla MC

Legenda: A = alanina; L = leucina; P = prolina; Q = glutamina.

Cereale	Prolamine	Composizione	Tossicità
Frumento	Gliadine	35% Q; 17-25% P	+++
Orzo	Ordeine	35% Q; 17-25% P	+
Segale	Secaline	35% Q; 17-25% P	+
Avena	Avenine	↑ Q; ↓ P	?
Riso	Orizine	↓ Q; ↑ A, L	-
Mais	Zeine	↓ Q; ↑ A, L	-

Le prolamine più studiate in relazione alla MC sono le gliadine, un complesso proteico estremamente eterogeneo contenente più di cento elementi monomerici lunghi circa 250-300 residui aminoacidici che, sulla base della loro mobilità elettroforetica in ambiente acido, sono stati inizialmente ripartiti in quattro gruppi: α -, β -, γ - e ω -gliadine (52). Successivamente, sulla base delle loro sequenze aminoacidiche N-terminali che, peculiarmente, presentano tratti ripetuti ricchi in prolina e glutamina, tali elementi sono stati raggruppati nelle gliadine di tipo α , γ , e ω (53,54). Anche se la corrispondenza tra la vecchia e la nuova nomenclatura non è completa, si può assumere che le α - e β -gliadine separate elettroforeticamente costituiscano le gliadine di tipo α , mentre le γ - e ω -gliadine siano comprese, rispettivamente, tra quelle di tipo γ e ω (55).

Al contrario delle gliadine, le frazioni parzialmente solubili in soluzioni alcaline (glutenine) tendono a formare grandi strutture polimeriche, contribuendo sostanzialmente alle caratteristiche di

elasticità e viscosità degli impasti farinosi (qualità reologiche). Tali frazioni proteiche sono state ripartite in glutenine ad alto peso molecolare (High Molecular Weight, HMW), lunghe circa 650-800 residui aminoacidici, e in glutenine a basso peso molecolare (Low Molecular Weight, LMW), lunghe circa 270-330 residui aminoacidici. Come le gliadine, sia le HMW che le LMW sono caratterizzate da un alto contenuto in prolina e glutamina e da un basso contenuto in acido glutamico e aspartico. Per questo motivo, anche alle glutenine di norma non viene attribuito alcun valore nutrizionale. Per ogni tipo gluteninico esistono infine molte varianti, anche se il più alto grado di varianza rimane quello esibito dalle gliadine (21).

Poiché la funzione delle proteine del glutine è semplicemente quella di fornire aminoacidi nel momento della germinazione, mutazioni e/o duplicazioni dei relativi geni non sono state selezionate negativamente durante i processi evolutivi. Di conseguenza, tutti i frumenti coltivati portano copie geniche multiple raggruppate in cluster che, a loro volta, sono localizzati su differenti cromosomi, determinando un enorme grado di variazione allelica. Questa eterogeneicità, combinata con le caratteristiche peculiari dei prodotti genici, rende difficile analizzare e, soprattutto, classificare il glutine in modo univoco. Nella tabella 1.4 sono riassunte alcune caratteristiche dei geni e delle proteine del glutine (21,56).

Tabella 1.4 - Caratteristiche dei geni e delle proteine del glutine

Legenda: G = glicina; P = prolina; Q = glutamina.

	Gliadine	LMW	HMW
Geni:			
Numero dei cluster	12	5	3
Designazione dei cluster	Gli-1; Gli-2; Gli-3/5	Glu-3; Gli-3/5	Glu-1
Numero dei geni	>100	>40	6
Proteine:			
Proteine espresse	>100	>40	3-5
Dimensioni delle proteine	20-40 kD	30-75 kD	70-120 kD
Numero degli aminoacidi	250-300	270-330	650-800
Aminoacidi prevalenti	Q (35%); P (25%)	Q (35%); P (15%)	Q (35%); G (20%)
g proteine/100 g di farina	4,0-5,0	3,9-4,5	2,1-2,5

Le conoscenze attuali indicano che vari peptidi del glutine sono coinvolti nella MC con diverse modalità, così che alcuni frammenti vengono definiti tossici ed altri immunogenici. Nello specifico, un frammento viene definito tossico se è in grado di indurre un danno mucosale in vitro (colture di biopsie duodenali) o in vivo (intestino prossimale e/o distale). Parimenti, un frammento viene

definito immunogenico se è in grado di stimolare linee cellulari T HLA DQ2- o DQ8-ristrette e cloni cellulari T derivati dalla mucosa duodenale o dal sangue periferico dei pazienti celiaci.

Innanzitutto, tramite l'uso delle colture di biopsie duodenali, è stato possibile dimostrare che le gliadine hanno un grado di tossicità decrescente nei tipi $\alpha \rightarrow \gamma \rightarrow \omega$. La presenza di tratti simili (sequenze ripetute ricche in prolina e glutamina) nelle porzioni N-terminali delle prolamine di frumento, orzo e segale ha poi suggerito che, virtualmente, una certa sequenza aminoacidica può costituire il determinante tossico. A seguito del sequenziamento di una frazione delle α -gliadine lunga 266 residui aminoacidici, alcuni peptidi gliadinici sono stati sintetizzati e testati allo scopo di valutare il loro grado di tossicità nella MC (Tabella 1.5) (41).

Tabella 1.5 - Peptidi gliadinici tossici

Legenda: A = alanina; E = acido glutamico; F = fenilalanina;

G = glicina; L = leucina; N = asparagina; P = prolina;

Q = glutamina; R = arginina; S = serina; V = valina; Y = tirosina.

Sequenza aminoacidica	Posizione	Tossicità
VPVPQLQPQNPSQQQPQEQ	α -gliadina: 3-21	-
PGQQQPFPQPQPY	α -gliadina: 31-43	+
PGQQQPFPQPQPYPQPQPF	α -gliadina: 31-49	+
PGQQQPFPQPQPYPQPQPFPSQQPY	α -gliadina: 31-55	+
PQPQPFPSQQPY	α -gliadina: 44-55	+
SQQPYLQLQFPQPQLPY	α -gliadina: 51-70	+
LQLQFPQPQLPYPQPQLPY	α -gliadina: 56-75	+
QQYPLGQGSFRPSQQNPQA	α -gliadina: 202-220	-
LGQGSFRPSQQN	α -gliadina: 206-217	+

Negli ultimi anni, grazie all'uso combinato della cromatografia liquida a fase inversa e la spettrometria di massa, un numero ragguardevole di peptidi gliadinici e gluteninici sono stati purificati e testati per la loro immunogenicità. Tra i peptidi riportati in tabella 1.6, quelli la cui attività immunogenica è designata “+++” sono stati definiti epitopi immunodominanti, quelli la cui attività è indicata come “+” sono stati descritti come peptidi ad attività immunogenica, mentre l'unico la cui attività è designata “-” è stato definito semplicemente inattivo. Altre caratteristiche di questi dati sono:

- gli epitopi immunodominanti elicitano una forte risposta T cellulo-specifica in quasi tutti i pazienti mentre, quelli ad attività immunogenica, stimolano le cellule T solo in alcuni di loro;
- alcuni peptidi definiti inattivi o semplicemente immunogenici nella loro forma nativa, diventano potenti stimolatori delle cellule T dopo deamidazione di specifici residui di glutamina, una reazione che comporta la perdita di un gruppo aminico (NH_3) e la trasformazione della glutamina bersaglio in acido glutamico;

- a seguito di riesposizione antigenica in vivo eseguita su pazienti celiaci “guariti”, nel loro sangue periferico è possibile rilevare alcune cellule T responsive verso gli epitopi immunodominanti prima ancora che le stesse cellule T possano rispondere a questo insulto, suggerendo un fenomeno di memoria immunologica (41).

Tabella 1.6 - Peptidi gliadinici e gluteninici immunogenici

Legenda: A = alanina; C = cisteina; D = acido aspartico; E = acido glutamico; F = fenilalanina; G = glicina; I = isoleucina; L = leucina; M = metionina; N = asparagina; P = prolina; Q = glutamina; R = arginina; S = serina; T = treonina; V = valina; W = triptofano; Y = tirosina; d = peptidi deamidati.

Sequenza aminoacidica	Posizione	Immunogenicità
VRVPVPQLQPQNPSQQQPQ	α -gliadina: 1-19	+
QNPSQQQPQEQVPLVQQQ	α -gliadina: 11-28	+
QVPLVQQQFPQGQQPFPQ	α -gliadina: 21-40	+
PGQQQFPFPQQPYQPQPF	α -gliadina: 31-49	+
FPGQQQFPFPQQPYQPQPF	α -gliadina: 30-49	+
QPYQPQFPFSSQQPYLQL	α -gliadina: 41-58	+
PQPFPSQQPYLQLQFPQ	α -gliadina: 46-63	+
PQPQLPYQPQLPY	α -gliadina: 62-75/(d)	+/+++
QLQFPQPYQPQLPY	α -gliadina: 57-68/(d)	+/+++
QLQFPQ	α -gliadina: 57-63 (d)	+++
LQLQFPQPYQPQLPYQPQLPYQPQPF	α -gliadina: 57-89/(d)	+/+++
QLQFPQPYQPQLPY	α -gliadina: 58-69/(d)	+/+++
PQPQLPYQPQLPY	α -gliadina: 63-76/(d)	+/+++
PFRPQQPYQPQPYQPQ	α -gliadina: 93-106 (d)	+
LIFCMDVVLQ	α -gliadina: 123-132	+
QQPLQQYPLGQGSFRPSQQNPQAQ	α -gliadina: 198-222	+
QYPLGQGSFRPSQQNPQA	α -gliadina: 203-220/(d)	+/+
PSGQGSFQPS	α -gliadina: 205-214	-
PSGQGSFQPSQQ	α -gliadina: 205-216/(d)	+/+++
SGQGSFQPSQQN	α -gliadina: 206-217/(d)	+/+++
QGSFQPSQQN	α -gliadina: 208-217/(d)	-/+++
LQPQQFPFPQQPYQPQPYQPQ	γ -gliadina: 60-79	+
FPQQPQQPYQPQPYQPQ	γ -gliadina: 66-78	+
FSQPQQFPFPQ	γ -gliadina: 102-113/(d)	-/+
QPQQSFPEQQ	γ -gliadina: 134-153/(d)	+/+++
VQGQGHQPQQAQL	γ -gliadina: 222-236/(d)	+/+
QQQQPPFSQQQSPFSQQQQ	Glutenina: 40-59/(d)	-/+
QQPPFSQQQQLPLQ	Glutenina: 46-60/(d)	-/+
SGQGQRPGQWLQPGQGQQGYPTSPQQSGQGQQLGQ	Glutenina: 707-742/(d)	+/+
PGQGQQGYPTSPQQSGQ	Glutenina: 719-736	+
GYYPPTSPQQSGQGQQLGQ	Glutenina: 725-742	+
GYYPPTSPQQSG	Glutenina: 725-735	+
QGYYPTSPQQSG	Glutenina: 724-734/(d)	-/+
QQGYYPPTSPQQSG	Glutenina: 723-735	+
GQQGYYPPTSPQQSG	Glutenina: 722-735	+
GQQGYYPPTSPQQS	Glutenina: 722-734	+

Poiché un peptide definito tossico non necessariamente è in grado di attivare cellule T-specifiche e viceversa, i dati sopra riportati esprimono una certa discrepanza tra la tossicità e l'immunogenicità, anche se non escludono che una o più frazioni proteiche possano avere simultaneamente entrambe

le competenze. Ulteriori studi sono auspicabili per dirimere questo e altri dubbi, nonché per completare la già nutrita mappa di peptidi del glutine coinvolti nella patogenesi della MC.

1.4 Teorie evoluzionistiche

E' ormai noto che la sensibilità al glutine è conferita da un particolare assetto HLA, ciò nonostante, le origini evoluzionistiche della MC sono a tutt'oggi incerte e limitate ad alcune ipotesi.

La teoria più accreditata si basa sul fatto che l'uomo, in origine, non introduceva glutine con la dieta né coltivava il grano da cui quest'ultimo deriva mentre, con il passare del tempo, ha imparato sia a produrlo che a nutrirsiene. In alcuni casi, il sistema HLA non sarebbe riuscito a tollerare tale apporto proteico scatenando, di conseguenza, una risposta "irragionevole".

1.4.1 Il primo incontro dell'uomo con il glutine

Circa diecimila anni fa, con il passaggio dal Paleolitico al Neolitico, emerse la produzione del cibo, seguita dai primi grandi cambiamenti nello stile di vita umano (Tabella 1.7).

Tabella 1.7 - Differenze e similitudini tra il Paleolitico e il Neolitico

Paleolitico	Neolitico
Uomini cacciatori e raccoglitori	Uomini agricoltori e allevatori
Nomadismo	Sedenterizzazione
Famiglia nucleare	Famiglia nucleare
Gruppi limitati	Gruppi più numerosi
Cambiamento molto lento	Curva del cambiamento più veloce

Mentre nel Paleolitico l'uomo era nomade, si nutriva di cacciagione e solo occasionalmente di piante spontanee (foraggiamento), a partire da diecimila anni fa alcune mutazioni ambientali e il raggiungimento della densità di saturazione (in questo caso, numero di prede insufficiente a sfamare la popolazione di una determinata area geografica) lo spinsero verso la sedenterizzazione. In termini pratici, l'uomo cominciò ad allevare bestiame e a coltivare piante prettamente a scopo alimentare. E' per questo motivo che si tende a datare il primo incontro massivo dell'uomo con il glutine proprio agli albori della storia antica.

Diecimila anni di coesistenza uomo-glutine e gli esiti di questo impatto suggeriscono che tale complesso proteico deve essere stato uno dei fattori influenzanti i processi evolutivi del Neolitico. Ciò nonostante, questo periodo può apparirci decisamente esiguo se confrontato con la lunghezza della storia evolutiva dell'uomo o, a maggior ragione, con quella della terra (Tabella 1.8). Quest'ultimo aspetto, insieme ai dati di prevalenza della MC nel mondo, suggerisce che il glutine potrebbe ancora oggi esercitare una pressione biologica sull'evoluzione della specie umana (57).

Tabella 1.8 - Ere, periodi, riferimenti temporali espressi in milioni di anni fa e principali eventi storico-evoluzionistici che li caratterizzano

Ere	Periodi	Milioni di anni fa	Principali eventi
Neozòica (quaternaria)	Olocène	0,008	Neolitico (86 milioni di uomini, sviluppo dell'agricoltura, commercio e artigianato, lavorazione del rame, bronzo e ferro, grandi civiltà → storia antica Medio evo e rivoluzione industriale → storia moderna)
		0,015	Mesolitico (civiltà arcaiche, espansione dell'umanità)
	Pleistocène	0,080	Paleolitico superiore (6 milioni di uomini, credenze religiose solari, rappresentazioni artistiche, uso delle abitazioni, gruppi sociali)
		0,180	Paleolitico medio (comparsa di H. sapiens in Africa e dell'uomo di Neandertal in Eurasia, H. sapiens colonizza l'Eurasia, lavorazione delle pelli, utensili e inumazione dei morti)
		1,8	Paleolitico inferiore (inizio delle ere glaciali, estinzione di grandi mammiferi, comparsa di Homo habilis e H. erectus in Africa, H. erectus colonizza l'Eurasia, uso del fuoco, caccia e pesca → preistoria)
Cenozoica (terziaria)	Pliocène	7	Ultimo antenato in comune con le scimmie (scimpanzé), primi ominidi (Australopithecus afarensis, A. africanus, A. boisei, A. robustus)
	Miocène	23	Diffusione dei mammiferi e degli uccelli, grande sviluppo e diversificazione dei mammiferi (cavalli, balene, primati), diffusione delle angiosperme
	Oligocène	40	
	Eocène	60	
	Paleocène	70	
Mesozoica (secondaria)	Cretàcico	130	Estinzione dei dinosauri, primi mammiferi placentati, prime angiosperme
	Giurassico	200	Diffusione dei dinosauri, primi uccelli, primi mammiferi marsupiali
	Triassico	245	Primi dinosauri, diffusione delle gimnosperme
Paleozoica (primaria)	Permiano	290	Numerose estinzioni di invertebrati, diffusione dei rettili, prime gimnosperme
	Carbonifero	350	Diffusione degli anfibi, diffusione degli invertebrati terrestri, primi rettili
	Devoniano	400	Diffusione dei pesci, primi anfibi, primi invertebrati terrestri (insetti), diffusione delle pteridofite
	Siluriano	420	Prime piante terrestri (briofite, pteridofite)
	Ordoviciano	500	Primi vertebrati marini (ostracodermi), primi pesci (placodermi)
	Cambriano	570	Diffusione degli invertebrati marini e delle alghe
Archeozoica (precambriana)	Algonchiano	700	Primi organismi pluricellulari (alghe, meduse e spugne)
		1.500	Comparsa dell'atmosfera ossigenata, primi eucarioti
	Archeano	3.400	Primi procarioti (batteri e alghe azzurre), fotosintesi
		4.600	Formazione della terra, evoluzione chimica (brodo primordiale)

1.4.2 La mezzaluna fertile, l'evoluzione e la diffusione del grano

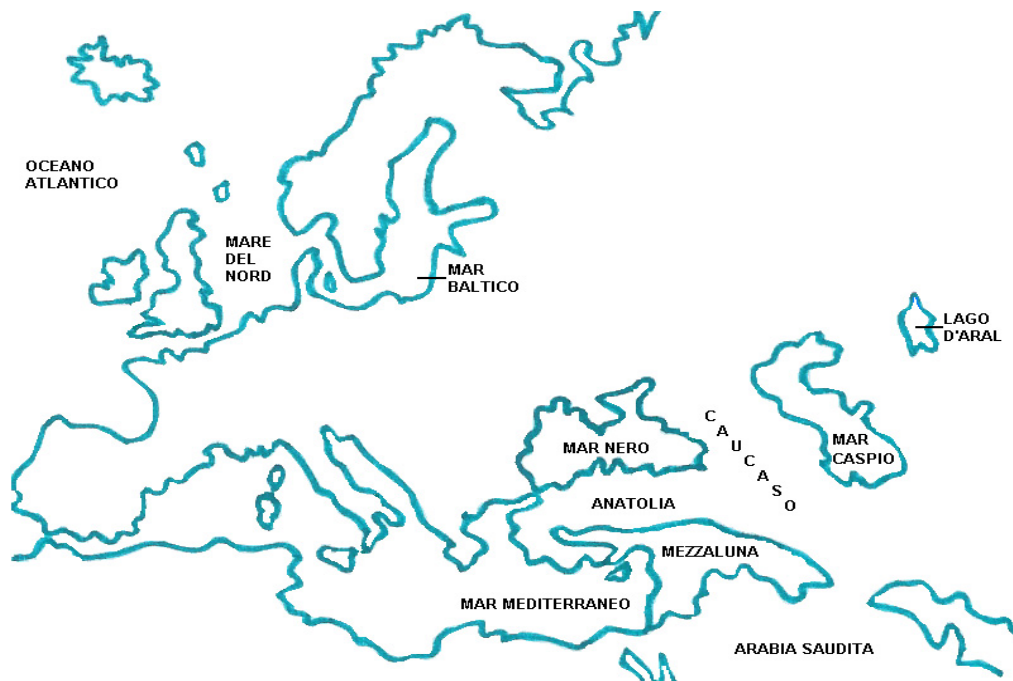
Indagini storico-geografiche hanno permesso di identificare la mezzaluna fertile, una fascia di territorio compresa fra l'Anatolia, il sistema montuoso del Caucaso, l'Arabia Saudita e il mar Mediterraneo, come la più antica area di produzione alimentare del mondo (Figura 1.6). Infatti, grazie al clima caratterizzato da un'estate caldo-secca e un inverno mite con precipitazioni regolari,

tale zona è risultata particolarmente adatta alla domesticazione di piante spontanee a ciclo breve in grado di superare la stagione avversa sotto forma di semi non deperibili (tra cui, appunto, i cereali). Oltre alle condizioni climatiche, i caratteri che hanno reso questa regione così particolare sono stati:

- il fatto che fosse la più vasta distesa di terre a clima mediterraneo;
- la presenza di specie vegetali già molto produttive nella varietà selvatica e in grado di autofecondarsi, mantenendo così ogni mutazione utile per l'uomo;
- la presenza di specie vegetali selvatiche già molto simili alle corrispondenti coltivate poiché, in tal modo, hanno subito nel tempo un minor numero di mutazioni rispetto a quelle di altre zone dove l'agricoltura è comparsa spontaneamente (basti pensare al mais del Mesoamerica, il cui antenato selvatico aveva semi avvolti da uno spesso tegumento non commestibile e pannocchie lunghe poco più di un centimetro);
- la presenza di mammiferi adatti alla domesticazione, preziosi aiuti e fonti di proteine;
- la non adeguata presenza di prede animali che, nella scelta di tipo competitivo tra la produzione alimentare e la caccia-raccolta, ha favorito il primo stile di vita (57).

Figura 1.6 - Posizione geografica della mezzaluna fertile

Comprendente gli odierni stati Iraq, Libano, Palestina e Turchia del sud, la mezzaluna fertile è un territorio prevalentemente pianeggiante i cui rilievi si riducono al Libano, l'Antilibano, i monti Zagros e il Tauro. I fiumi più importanti sono il Tigre e l'Eufrate.



Si pensa che all'alba del Neolitico alcune piante selvatiche mutarono in modo da essere più gradite all'uomo, che inizialmente le aiutava nella dispersione dei semi attraverso le latrine o i rifiuti. In

seguito, la grande quantità di semi ricavabile da alcune piante fra cui il predecessore del frumento attuale (l'einkorn), convinse i cacciatori-raccoglitori della mezzaluna fertile a creare villaggi stanziali, segnando così la nascita dell'agricoltura. Da quel momento il frumento selvatico andò incontro a una serie di modificazioni graduali, fino a raggiungere l'espressione di tutte le specificità agro-alimentari che caratterizzano le varietà odierne. Per esempio, quando l'einkorn raggiungeva la maturazione, i semi avvolti da un involucro erano soliti cadere sul terreno. Dato che si tendeva a mietere i semi saldamente attaccati alla spiga piuttosto che quelli sciolti, tale caratteristica limitava la resa del raccolto. La comparsa di piante i cui semi nudi rimanevano attaccati alla spiga, si è verificata grazie ad ibridazioni casuali tra l'einkorn e altre graminacee selvatiche. Ciascuna ibridazione diede luogo a diverse combinazioni geniche e, quindi, a generazioni con differenti caratteristiche fenotipiche. In due di queste ibridazioni, l'einkorn (genoma AA) si combinò con altre due graminacee selvatiche (BB e DD) dando luogo al frumento da pane contemporaneo (AABBDD). Dato che le generazioni successive mantennero queste caratteristiche, vennero coltivate sempre più varietà con semi nudi e saldamente attaccati alla pianta piuttosto che quelle con semi rivestiti e spighe fragili, facendo sì che tali caratteristiche siano ancora oggi presenti in tutte le specie coltivate (Tabella 1.9) (58).

Tabella 1.9 - Tappe evolutive del grano

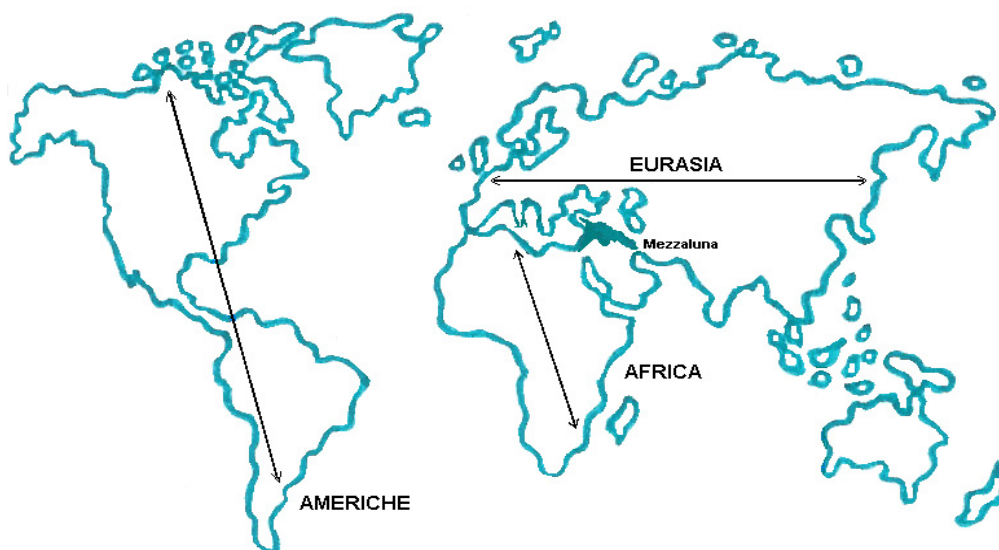
	<u>Gruppo Einkorn</u> Frumenti diploidi 2n=14	<u>Gruppo Emmer</u> Frumenti tetraploidi 2n=28	<u>Gruppo Spelt</u> Frumenti esaploidi 2n=42
<u>Specie selvatiche</u> Semi rivestiti, spiga molto fragile	T. boeoticum [AA] (Einkorn più antico) T. urartu [AA] T. speltoides [BB] T. tauschii [DD]	T. dicoccoides [AABB] (Sviluppato da T. urartu e T. speltoides)	-
<u>Specie coltivate</u> Semi rivestiti, spiga fragile	T. monococcum [AA] (Farro piccolo, sviluppato da T. boeoticum)	T. dicoccum [AABB] (Farro grande, sviluppato da T. dicoccoides)	T. spelta [AABBDD] (Sviluppato da T. urartu, T. speltoides e T. tauschii)
<u>Specie coltivate</u> Semi nudi, spiga robusta	T. sinskajae [AA]	T. turgidum [AABB] (Grano duro) T. turanicum [AABB] (Kamut) T. polonicum [AABB] (Gommer)	T. aestivum [AABBDD] (Grano tenero, sviluppato da T. urartu, T. speltoides e T. tauschii)

Anche se non particolarmente diffuso, il clima mediterraneo non è di certo una caratteristica esclusiva della mezzaluna fertile. Infatti, la nascita e l'evoluzione dell'agricoltura non avvenne soltanto nel vicino Oriente ma, più o meno contemporaneamente, anche nell'America Centrale,

nell’Africa equatoriale e nell’Asia sud-orientale, tutte aree di diffusione delle piante selvatiche da cui derivano quelle a tutt’oggi coltivate (frumento, mais, orzo e riso). In seguito, la velocità di propagazione delle tecniche agricole non fu influenzata da una diversa capacità di utilizzo delle specie domesticabili da parte delle popolazioni locali quanto, piuttosto, dalla direzione preferenziale degli assi dei continenti. Ad esempio, alle latitudini della mezzaluna fertile, questa propagazione venne facilitata dall’estensione est-ovest del continente eurasiatico, lungo il quale le specie vegetali non incontrarono barriere climatiche insormontabili quali il freddo del nord o le continue piogge dell’equatore (Figura 1.7) (57).

Figura 1.7 - Diffusione dell’agricoltura in accordo alla direzione preferenziale degli assi dei continenti

La propagazione dell’agricoltura (mais nelle Americhe, sorgo in Africa, frumento e orzo nella mezzaluna fertile, riso e miglio nell’Asia sud-orientale) avvenne in tempi più o meno brevi solo seguendo i percorsi preferenziali tracciati dagli assi dei continenti, simboleggiati in cartina dalle frecce con la doppia punta. La diffusione agricola a partire dalla mezzaluna fertile fino ad arrivare ai confini del mar Glaciale Artico (vale a dire dal tipico clima mediterraneo al freddo del nord Europa) avvenne, invece, con un ritardo di oltre quattromila anni.

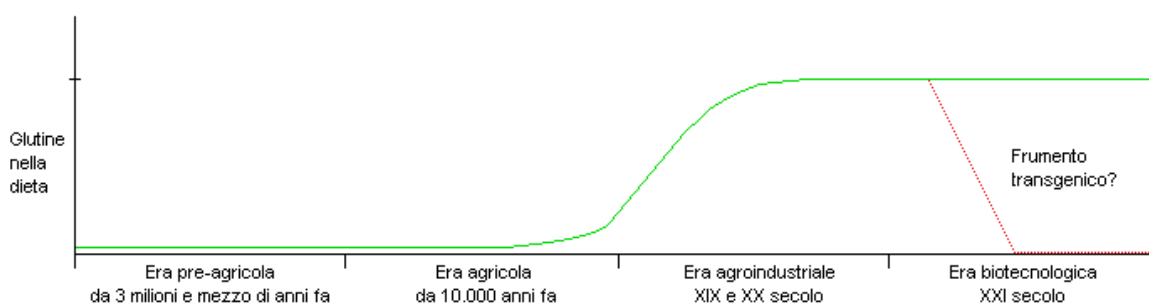


Certamente l’agricoltura rappresentò un passo fondamentale nella storia evolutiva permettendo, fra l’altro, la nascita e lo sviluppo di tecnologie avanzate, la conservazione del surplus alimentare, un notevole aumento della densità di popolazione e l’affermazione di classi non dedite alla produzione del cibo. Questi fattori portarono alla nascita e allo sviluppo di vere e proprie città, che in Medio Oriente contavano qualcosa come 50.000 abitanti. Etimologicamente, il termine “civilizzazione” (dal latino *civitas*, da cui anche il sostantivo “civiltà”) significa infatti “vita da cittadino, nelle città”. Come rovescio della medaglia, il passaggio dalla preistoria alla storia antica si fece portatore di alcuni elementi negativi quali la comparsa delle prime malattie epidemiche, dovute soprattutto al crescente contatto dell’uomo con il bestiame (57).

1.4.3 L'origine e l'evoluzione della MC

La responsabilità del ritardo esistente tra il primo incontro dell'uomo con il glutine (10000 anni fa) e il riconoscimento della MC come tale (fine del XIX secolo) è da ricercarsi in diverse concause. Prime fra tutte le scarse conoscenze mediche, che hanno reso pressochè impossibile l'osservazione e la descrizione del quadro tipico di malattia prima dell'intervento di Samuel Gee e, in secondo luogo, i cambiamenti socio-alimentari che si sono verificati a partire da tre milioni e mezzo di anni fa, vale a dire con la comparsa dei primi ominidi. Accorpendo i suddetti cambiamenti in Ere alimentari e valutando la presenza del glutine nella dieta in funzione di tali periodi, ne risulta un grafico come quello riportato in figura 1.8.

Figura 1.8 - Variazioni della quantità di glutine nella dieta in funzione dei cambiamenti avvenuti nelle principali Ere alimentari



Nell'Era pre-agricola il contenuto del glutine nella dieta era tendente allo zero, fatta eccezione delle piante selvatiche raccolte dalle popolazioni nomadi, che solo occasionalmente venivano utilizzate per scopi alimentari. L'Era agricola segnò l'inizio della produzione alimentare che, a causa dei limiti tecnico-sociali e del ritardo nella diffusione delle conquiste sul campo, conobbe una curva evolutiva piuttosto lenta. Durante l'Era agroindustriale, grazie soprattutto alla netta accelerazione registrata nella curva del cambiamento, il contenuto del glutine nella dieta crebbe rapidamente fino a raggiungere un plateau nel corso del XX secolo. Osservando il grafico riportato in figura 1.8, ciò che suscita maggiore attenzione è che, nonostante la prima Era alimentare sia cominciata tre milioni e mezzo di anni fa, i cambiamenti più importanti si sono verificati nell'arco degli ultimi duecento anni. Quest'ultimo aspetto, oltre a motivare il ritardo esistente tra il primo incontro dell'uomo con il glutine e l'esordio storico della MC, supporta l'ipotesi che tale antigene alimentare possa ancora oggi esercitare una pressione biologica sull'evoluzione della specie umana.

Al fine di giustificare la “sopravvivenza evolutivistica” della MC nella specie umana, è ancora una volta necessario compiere un passo all'indietro, fino alla cosiddetta Era dell'HLA vincente. In questo senso, è utile accennare che il successo dell'uomo sulla maggior parte delle malattie è

mediato dall'azione di una grande varietà di molecole, le quali consentono di maneggiare e riconoscere ogni possibile antigene estraneo. E' il caso, questo, delle molecole appartenenti al sistema HLA, che nei processi evolutivi sono state selezionate proprio per la capacità di legare e presentare ai linfociti le proteine appartenenti ai patogeni più comuni. Tra queste molecole figura senz'altro l'HLA-DQ2, tipico del soggetto celiaco, ma attualmente presente anche nel 20-30% della popolazione generale. Stimando che nell'Era pre-agricola gli eventi infettivi erano certamente più diffusi dell'alimentazione a base di cereali, l'utilità dell'HLA-DQ2 nella risposta agli agenti patogeni dev'essere stata molto più importante della nocività causata dal riconoscimento del glutine come proteina "indesiderata". Per questo motivo, l'HLA-DQ2 sarebbe stato trasmesso così frequentemente dai nostri antenati.

A partire dalla seconda metà dell'Era agricola, la concentrazione del glutine nella dieta salì rapidamente fino ad arrivare alla fine del XIX secolo, momento in cui venne descritto, nel dettaglio, il quadro tipico di MC. In quel periodo le infezioni alimentari erano ancora piuttosto diffuse e, verosimilmente, l'insorgenza del quadro tipico di malattia poteva essere favorito dalla concomitanza di un danno intestinale post-infettivo e una massiccia assunzione di glutine durante il primo anno di vita. E' probabile anche che, nei bambini affetti da celiachia, un'infezione intestinale in atto potesse favorire la comparsa di un grave quadro di diarrea protratta nel tempo, perdita eccessiva di liquidi e ipoproteidemia fino allo shock (crisi celiaca).

Poiché a partire dalla seconda metà del XX secolo le infezioni alimentari sono diventate sempre più rare e il glutine nel divezzamento è stato posticipato, è possibile affermare che nel tempo la celiachia ha "imparato" a nascondere la sua facies intestinale, che oggi costituisce il quadro sintomatologico più raro. In questo momento storico stiamo vivendo, infatti, l'Era della condizione celiaca, caratterizzata da un certo numero di malattie da intolleranza al glutine, ognuna delle quali si presenta con un quadro clinico variabile da una sintomatologia tipicamente intestinale (forme più rare) all'occorrenza di uno o più sintomi extra-intestinali (anemia sideropenica, ipertransaminasemia, osteopenia, etc.) o, ancora, alla sola evenienza di una patologia strettamente correlata (ad esempio, la dermatite erpetiforme) fino a giungere alle forme silenti, apparentemente prive d'indicazioni cliniche suggestive di MC. Tutto questo evidenzia come da una malattia rara d'interesse pediatrico, si è passati oggi a definire una condizione molto più diffusa (1).

1.4.4 La teoria dell'HLA vincente: una visione attuale

Quella dell'HLA vincente è rimasta una teoria speculativa fino al primo studio eseguito sui Saharawi, una popolazione arabo-berbera che, fino al secolo scorso, si cibava di latte e carne di cammello, modeste quantità di cereali, legumi e datteri. In particolare, nei primi anni di vita, i bambini venivano alimentati esclusivamente con latte materno. A seguito della colonizzazione

spagnola la loro alimentazione si arricchì di prodotti a base di cereali, mentre l'allattamento al seno subì una riduzione drastica, tanto che i lattanti venivano divezzati già durante i primi tre mesi di vita. Attualmente i Saharawi vivono in un campo profughi dell'Algeria centro-occidentale, dove il rifornimento alimentare, assicurato dagli aiuti umanitari europei, è costituito in larga misura da derivati del frumento.

Recentemente, su un campione di quasi 1000 bambini Saharawi, è stata calcolata una prevalenza di MC pari a circa dodici volte quella attualmente stimata in Europa (18). Uno studio successivo ha dimostrato che questa popolazione presenta anche un'elevata incidenza dell'aplotipo HLA-DQ2, il quale, insieme al sopra menzionato carico alimentare a base di glutine, sembra essere stato il fattore responsabile del primo caso storico di "endemia celiaca" (19).

Dal punto di vista evolutivistico, è possibile ipotizzare che nei Saharawi HLA-DQ2 positivi, l'atrofia intestinale potrebbe aver rappresentato un fattore protettivo. E' infatti noto che una mucosa intestinale lievemente atrofica è rivestita da enterociti poveri di recettori per i microrganismi enterici i quali, non riuscendo ad aderire alle pareti, scivolano via senza esercitare il loro potere patogeno (59). Questo semplice corollario suggerisce come l'HLA-DQ2, in grado di "proteggere" il singolo individuo da infezioni intestinali come il colera, potrebbe aver rappresentato un vantaggio selettivo nella storia naturale di questo popolo. Il cambiamento delle abitudini alimentari avrebbe poi causato il passaggio da un'enteropatia lieve a una grave atrofia dei villi intestinali, sovvertendo così un equilibrio tra fattori genetici e ambientali stabilitosi in tempi più o meno remoti. Questa interpretazione evolutivistica, sebbene necessiti di ulteriori conferme sperimentali, rappresenta oggi l'unico modello applicabile al paradigma della conservazione dell'aplotipo HLA-DQ2 nella storia naturale della MC.

1.5 La mucosa dell'intestino tenue

Dal punto di vista morfologico, la mucosa del piccolo intestino (detto tenue e formato dai tratti duodeno, digiuno e ileo) consta di tre strati:

1. Epitelio di rivestimento → costituito da un monostrato di cellule cilindriche dette enterociti, si solleva in numerose estroflessioni digitiformi alte circa 1 mm e dette villi che sono, a loro volta, circondate da avvallamenti circolari, le cripte del Lieberkühn. Nel polo apicale, gli enterociti sono ricoperti da una struttura striata costituita da migliaia di microvilli, l'orletto a spazzola o brush border, la cui funzione, al pari di quella dei villi e delle pieghe mucosali (pliche o valvole conniventi), è quella di aumentare la superficie di assorbimento. Un'altra caratteristica delle cellule epiteliali è quella di aderire tenacemente l'una all'altra, così da formare una lamina di tessuto compatta che costituisca una barriera selettiva al passaggio di batteri, virus e vari antigeni alimentari per via paracellulare. Gli enterociti posano, infine, su una lamina basale, un

sottile strato di fibrille costituite da collagene, laminina, fibronectina e glicosaminoglicani (eparina e proteoglicano).

2. Lamina propria → composta da tessuto connettivo areolare lasso, si solleva in sottili protrusioni coniche, ognuna delle quali forma lo stroma di un villo. Questo strato presenta una notevole varietà di tipi cellulari (leucociti, macrofagi, plasmacellule e linfociti), numerose ghiandole, linfonodi e capillari sanguigni e linfatici.
3. Muscularis mucosae → costituente lo strato più interno della muscolatura liscia intestinale, non partecipa alla formazione dei villi ma invia, al loro interno, esili fascetti muscolari che ne assicurano la motilità (60).

Una delle caratteristiche della mucosa dell'intestino tenue è la sua partecipazione ai processi finali della digestione. In questo senso la superficie dei microvilli è ricca di enzimi (di- e oligosaccaridasi, peptidasi e proteasi, lipasi, nucleosidasi, nucleotidasi etc.), spesso riconoscibili come glicoproteine associate alle membrane e dotate di catene laterali che sporgono nel lume, le quali operano la digestione finale di alcune piccole molecole alimentari.

L'epitelio dell'intestino tenue è specializzato inoltre nella funzione di assorbimento dell'acqua, degli elettroliti, dei vari nutrienti (carboidrati, proteine, lipidi, minerali e vitamine) e dei farmaci. In questo senso il polo apicale, rivolto verso il lume, è specializzato nell'assorbimento dei prodotti della digestione mentre il polo baso-laterale, rivolto verso la lamina propria, interviene nei processi di trasporto delle sostanze assorbite verso la rete capillare sanguigna o linfatica sottostante. I tipi di trasporto implicati nei processi di assorbimento sono il cotrasporto, il controtrasporto, il trasporto attivo, la diffusione facilitata, la diffusione passiva e l'endocitosi.

La mucosa intestinale rappresenta infine la superficie corporea più esposta agli insulti antigenici, costituiti principalmente dai microrganismi e dagli antigeni alimentari. Di conseguenza, prevenire la penetrazione di composti indesiderati attraverso la "barriera" mucosale diventa essenziale per il mantenimento dello stato di salute. Tale barriera è costituita dal microambiente iuxtamucoso (barriera idrolitica), dalle plasmamembrane (barriera fisica) e dal sistema immunitario mucosale (barriera immunologica). La barriera idrolitica comprende le mucine, le IgA secretorie, i sistemi secretori litici come il lisozima, le defensine e le criptidine, i batteri commensali e il gradiente di pH tra la superficie della mucosa (acida) e il contenuto intraluminale (alcalino). Per quanto concerne la barriera fisica, in prossimità del polo basale gli enterociti sono tenuti insieme dai desmosomi (macula adherens), verso il lume dalle intermediate junction (zonula adherens) e, vicino al polo apicale, dalle giunzioni serrate o tight junction (zonula occludens). Queste ultime giunzioni, costituite da glicoproteine calcio-dipendenti (E-caderine), sono particolarmente serrate, così che le

membrane apicali degli enterociti risultano congiunte a formare uno strato continuo (61). Il sistema immunitario mucosale verrà ampiamente descritto nei prossimi paragrafi.

1.5.1 Componenti cellulari del sistema immunitario associato alla mucosa intestinale

A livello della mucosa intestinale, le cellule del sistema immunitario si trovano disseminate in tre regioni: lo strato epiteliale, la lamina propria e i follicoli linfatici mucosi o Placche di Peyer (PP). In ognuna di queste aree le cellule hanno caratteristiche fenotipiche e funzionali diverse.

Lo strato epiteliale è popolato da linfociti intraepiteliali (IEL) T CD8+, nel numero massimo di 40 IEL ogni 100 enterociti. Un numero maggiore di IEL è indicativo di un processo patologico coinvolgente il sistema immunitario (62). Il 90% degli IEL esprime un TCR di tipo α/β mentre, il restante 10%, di tipo γ/δ .

La lamina propria contiene una popolazione cellulare composita, nella quale spiccano i linfociti T CD4+ che, di norma, non esprimono marcatori di attivazione. In condizioni patologiche, è possibile riscontrare la presenza di linfociti T CD4+ provenienti dal tessuto linfoide associato all'intestino (Gut-Associated Lymphoid Tissue, GALT) che esprimono marcatori di attivazione immunologica.

Altri tipi cellulari riscontrabili nella lamina propria sono: plasmacellule, macrofagi, mastociti e, in condizioni particolari, granulociti eosinofili. Questi tipi cellulari sono in parte associati al GALT.

All'interno delle PP è possibile riscontrare i linfociti B (che, in questa sede, costituiscono la maggior parte della popolazione linfocitaria) e i linfociti T CD4+, in numero ridotto rispetto alla lamina propria (63).

1.5.2 Alterazioni mucosali tipiche di MC

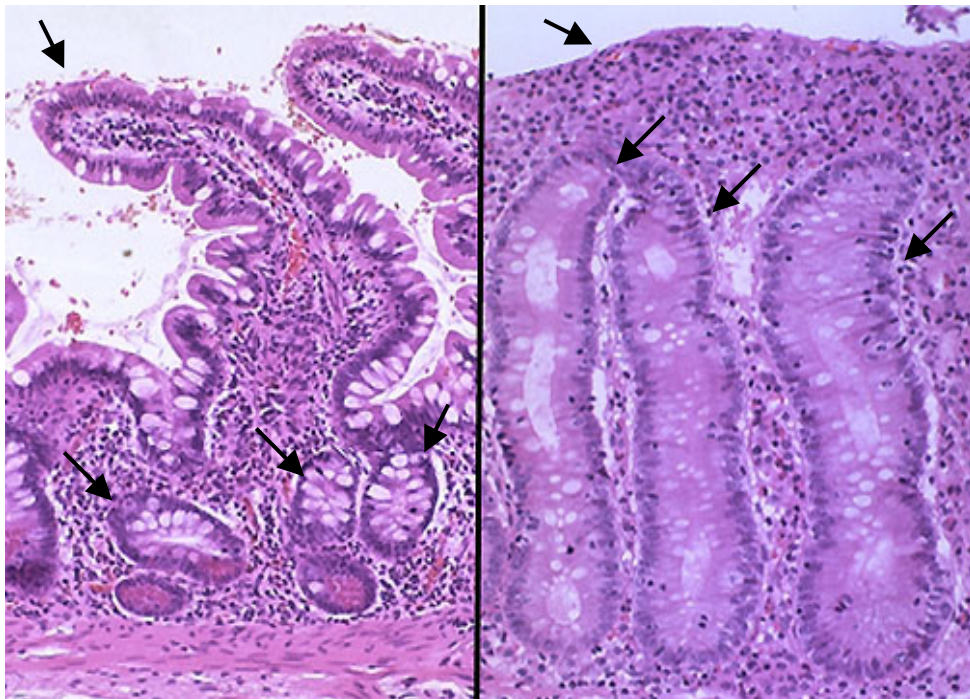
La MC è caratterizzata da un complesso quadro di alterazioni morfologiche e funzionali a carico della mucosa dell'intestino prossimale (duodeno e alto digiuno), in quanto esposto ad alte concentrazioni di glutine.

All'analisi morfologica si evidenzia un'enterite diffusa caratterizzata dalla perdita della normale struttura dei villi, con immagini di distorsione, accorciamento o atrofia da parziale a totale. Lo spessore complessivo della mucosa appare diminuito a causa della perdita di cellule superficiali (esfoliazione), con evidenza di inadeguati stadi maturativi a carico degli elementi neoformati. Gli enterociti appaiono cuboidali, con perdita dei microvilli e vacuolizzazione del citoplasma. Le cripte del Lieberkühn presentano un'attività mitotica aumentata e appaiono allungate, iperplastiche e tortuose. La lamina propria diventa sede di un'infiltrato infiammatorio costituito da plasmacellule, macrofagi, eosinofili, mastociti e linfociti che, spesso, presentano un aspetto plasmocitoide o immunoblastico. Si evidenzia, infine, un aumento significativo del numero degli IEL (Figura 1.9). Poiché queste alterazioni, o parti di esse, possono manifestarsi in altre condizioni come la sprue tropicale (sindrome da malassorbimento ad etiologia infettiva, comune nei Carabi, nell'Africa

centro-meridionale, in India, nel sud-est asiatico e nell’America centro-meridionale), al fine di porre una corretta diagnosi di MC diventa necessario verificare la condizione a seguito di una dieta aglutinata (64).

Figura 1.9 - Alterazioni mucosali tipiche di MC

A sinistra è visibile la situazione normale mentre, a destra, è riportato un caso di atrofia totale dei villi e marcato aumento di profondità delle cripte del Lieberkühn (vedi le frecce). E’ possibile ottenere una stima del grado di lesione grazie al rapporto altezza dei villi/profondità delle cripte che, normalmente, deve essere $\geq 3:1$. Nel caso di destra, è evidente come tale rapporto sia alterato.



A livello funzionale, l’esposizione al glutine causa la ridotta attività di alcuni enzimi del brush border (ad esempio, lattasi, sucralasi, α -glucosidasi neutra, alcalin fosfatasi e leucil- β -naftilamidasi), mentre l’attività di certi enzimi lisosomiali (ad esempio, fosfatasi acida) risulta aumentata. Al pari delle alterazioni morfologiche, anche quelle funzionali sono glutine-dipendenti (65).

Non sempre il quadro sopra descritto è riscontrabile nei pazienti affetti da MC. Una delle forme atipiche meglio caratterizzate è infatti la celiachia latente, in cui la mucosa, pur apparendo morfologicamente integra, mostra fenomeni di attivazione immunologica del tutto sovrapponibili a quelli osservati nei celiaci classici (incremento del numero degli IEL γ/δ^+ e/o aumento dell’espressione di alcuni marcatori di attivazione immunologica sulle cellule mononucleate della lamina propria) (1,66). In alternativa, questa condizione può essere ricondotta ad un artefatto strumentale, correlabile alla piccola estensione della lesione e alla casualità del prelievo biotico. In questo caso si parla di MC con atrofia a placche (la “patchy atrophy” degli autori anglosassoni).

1.6 Patogenesi

Il coinvolgimento del sistema immunitario nella MC è un dato ormai acclarato. Il legame con gli antigeni HLA, i fenomeni d'attivazione immunologica locali e gli elevati livelli sierici di AGA, EMA e anti-tTG, sono elementi qualificanti. Alla base di questa patologia gastroenterologica esiste, dunque, una risposta immune diretta contro diversi costituenti del glutine, in un primo momento innata e, successivamente, adattativa.

1.6.1 Ingresso dei peptidi del glutine nella lamina propria e permeabilità intestinale

Sebbene un gran numero di studi siano stati eseguiti per chiarire il ruolo dei linfociti T nell'induzione del danno intestinale, le conoscenze sulla fase di innesco della MC sono ancora limitate.

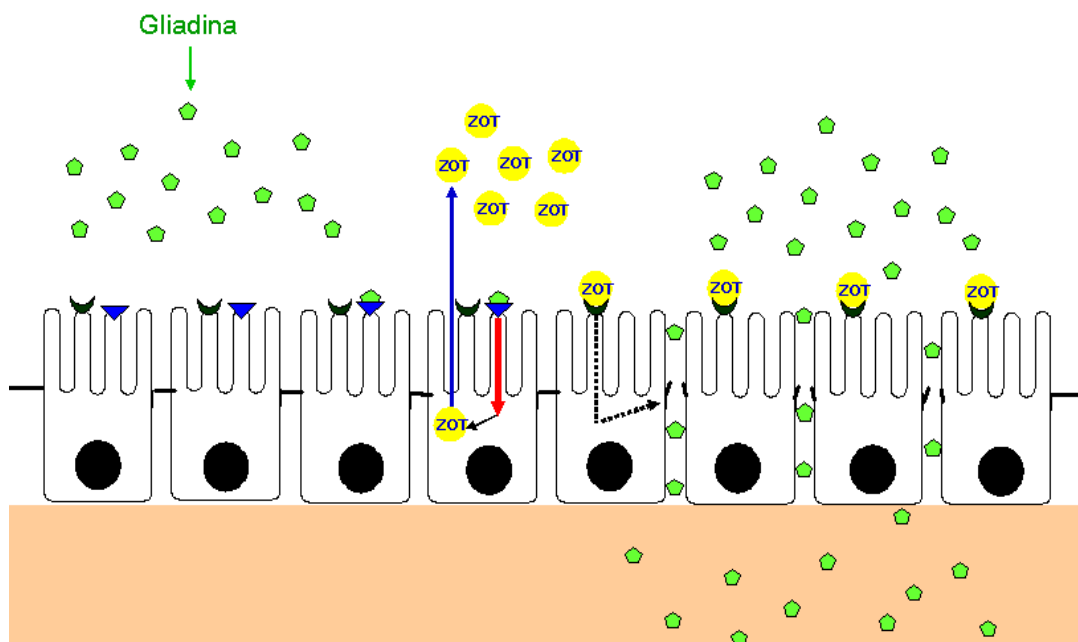
Gli eventi primari della risposta immune glutine-indotta richiedono che gli oligopeptidi incriminati, nella loro forma nativa, abbiano libero accesso alla lamina propria attraverso la superficie relativamente impermeabile del monostrato enterocitario. In genere, gli oligopeptidi vengono efficientemente idrolizzati in aminoacidi, di- o tri-peptidi, ad opera delle peptidasi del brush border, prima che questi possano essere trasportati attraverso l'epitelio. L'evidenza di un gradiente di lesione del piccolo intestino in direzione prossimale → distale, in associazione alla mancanza di una risposta immune diretta contro peptidi immunodominanti pretrattati con l'enzima PREP, suggerisce un disequilibrio già a questo primo livello funzionale (41).

Fino a pochi anni fa, un incrementato trasporto dei peptidi del glutine attraverso l'epitelio intestinale era descritto solo nella celiachia attiva, suggerendo che l'imaturità enterocitaria e/o i processi infiammatori tipici di questa fase di malattia potessero essere responsabili di tale evento. Questa interpretazione non spiegava, comunque, il passaggio degli oligopeptidi incriminati attraverso un epitelio ancora integro, durante le fasi iniziali di malattia (41). In questo senso, un importante contributo è stato fornito dall'evidenza che i peptidi del glutine possono essere traslocati negli enterociti (trasporto transcellulare) all'interno di vacuoli positivi per antigeni HLA di classe II (67), anche se la chiave di volta per la comprensione di questo meccanismo è stata fornita dall'evidenza che il trasporto dei peptidi incriminati può avvenire per via paracellulare, tramite alterazione delle Tight Junction (TJ) (68). Inizialmente si è visto che alcune citochine pro-infiammatorie, come il TNF- α e l'IL-1, sono in grado di ridurre i livelli di trascrizione dell'E-caderina, allentando così le TJ (69). Ma l'evidenza risolutiva è giunta da uno studio eseguito su intestino di ratto, in cui si è dimostrato che la somministrazione di glutine causa un'apertura delle TJ in un pathway modulato dalla zonulina, una proteina in grado di alterare la polimerizzazione dei microfilamenti di actina, importanti regolatori della via di trasporto paracellulare (70). Un'incrementata espressione della zonulina è stata inoltre dimostrata nella mucosa intestinale di

pazienti celiaci in fase attiva (71), deponendo ulteriori indizi a favore di un suo possibile ruolo nell'innesco dei processi patogenetici tipici di MC. In dettaglio si ipotizza che i peptidi del glutine, via interazione con un recettore espresso sulla superficie enterocitaria, siano in grado di indurre una sovraespressione della zonulina che a sua volta, interagendo con i microfilamenti di actina, causerebbe l'apertura della TJ (Figura 1.10).

Figura 1.10 - Aumento della permeabilità intestinale via alterazione delle TJ

Legenda: Zot = zonulina.



In ogni modo, resta ancora da chiarire come i peptidi del glutine attraversino la membrana sulla quale poggiano le cellule epiteliali intestinali (membrana basale). A questo riguardo, è stato recentemente dimostrato che gli enterociti sono in grado di rilasciare vescicole esprimenti il complesso HLA di classe II/peptide antigenico del tutto simili agli esosomi secreti dalle APC professionali, e che questo processo viene amplificato dall'Interferone (IFN)- γ , una citochina chiave nelle risposte adattative. I peptidi incriminati possono quindi attraversare quest'ultima barriera tramite gli esosomi rilasciati dalla porzione baso-laterale degli enterociti (41).

Una volta penetrati nella lamina propria, i frammenti del glutine possono essere catturati, processati e presentati dalle APC professionali ai linfociti T.

1.6.2 Risposta innata

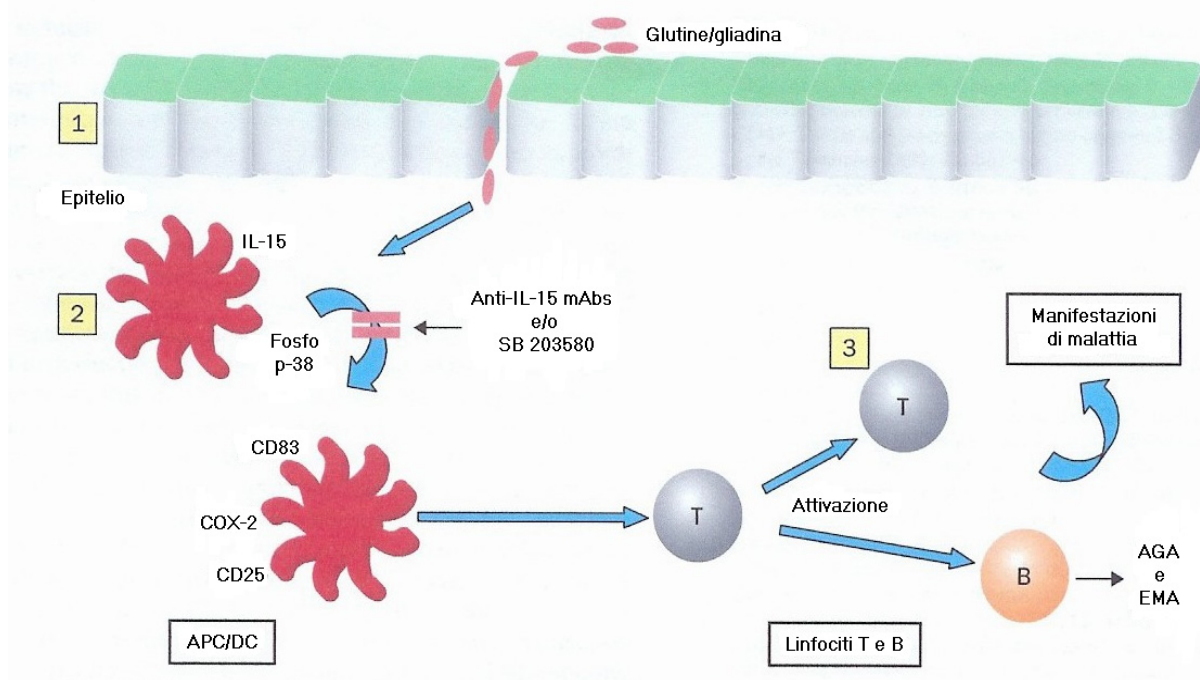
In generale, la risposta innata è un sistema di prima difesa contro l'invasione di agenti microbici, agisce entro poche ore dall'incontro con l'antigene, prima che l'attivazione T-cellulare e/o la sintesi anticorpale possano avere inizio e, infine, non è MHC-ristretta (27).

Nella MC, alcuni peptidi tossici (ad esempio, il p31-43 dell' α -gliadina) sono in grado di indurre una cascata di eventi che si concretano con una sovraespressione dell'IL-15 e della ciclossigenasi (COX)-2, la fosforilazione dell'enzima MAP chinasi p-38 e l'espressione dei marcatori di attivazione CD25 e CD83 su alcune cellule della lamina propria (macrofagi, monociti e cellule dendritiche, tutte a funzione APC). L'espressione della COX-2, del CD25 e del CD83 è dipendente dall'IL-15 e dalla MAP chinasi p-38 mentre, a sua volta, la fosforilazione di questo enzima dipende dall'IL-15 (72). Tali eventi promuovono la differenziazione di vari tipi cellulari residenti nella lamina propria, rendendoli idonei alla funzione di APC. Questa prima fase, specificamente promossa dalle frazioni tossiche, assume quindi un ruolo propedeutico alla successiva presentazione dei peptidi immunodominanti ai linfociti T (72,73). Nella figura 1.11 sono schematizzati questi eventi e le loro interazioni con la risposta adattativa.

Figura 1.11 - Alcuni eventi della risposta innata nella MC

1 = aumento della permeabilità intestinale; 2 = risposta innata; 3 = risposta adattativa.

Legenda: Fosfo p-38 = MAP chinasi p-38 fosforilata; Anti-IL-15 mAbs = anticorpi monoclonali anti-IL-15; SB 203580 = inibitore selettivo della MAP chinasi p-38; COX-2 = ciclossigenasi-2; APC = cellule presentanti l'antigene; DC = cellule dendritiche.



L'IL-15 stimolata dai peptidi tossici è inoltre implicata in alcune modificazioni epiteliali come l'induzione dell'espressione enterocitaria di Ki67, un marcatore di proliferazione cellulare, di TFR, il recettore della transferrina, e di Fas, un recettore coinvolto nei processi apoptotici (74). E' stata infine descritta la capacità dell'IL-15 di stimolare la migrazione di linfociti T specifici, con fenotipo TCR- $\gamma\delta^+$ e CD94+, nel compartimento intraepiteliale (75). Parallelamente è ben noto che, sotto

stimoli infiammatori (IL-15) e/o di stress, gli enterociti esprimono non solo molecole HLA di classe II, ma anche di classe I-like tra cui il MIC-A e l'HLA-E, normalmente riconosciuti dai recettori ad attività di natural killer NKG2D e CD94, presenti sugli IEL specificamente attivati dall'IL-15 (41,75,76). Le interazioni NKG2D-MIC-A e CD94-HLA-E sono sufficienti ad attivare gli IEL e a promuovere, quindi, un marcato effetto citotossico ai danni degli enterociti (41,76). D'altra parte la molecola Fas, la cui espressione sulla superficie enterocitaria (cellula bersaglio) è sempre indotta dall'IL-15 (74), è in grado di riconoscere il suo ligando FasL espresso, fra l'altro, sugli IEL (cellule effettrici). Da questa interazione risulta un effetto citotossico apoptosi-mediato ai danni degli enterociti (41). Attraverso l'induzione dell'IL-15, i peptidi ad attività tossica stimolano, quindi, un meccanismo risultante in un danneggiamento del tessuto intestinale (41,76).

In definitiva, tutti questi eventi depongono per un ruolo chiave dell'IL-15 nella risposta innata e, a più ampio respiro, nella patogenesi della MC. Nello specifico, oltre a causare un danneggiamento mucosale, la risposta innata ha il compito di promuovere alcune modificazioni a carico delle APC professionali atte a "preparare il terreno" alla successiva risposta adattativa, diretta contro gli epitopi immunodominanti. E' interessante infine notare che questo meccanismo non prende mai corpo nei controlli sani, anche se HLA-DQ2 positivi. Dato che la risposta innata risulta essere propedeutica alla successiva coinvolgente gli antigeni HLA di classe II, questa evidenza può spiegare il motivo per cui solo alcuni degli individui HLA-DQ2 positivi sono in grado di sviluppare la MC (41).

1.6.3 Risposta adattativa

In generale, la risposta adattativa comprende i linfociti T e B, è MHC-ristretta, è in grado di ricordare precedenti incontri con l'antigene, di adattarsi ed essere pronta per incontrare di nuovo la medesima molecola antigenica (27).

Nella MC, questa fase ha inizio quando le APC riconoscono gli antigeni primari (epitopi immunodominanti) e li presentano, in associazione alle molecole HLA-DQ2 o -DQ8, ai linfociti T CD4+, determinando lo sviluppo di cloni di cellule T antigene-specifici sia a profilo Th1 (risposta cellulo-mediata) che Th2 (risposta umorale). La deamidazione dei peptidi incriminati, ad opera dell'enzima tTG, crea neoepitopi che si legano con maggiore affinità agli antigeni HLA di classe II coinvolti in questo processo (41).

1.6.4 Ruolo della trasglutaminasi tessutale

La tTG è un enzima Ca^{2+} -dipendente responsabile di alcune modificazioni post-traduzionali delle proteine a mezzo della reazione di transamidazione o, in alternativa, di deamidazione di specifici residui glutaminici. La reazione di transamidazione consiste nella formazione di legami crociati ϵ (γ -glutamyl)lisina tra il gruppo γ -carbrossiamidico di un residuo glutaminico di una proteina e l' ϵ -amino

gruppo (amina primaria) di un residuo lisinico di un'altra catena polipeptidica. La reazione di deamidazione coinvolge, invece, il gruppo γ -carbossiamidico di un residuo glutaminico di una proteina e una molecola di acqua, determinando la trasformazione della glutamina bersaglio (neutra) in acido glutamico (acido). In tutte e due le reazioni è previsto il rilascio di una molecola di ammoniaca (NH_3). A pH fisiologico (7,3-7,4) e in abbondanza di amine primarie, la reazione di transamidazione avviene più velocemente rispetto a quella di deamidazione. Al contrario, a pH debolmente acido e/o in mancanza di amine primarie, il rapporto tra la velocità delle due reazioni risulta invertito. I residui in posizione -1, +1, +2 e +3 rispetto alla glutamina bersaglio, e in particolare gli spazi che intercorrono tra un residuo glutaminico e la prolina più vicina, influenzano l'attività enzimatica della tTG (Tabella 1.10) (21).

Tabella 1.10 - Specificità enzimatica della tTG

Legenda: F = fenilalanina; G = glicina; I = isoleucina; L = leucina; P = prolina; Q = glutamina; S = serina; T = treonina; V = valina; W = triptofano; Y = tirosina; Xaa = qualsiasi aminoacido. La glutamina bersaglio è indicata in grassetto.

Specificità enzimatica	Sequenze
<u>Sequenze preferite dalla tTG</u>	Q-Xaa-P Q-Xaa-P-(I, L, V, F, Y, W, T, S)
<u>Sequenze non preferite dalla tTG</u>	Q-P Q-G Q-Xaa-Xaa-P Q-Xaa-Xaa-G

I peptidi del glutine, particolarmente ricchi in residui glutaminici, si presentano come ottimi substrati per l'attività enzimatica della tTG (21).

1.6.5 Legame dei peptidi immunodominanti con le molecole HLA di classe II

Una volta penetrati nella lamina propria, i peptidi immunodominanti vengono deamidati nell'ambiente leggermente acido del piccolo intestino (pH ~6.6), una condizione favorente questo tipo di reazione ad opera dell'enzima tTG. I peptidi così acidificati vengono quindi catturati dalle APC professionali e, successivamente, presentati ai linfociti T a mezzo della molecola HLA-DQ2 che, per operare un legame ad alta affinità, richiede residui caricati negativamente alle posizioni di ancoraggio P4, P6 e P7, o a mezzo dell'HLA-DQ8, il quale richiede residui caricati negativamente alle posizioni di ancoraggio P1, P4 e P9 (21).

Tramite cristallografia a raggi X, il complesso formato da un HLA-DQ2 e un epitopo del glutine è stato recentemente descritto come un intricato network di legami idrogeno tra le due molecole. Nello stesso studio si è dimostrato che, se deamidato, tale epitopo mostra un'affinità di legame con

l'HLA-DQ2 venticinque volte superiore a quella esibita nella sua forma nativa. L'ipotesi è che l'epitopo deamidato presenta accettori più potenti e per questo in grado di formare legami idrogeno addizionali, risultanti in un complesso peptide-HLA-DQ2 più stabile (77).

A questo punto è possibile affermare che, lungo la sequenza aminoacidica dei peptidi del glutine, la presenza di tratti ripetuti ricchi in prolina e glutamina assume un senso ben preciso, riassumibile nei successivi tre punti:

1. La prolina è un aminoacido la cui alta concentrazione in date sequenze peptidiche ne incrementa la resistenza all'azione digestiva delle proteasi umane. Questo fa sì che peptidi particolarmente ricchi in prolina e glutamina come quelli di cui sopra, non potendo essere scissi in componenti più semplici, risultino fortemente immunogenici.
2. La presenza ripetuta di residui prolamini e glutamini nella loro sequenza aminoacidica, fa di questi peptidi un substrato preferenziale per l'enzima tTG che, a sua volta, ne incrementa l'immunogenicità.
3. Questi peptidi assumono naturalmente una configurazione strutturale caratterizzata da una conformazione secondaria elicoidale levogira di tipo poliprolinico, una delle preferite da tutte le molecole HLA di classe II (41).

1.6.6 Risposta cellulo-mediata e rimodellamento mucosale

La risposta cellulo-mediata a profilo citochinico Th1, controllata dai linfociti T CD4⁺ che riconoscono i peptidi del glutine ristretti per l'HLA-DQ2 o -DQ8, gioca un ruolo centrale nei processi infiammatori e nella genesi delle lesioni mucosali tipiche di MC (41).

Le fasi precoci sono mediate dall'azione delle citochine pro-infiammatorie IFN- α e IL-18 rilasciate dai macrofagi e dalle cellule dendritiche (APC) che, in associazione alla presentazione antigenica degli epitopi immunodominanti, promuovono l'attivazione dei linfociti T CD4⁺ a profilo Th1 con conseguente rilascio di IFN- γ (21). Il contributo dell'IL-12, un induttore del profilo citochinico Th1 tramite attivazione del fattore di trascrizione Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)-4, sembra invece essere meno rappresentativo (21,32). Recentemente si è visto che, in presenza di STAT-1, l'IFN- γ è in grado di indurre il T-bet, un membro della famiglia dei fattori di trascrizione T-box che, a sua volta, promuove la produzione dell'IFN- γ in un pathway IFN- γ →STAT-1→T-bet→ IFN- γ . Questo pathway amplifica la produzione dell'IFN- γ inizialmente stimolata dall'IFN- α e dall'IL-18 e, inoltre, fornisce una valida alternativa alla via tradizionale IL-12/STAT-4 per la regolazione e lo sviluppo del profilo citochinico Th1 (32). A questo punto, le cellule T CD4⁺ producenti IFN- γ stimolano i linfociti T CD8⁺ i quali, attraverso un meccanismo apoptotico Fas-FasL mediato e la produzione di granzyme, contribuiscono ai fenomeni di citotossicità a carico degli enterociti. Parallelamente, l'INF- γ prodotto da tutte le linee cellulari T

induce i fibroblasti a rilasciare le metalloproteasi (MMP)-1 e -3, le quali si rendono responsabili della degradazione sia della matrice extracellulare che della membrana basale. In dettaglio, l'MMP-3 degrada varie proteine non-collagenose a livello della matrice extracellulare mentre l'MMP-1 disgrega le fibrille di collagene presenti nella lamina basale. Infine, l'INF- γ stimola gli enterociti a rilasciare gli esosomi contenenti i peptidi del glutine, nonché i fibroblasti a secernere l'enzima tTG, eventi questi che alimentano ulteriormente l'attivazione immunologica attraverso la deamidazione dei frammenti immunodominanti e la successiva formazione di neoepitopi (41).

Nella tabella 1.11 sono riassunte alcune caratteristiche delle proteine del glutine in relazione ai processi patogenetici tipici di MC (56).

Tabella 1.11 - Caratteristiche delle proteine del glutine in relazione alla MC

	Gliadine	LMW	HMW
Requisiti associati alla MC:			
Epitopi T-cellulari	9 (DQ2); 1 (DQ8)	2 (DQ2)	1 (DQ8)
Motivi tTG-specifici	Molti	Molti	Pochi
Affinità di legame con l'HLA-DQ2:			
Peptidi nativi	Scarsa	?	?
Peptidi trattati con la tTG	Buona	?	?
Risposta T-cellulare a:			
Peptidi nativi	Rara	Rara	Rara
Peptidi trattati con la tTG	Assoluta	Frequente	Frequente

1.6.7 Risposta umorale

La risposta umorale a profilo citochinico Th2, controllata dai linfociti T CD4+ che riconoscono i peptidi del glutine ristretti per l'HLA-DQ2 o -DQ8, comporta la produzione degli anticorpi specifici di MC (41).

Questa fase ha inizio quando i linfociti B quiescenti, grazie alle loro Ig di membrana, vengono a contatto con gli antigeni presenti nella lamina propria. A questo punto, per l'attivazione e la differenziazione in plasmacellule secernenti anticorpi, sono necessari ulteriori segnali forniti dai linfociti T CD4+ a profilo Th2 (cooperazione T-B). Il contatto tra questi due tipi cellulari avviene in seguito alla riesposizione degli antigeni in associazione alla molecola HLA-DQ2 o -DQ8 ad opera dei linfociti B, processo mediato da molecole di adesione (LFA1 e LFA3 sulla cellula B che si legano, rispettivamente, con ICAM-1 e CD2 sulla cellula T) e di costimolazione (B7/BB1 sulla cellula B che si lega al CD28 sulla cellula T). In seguito a questo contatto, il linfocita T rilascia alcune citochine come l'IL-4 e l'IL-5, le quali incrementano la secrezione di anticorpi da parte delle

cellule B attivate. Per lo sviluppo, l'espansione clonale e la commutazione di classe, è necessario inoltre il legame tra il recettore CD40, espresso sulle cellule B, e il suo ligando CD40L, espresso sui linfociti T (27,33).

Per quanto concerne gli anticorpi prodotti, è facilmente intuibile come gli AGA siano una conseguenza diretta della risposta T glutine-specifica. Risulta più complesso, invece, tentare di spiegare il motivo per cui vengono prodotti anticorpi diretti contro la tTG. L'ipotesi più probabile, basata sull'evidenza che la tTG è in grado di promuovere cross-link tra se stessa e i peptidi del glutine, prevede che quando tali complessi proteici vengono catturati dai linfociti B, processati e riesposti alle cellule T glutine-specifiche, vale a dire già attivate da un primo incontro con i peptidi del glutine presentati da APC professionali, ne risulta un pool di plasmacellule secernenti o solo AGA, o AGA e anti-tTG o, in alternativa, solo anti-tTG. Questo scenario indica che gli anticorpi anti-tTG potrebbero essere secondari allo sviluppo della risposta T glutine-specifica e, quindi, non attivamente coinvolti nei processi tipici di MC (76).

Nella figura 1.12 sono riassunti i processi immunologici trattati in questa sede.

1.6.8 Autoimmunità secondaria

Fenomeni di autoimmunità secondaria sono stati descritti solo per quanto concerne la risposta umorale, con evidenze di autoanticorpi diretti contro specificità antigeniche diverse da quelle direttamente coinvolte nella MC ma che, spesso, si rendono responsabili di altre condizioni patologiche.

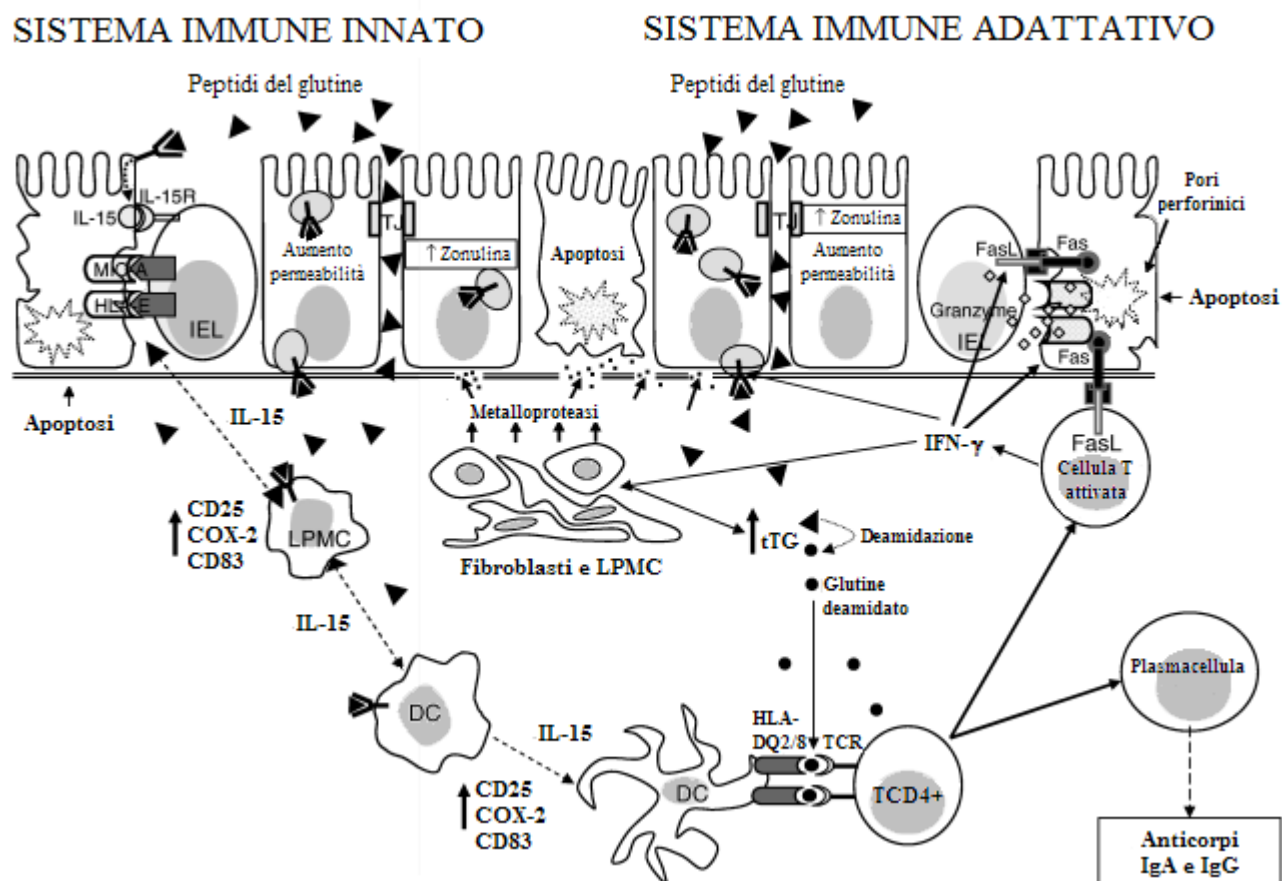
La presenza di anticorpi diretti contro la transglutaminasi epidermica (anti-TGe) è stata dimostrata in soggetti affetti da dermatite erpetiforme (DE), una manifestazione cutanea della MC. Dato che questa condizione è caratterizzata da depositi cutanei di IgA recentemente descritti come immunocomplessi formati dall'antigene TGe legato agli anticorpi specifici, questi ultimi sono stati indicati come l'agente causale delle manifestazioni tipiche della DE (78). Parallelamente, la presenza di anticorpi diretti contro la tTG ossea è stata evidenziata in celiaci con complicazioni coinvolgenti tale distretto tissutale. Anche in questo caso, si è ipotizzato che gli anti-tTG ossea possano avere un ruolo chiave nella genesi delle manifestazioni osteoporotiche associate alla MC (79). Queste due evenienze sono indicative di spreading antigenico, un fenomeno nel quale i cloni linfocitari adattano la propria specificità a diverse condizioni ambientali come, ad esempio, l'inversione del rapporto tra la disponibilità dell'antigene primario (in questo caso, la tTG del piccolo intestino) e quella di una sua isoforma (TGe o tTG ossea) (27).

L'ambiente leggermente acido del piccolo intestino induce la tTG a catalizzare reazioni di deamidazione piuttosto che di transamidazione, anche se la formazione di cross-link tra i residui glutaminici degli antigeni primari e quelli lisinici dell'enzima stesso sono stati descritti e imputati

nel processo di genesi degli autoanticorpi specifici di MC (76). Dato che la lamina propria dell'intestino tenue è ricca di proteine del self in grado di esibire amine primarie utili alla reazione di trasamidazione, virtualmente il processo di cui sopra potrebbe prendere corpo anche per altre specificità antigeniche. Se fondata, questa ipotesi potrebbe giustificare la presenza degli anticorpi anti-zonulina, anti-calreticulina e anti-actina nel siero di alcuni pazienti celiaci (71,80,81).

Figura 1.12 - Risposta immunologica al glutine tipica di MC

Legenda: IL = interleuchina; IL-15R = recettore dell'interleuchina 15; MIC = molecole MHC di classe I-like; HLA = complesso maggiore di istocompatibilità umano; IEL = linfociti intraepiteliali; TJ = tight junction; LPMC = cellule mononucleate della lamina propria; CD25 = catena α del recettore dell'interleuchina 2; COX-2 = ciclossigenasi-2; CD83 = marcatore di attivazione superficiale delle cellule mononucleate; DC = cellule dendritiche; tTG = transglutaminasi tessutale; TCR = recettore dei linfociti T; FasL = ligando della molecola Fas; IFN- γ = interferone- γ ; IgA e IgG = isotipi anticorpali.



Nei pazienti celiaci è stata recentemente riscontrata la presenza di anticorpi diretti contro un costituente nucleare in grado di cross-reagire con alcuni componenti del glutine. Sulla base di queste evidenze, gli autori dello studio hanno suggerito che un meccanismo di mimetismo molecolare potrebbe innescare i processi patogenetici della MC (82). Il mimetismo molecolare è basato sul concetto di degenerazione dei legami antigene-MHC e antigene-MHC-TCR, vale a dire che un clone linfocitario attivato da un antigene primario può rispondere anche a un altro antigene

solo se quest'ultimo, per via di un'omologia di sequenza e/o di un simile ripiegamento proteico e/o di un'equivalente distribuzione di cariche elettriche, risponde ai requisiti minimi per legare le stesse molecole MHC e TCR (27). Questo fenomeno potrebbe spiegare la cross-reattività espressa dai nuovi anticorpi anti-nucleo verso alcuni componenti del glutine, ma non è in grado di discernere l'antigene primario da quello secondario. Ne consegue che, qualora l'ipotesi di cui sopra fosse esatta, ci troveremmo di fronte a uno dei paradigmi più longevi del mondo che vede, come protagonisti, un uovo e una gallina.

1.6.9 Immunomodulazione

Il concetto di immunomodulazione sottintende il tentativo di inibire specifiche fasi patogenetiche, allo scopo di proporre approcci terapeutici alternativi atti ad eliminare o ridurre le manifestazioni cliniche di una patologia a base immunitaria.

Come già visto in precedenza (Figura 1.11), l'uso di anticorpi monoclonali diretti contro l'IL-15 è in grado di bloccare, in vitro, la risposta innata della mucosa intestinale verso i peptidi del glutine, propedeutica all'avvio della risposta adattativa e del conseguente rimodellamento mucosale (72).

D'altro canto, una completa attivazione dei linfociti T richiede almeno due segnali. Il primo è rappresentato dal riconoscimento delle molecole MHC-peptide antigenico da parte del complesso TCR-CD3/CD4 o TCR-CD3/CD8 espresso sui linfociti T. Tale processo richiede un secondo segnale, rappresentato dal riconoscimento del CD28 da parte delle molecole costimolatorie B7/BB1 (CD80/86) espresse sulle APC. Un'altra molecola espressa sui linfociti T, il CTLA-4 (CD152), è in grado di competere con il CD28 per il legame al B7/BB1 e di sviluppare, come conseguenza, un segnale negativo grazie al quale può controllare il processo di attivazione delle cellule T (27). A conferma di quanto detto, è stato recentemente dimostrato che l'uso di una forma solubile del CTLA-4 (CTLA-4Ig) rappresenta un approccio conveniente per controllare, in vitro, la risposta indotta dai peptidi del glutine nella mucosa intestinale (83).

Gli anticorpi monoclonali anti-IL-15 e la molecola chimerica CTLA-4Ig potrebbero, in futuro, rappresentare un approccio terapeutico alternativo alla dieta agglutinata convenzionale. In ogni caso, è da sottolineare che i risultati di cui sopra sono stati conseguiti in vitro. Necessita dunque una sperimentazione in vivo al fine di saggiare l'efficacia dei trattamenti, nonché di controllarne gli eventuali effetti indesiderati.

1.7 Manifestazioni cliniche e patologie associate

Sebbene il principale organo bersaglio della MC sia l'intestino tenue, le manifestazioni cliniche possono essere sia di tipo intestinale che extra-intestinale, deponendo per uno spettro clinico particolarmente eterogeneo che, inoltre, varia anche con l'età del paziente, la durata e l'estensione

della malattia, nonché con la concomitanza di una o più patologie associate. Tutte queste caratteristiche, insieme alle alterazioni istologiche ed immunologiche registrate al momento della diagnosi, permettono di classificare la MC nelle forme: tipica, atipica e silente.

1.7.1 Celiachia tipica

In questa forma l'insorgenza dei sintomi avviene subito dopo il divezzamento, con un calo della curva di crescita fino a valori prossimi al 10° percentile. I bambini si presentano con un addome protuberante, uno scarso pannicolo adiposo e un interessamento dell'apparato di sostegno con evidenza di ipotonia e ipotrofia muscolare, principalmente a livello delle cosce. Le feci sono pallide, fluide, voluminose e maleodoranti, soprattutto a causa del malassorbimento dei grassi. Raramente, si può verificare una condizione diarroica grave con esiti di disidratazione, sbilanciamento degli elettroliti, ipoproteidemia, edema e uno stato shock-simile detto "crisi celiaca". Un'altra manifestazione tipica di MC è l'intolleranza al lattosio, dovuta al deterioramento glutine-dipendente del corredo enzimatico localizzato a livello del brush border (1).

1.7.2 Celiachia atipica

Alcuni sintomi diversi dalle tipiche manifestazioni intestinali possono sottendere la presenza di una MC. Oltre alla celiachia tipica, oggi relativamente rara, si evidenziano infatti forme mono-/oligo-sintomatiche, latenti e potenziali.

La forma potenziale è caratterizzata da una genetica compatibile con la MC in assenza di un quadro clinico/strumentale suggestivo di diagnosi. Gli individui rispondenti a queste caratteristiche rappresentano una categoria a rischio di sviluppare la malattia e, pertanto, passibili di accurati controlli periodici.

La forma latente è caratterizzata da un quadro clinico/sierologico compatibile con la MC in presenza di un normale stato mucosale che, nel tempo, può evolvere verso un'atrofia dei villi intestinali. In questo caso la diagnosi è affidata alla positività sierologica degli EMA e/o anti-tTG, all'elevata concentrazione degli AGA IgA e IgM nel fluido di lavaggio duodeno-digiunale, all'incremento degli linfociti T γ/δ + nel compartimento intracellulare e dei marcatori CD25 e ICAM-1 nella lamina propria della mucosa duodenale (1,66,84).

Le forme mono-/oligo-sintomatiche, spesso diagnosticate in età adulta, si manifestano con un numero limitato di sintomi sia intestinali che extra-intestinali. In particolare, i sintomi extra-intestinali possono essere classificati così come riportato in tabella 1.12 (1,85). Molte di queste manifestazioni, essendo causate più o meno direttamente da uno stato di malassorbimento cronico, evolvono inoltre in esiti di miglioramento, se non di risoluzione completa, a seguito di una dieta priva di glutine.

Tabella 1.12 - Sintomi extra-intestinali associati alla MC

Legenda: IgA = immunoglobuline di classe A; Hb = emoglobina; MCV = volume corpuscolare medio eritrocitario; GH = ormone della crescita; ♀ = sesso femminile; ♂ = sesso maschile; Ca²⁺ = ione calcio.

Tipologia dei sintomi	Sintomi	Eventuali caratteristiche
Dentali	Ipoplasia dello smalto	
Dermatologici	Dermatite erpetiforme	Lesioni cutanee; depositi di IgA
Emopoietici	Anemia sideropenica	↓Sideremia; ↓ferritina; ↓Hb; ↓MCV; ↓folati; ↓vitamina B ₁₂
Endocrinologici	Disordini della coagulazione	↓Vitamina K
	Ipopituitarismo secondario	↓GH → ↓crescita → bassa statura
	Amenorrea	♀
	Oligospermia	♂
	Ridotta fertilità	♀; ♂
	Poliabortività	♀
Epatici	Epatite cronica	↑Transaminasi; esiti istologici
Locomotori	Osteopenia → osteoporosi	↓Ca ²⁺ ; ↓vitamina D; ↓turn-over osseo
	Artralgie/Artriti	
Neurologici	Epilessia	Calcificazioni endocraniche occipitali
Psichiatrici	Depressione	
	Schizofrenia	
Altri	Aftosi	Ulcere ricorrenti nel cavo orale
	Clubbing	Unghie a “vetrino d’orologio”

1.7.3 Celiachia silente

Questa forma è caratterizzata dalla presenza di alterazioni istologiche tipiche di MC in soggetti apparentemente asintomatici. Inizialmente, molti di questi casi sono stati identificati a mezzo di programmi di screening a carattere epidemiologico, coinvolgenti individui supposti essere sani o, in alternativa, perché familiari di celiaci già diagnosticati. In realtà, un’anamnesi accurata rivela che molti di questi pazienti presentano sintomi lievi, quali: deficienza di ferro, disturbi comportamentali come tendenza alla depressione, irritabilità o ridotto rendimento scolastico, ridotto rendimento fisico, sensazione di stanchezza o fatica eccessiva durante l’esercizio fisico, riduzione della densità ossea. Generalmente, dopo un congruo periodo di trattamento con dieta aglutinata, questi pazienti denunciano un miglioramento delle loro condizioni fisiche e psichiche. D’altra parte, le ultime evidenze suggeriscono che i pazienti affetti da MC silente sono a rischio di sviluppare le stesse complicazioni a lungo termine dei celiaci con i sintomi tipici di malattia (1).

1.7.4 Patologie associate

Che la MC sia un disordine a profilo autoimmune è un dato ormai acclarato (Tabella 1.13).

Tabella 1.13 - Autoimmunità e MC: similitudini a “effetto specchio”

Autoimmunità	Malattia celiaca
Autoanticorpi specifici	EMA e anti-tTG
Infiammazione linfomononucleare cronica	Infiltrato linfomononucleare nella mucosa duodenale
Aggressione del self con insorgenza di danni sistemici o organo-specifici	Aggressione degli enterociti con atrofia dei villi intestinali

Lavori recenti sembrano inoltre indicare che questa comune patologia gastroenterologica può essere considerata un fattore di rischio per lo sviluppo di altre malattie autoimmuni (1,86). Sono qui di seguito riportati alcuni esempi di associazione tra la MC e disordini coinvolgenti vari distretti tissutali.

Malattia di Berger (MB) → Questa condizione può essere definita come una nefropatia a lesioni minime caratterizzata da depositi di IgA a livello glomerulare. La prevalenza della MC in un gruppo di pazienti affetti da MB è stata recentemente stimata nella misura del 44,4% (87). Essendo un disordine a deposito tissutale di IgA, la MB può essere ragionevolmente assimilata alla DE. Questo potrebbe spiegare l'alto grado di associazione riscontrato con la MC, anche se gli effetti clinici di una dieta priva di glutine non sono ancora noti.

Diabete mellito insulino-dipendente (DMID) o di tipo 1 → Questa condizione è caratterizzata da lesioni a carico delle cellule β del pancreas evolventi in una disregolazione insulinica e, quindi, del controllo metabolico degli zuccheri, con un marcato aumento dei valori ematici di glicemia. La prevalenza della MC in un gruppo di pazienti affetti da DMID è stata recentemente stimata nella misura del 13,8% (88). Inoltre, se da un lato il glutine può precipitare l'espressione del DMID in alcuni modelli animali (89), dall'altro una dieta aglutinata determina un miglioramento del controllo metabolico e della compliance terapeutica (90). Queste evidenze depongono per un ruolo causale del glutine nell'insorgenza del DMID in un pathway che, ragionevolmente, potrebbe sovrapporsi a quello tipico di MC.

Tiroidite di Hashimoto (TH) → Questa condizione è caratterizzata da lesioni a carico dei tiroцити con implicazioni di natura endocrinologica. La prevalenza della MC in un gruppo di pazienti affetti da TH è stata calcolata nella misura del 4,8% (91). L'incrementata presenza degli anticorpi anti-tiroide (anti-microsomiali, anti-perossidasi e anti-tireoglobulina) nei pazienti celiaci rispetto alla popolazione generale (92,93), è suggestiva di implicazioni patogenetiche comuni tra la MC e la TH.

Atassia da glutine → E' stato recentemente dimostrato che il 39% dei pazienti con atassia cerebellare presenta AGA circolanti, soprattutto di classe IgG. Di questi, il 78% presenta una genetica suggestiva di MC, mentre il 24% esibisce segni di atrofia intestinale (94). Parallelamente, la presenza degli AGA è stata dimostrata anche nel fluido cerebro-spinale dei pazienti atassici (95), suggerendo che tali anticorpi potrebbero cross-reagire con epitopi self espressi nel cervelletto. Questa condizione neurologica è stata pertanto definita "atassia da glutine".

Altre condizioni → Ulteriori disordini associati alla MC sono:

- Alopecia areata;
- Cardiomiopatia dilatativa;
- Deficit selettivo di IgA;
- Epatiti autoimmuni;
- Lupus eritematoso sistemico;
- Malattia di Addison;
- Mielopatie e neuropatie periferiche;
- Psoriasi;
- Sindrome di Sjogren;
- Spondiloartropatie (85,96,97).

Già nel 1975 si ipotizzava che il glutine potesse indurre la deposizione di immunocomplessi in vari organi, rendendosi così responsabile dell'associazione tra la MC e altre condizioni patologiche (98). Sulla stessa linea, sebbene dopo un trattamento con dieta aglutinata non in tutte le patologie associate alla MC è stato documentato un miglioramento clinico, l'evidenza che queste ultime si presentano principalmente in età adulta suggerisce una correlazione con la maggiore durata di esposizione a tale antigene alimentare (86). In casi come questi, operare una diagnosi precoce e seguire attentamente i pazienti sottoposti a trattamento dietetico, diventa quindi una procedura indispensabile. D'altra parte, in accordo a nuove evidenze sperimentali, tali associazioni potrebbero essere semplicemente il frutto di un substrato genetico comune (Tabella 1.14) (99-108).

La MC può costituire, infine, un fattore di rischio per alcune condizioni maligne come il carcinoma della faringe e dell'esofago, l'adenocarcinoma del piccolo intestino e il linfoma a cellule T a localizzazione gastrointestinale.

In conclusione, l'ampio spettro dei sintomi e l'estrema varietà delle patologie associate permettono di ridefinire la MC come un complesso disordine di tipo autoimmune, coinvolgente più organi ed apparati, che non sempre si presenta come una sindrome da malassorbimento. Sulla stessa linea, la MC è stata recentemente designata "il grande imitatore" (85).

Tabella 1.14 - Predisposizione HLA nelle patologie associate alla MC

Patologia associata	Predisposizione HLA
Cardiomiopatia dilatativa	DR4 predisponente; DR3 protettivo
Deficit selettivo di IgA	DR3-DR7/DQ2
Diabete mellito insulino-dipendente	DQ2; DQ8
Epatiti autoimmuni	DR3/DQ2
Lupus eritematoso sistemico	DR3
Malattia di Addison	DR3/DQ2; DR4/DQ8
Sindrome di Sjogren	DR3/DQ2
Spondiloartropatie	DR4
Tiroidite di Hashimoto	DQ2

1.8 Protocollo diagnostico

La diagnosi della MC prevede un protocollo ben preciso, le cui linee guida sono state stabilite da una commissione internazionale e revisionate, in ultima analisi, nel 1990 (Tabella 1.15) (109).

Tabella 1.15 - Protocollo diagnostico della MC

Al fine di porre una corretta diagnosi di MC, le prime tre fasi sono indispensabili e andrebbero eseguite comunque, mentre il secondo controllo andrebbe eseguito solo in caso di persistenza del dubbio diagnostico.

Fase	Dieta	Protocollo
1° fase (screening)	Dieta contenente glitine	• Documentazione clinica • Positività ai test sierologici
2° fase (diagnosi)	Dieta contenente glutine	• Documentata atrofia dei villi sulla biopsia duodenale
3° fase (1° controllo)	Dieta priva di glutine	• Regressione dei sintomi • Negatività ai test sierologici • Documentata ricostruzione dei villi sulla biopsia duodenale
4° fase (2° controllo)	Dieta contenente glutine	• Ricomparsa dei sintomi • Positività ai test sierologici • Documentata atrofia dei villi sulla biopsia duodenale

Seguirà un rapido escursus sugli anticorpi utili per lo screening, sull'esame istologico necessario per la diagnosi e sulla descrizione di un nuovo metodo: l'esame culturale.

1.8.1 Anticorpi anti-endomisio

Gli EMA, determinati in immunofluorescenza indiretta, si presentano con un pattern a nido d'ape distribuito sulla muscolaris mucosae di un'opportuna sezione criostatica, per la quale sono stati proposti vari substrati: l'esofago di scimmia, il cordone ombelicale umano, il digiuno di scimmia e il rene di ratto. Gli ultimi due sono utilizzati, rispettivamente, per gli anticorpi anti-digiuno e anti-reticolina, caratterizzati entrambi da un pattern simile a quello degli EMA (110,111). Ciò nonostante, mancano prove conclusive a dimostrazione del fatto che questi pattern identifichino lo stesso anticorpo endomisiale. E' invece certo che tanto l'esofago di scimmia che il cordone ombelicale umano possono funzionare da substrato per gli EMA anche se, per pulizia d'immagine e chiarezza del messaggio, è preferibile l'uso di sezioni criostatiche ottenute dalla prima fonte (112). I risultati possono essere espressi sia in termini qualitativi (positivo/negativo) che semiquantitativi (la massima diluizione alla quale il campione si presenta positivo). Per quanto concerne gli EMA di classe IgA, la specificità riportata in letteratura è sempre del 100%, mentre la sensibilità varia dal 74 al 100% (113,114). Con l'uso combinato degli EMA IgA e IgG1 la sensibilità incrementa fino a valori prossimi al 100%, mentre la specificità resta pressoché invariata (115).

1.8.2 Anticorpi anti-transglutaminasi tessutale

Gli anticorpi anti-tTG di classe IgA vengono misurati con una tecnica quantitativa di tipo immunoenzimatico, per la quale la scelta del substrato antigenico è inizialmente caduta sulla tTG estratta da fegato di cavia, con risultati di elevata sensibilità (95-98%) ma minore specificità (94%) (116-117). L'uso di un test basato sulla tTG ricombinante umana ha comportato un miglioramento delle performance (118), anche se permangono casi di falsa positività in associazione ad alcune condizioni quali il morbo di Crohn, la colite ulcerosa e la cardiomiopatia dilatativa (119,120).

1.8.3 Anticorpi anti-gliadina

Gli AGA di classe IgA e IgG, anch'essi misurati con una tecnica immunoenzimatica, presentano una sensibilità e una specificità inferiori al 90%. Motivo portante, questo, del loro limitato utilizzo nel protocollo diagnostico della MC (117,121).

1.8.4 Esame istologico

L'esame istologico, effettuato tramite colorazione delle sezioni biotiche con ematossilina-eosina e successiva osservazione al microscopio ottico, deve documentare l'atrofia dei villi intestinali accompagnata ad iperplasia delle cripte (rapporto lunghezza dei villi/profondità delle cripte $<3:1$) a dieta contenente glutine, con ritorno alla normalità (rapporto villo/crypta $\geq 3:1$) dopo dieta priva di glutine. Nella tabella 1.16 è riportata una classificazione istologica utile per la diagnosi della MC, stabilita da Marsh nel 1995 e modificata nel 1999 da Oberhuber (122,123).

Tabella 1.16 - Classificazione istologica di Marsh/Oberhuber

Legenda: ↑IEL= aumento dei linfociti intraepiteliali (>40 linfociti/100 enterociti);
↓villi= atrofia parziale; ↓↓villi = atrofia subtotale; ↓↓↓villi = atrofia totale

Classe I	Classe II	Classe IIIa	Classe IIIb	Classe IIIc
Villi normali	Villi normali	↓villi	↓↓villi	↓↓↓villi
Cripte normali	Iperplasia delle cripte	Iperplasia delle cripte	Iperplasia delle cripte	Iperplasia delle cripte
↑IEL	↑IEL	↑IEL	↑-↑↑IEL	↑↑↑ IEL

L'esame istologico utilizzato per la diagnosi della MC presenta, comunque, alcuni limiti:

- casualità del prelievo biotico, il quale potrebbe avvenire in zone dell'intestino in cui la lesione non è evidente (atrofia patchy) o è del tutto assente (celiachia latente);
- problemi tecnici (orientamento e taglio del pezzo biotico);
- dipendenza dall'osservatore (soggettività della lettura).

1.8.5 Esame colturale

Per tentare di ovviare ai limiti di cui sopra, all'esame istologico è stato recentemente affiancato un metodo di elevata sensibilità e specificità: l'esame colturale. Questo prevede la coltura, in un opportuno terreno, di frammenti biotici di mucosa intestinale sia in presenza che in assenza di glutine, al fine di valutare l'eventuale produzione degli EMA. Si tratta di un test che sta assumendo un ruolo di primaria importanza nel protocollo diagnostico della MC, soprattutto nei casi in cui, sia per mancanza di dati clinici evidenti che di prelievi biotici adeguati per l'esame istologico, la diagnosi iniziale potrebbe risultare dubbia (124,125).

1.9 Trattamento e management del paziente celiaco

Una dieta priva di glutine (gluten-free diet, GFD), che duri per tutta la vita, costituisce il trattamento principe della MC.

In dettaglio, i cereali appartenenti al gruppo tassonomico Triticacee (frumento, orzo, segale, farro, kamut e tritcale) sono comunemente esclusi dalla GFD. Anche il malto, un idrolizzato parziale dell'orzo o della segale, le bevande che ne derivano (birra) e i distillati alcolici (whisky) sono considerati tossici. Studi recenti supportano la possibilità che l'avena (gruppo Avenacee) possa essere inclusa nella GFD, anche se in quantità moderate. D'altra parte, gli alimenti possono risultare sospetti sia se confezionati in casa, sia se si tratti di preparazioni industriali. Nella prima evenienza, al fine di rispettare le condizioni di sicurezza, è sufficiente evitare ogni forma di contaminazione.

Nel caso delle preparazioni industriali, nelle quali le farine possono essere usate per addensare, adsorbire, aumentare il volume e lubrificare, è sufficiente controllare l'etichetta degli ingredienti. I medicinali possono contenere tracce di glutine sotto forma di ingredienti farmacologicamente inattivi. In linea di massima è preferibile assumere preparazioni liquide (fiale) o, in alternativa, controllare la lista degli eccipienti. Per quanto concerne i cosmetici, l'unica e ragionevole limitazione è sui rossetti, anche se al momento non esistono particolari indicazioni sulla presenza/assenza di glutine.

Una delle maggiori controversie nel trattamento della MC è la quantità di glutine permessa nella GFD. L'acquisizione di nuove conoscenze clinico/patogenetiche ha recentemente permesso di ridefinire il termine gluten-free. Infatti, se in passato gli alimenti contenenti una percentuale di glutine inferiore allo 0,02% ne erano considerati privi, il termine gluten-free è attualmente indicativo di completa assenza di tale contaminante mentre, per valori <0,02%, la terminologia usata è "low gluten" (bassi livelli di glutine). In ogni caso, poiché mancano evidenze scientifiche tali da stabilire se esista, o meno, un valore soglia al di sotto del quale non si verificano effetti dannosi, il rigore della GFD è un argomento solo parzialmente risolto (1).

2. I CEREALI: IMPLICAZIONI NELLA MALATTIA CELIACA E POSSIBILI APPROCCI DI STUDIO

Date le conoscenze attuali sulla MC, è possibile affermare che:

1. sia l'antigene primario (peptidi del glutine) che l'autoantigene dominante (transglutaminasi tessutale) sono noti;
2. l'antigene primario può essere rimosso e reintrodotta in modo controllato;
3. le molecole HLA predisponenti alla malattia (HLA-DQ2 o -DQ8) sono state identificate;
4. al fine di eseguire studi su tessuto e/o popolazioni cellulari isolate, l'accesso all'organo bersaglio (intestino tenue) è relativamente semplice.

La combinazione di questi quattro elementi rende la MC un ottimo modello di studio, sia per la comprensione dei meccanismi patogenetici che per l'identificazione e caratterizzazione di fattori potenzialmente tossici (21,41).

2.1 Cereali tossici

A oltre cinquant'anni dalla scoperta del ruolo etiologico del glutine nella MC (3), soltanto il grano tenero è stato analizzato con i metodi scientifici più avanzati (41), mentre la tossicità degli altri membri del gruppo Triticaceae (orzo, segale, farro, kamut e triticale) è stata decisa "a tavolino" in virtù delle strette relazioni tassonomiche con il primo cereale (44).

In dettaglio, la tossicità del frumento riguarda molteplici componenti proteiche controllate da più geni a diversa localizzazione cromosomica (56). Teoricamente, l'ingegneria genetica potrebbe consentire di modificare le sequenze aminoacidiche in modo da silenziarne la tossicità, ma i geni da modificare sono così numerosi da rendere questo approccio impraticabile, almeno nel prossimo futuro. D'altra parte, poiché l'attitudine panificatoria del grano tenero e la qualità pastificatoria del grano duro sono dovute proprio alle caratteristiche funzionali delle gliadine e glutenine (126,127), modificare tali sequenze senza alterare le proprietà reologiche dei cereali rappresenta un'ulteriore difficoltà per l'applicazione di questo complesso approccio sperimentale.

2.2 Cereali a ridotta tossicità

Un approccio alternativo è rappresentato dallo studio dei cereali a ridotta tossicità, tra cui l'avena. Studi in vitro hanno infatti dimostrato che le avenine non sono in grado di stimolare la produzione di anticorpi specifici o di citochine infiammatorie da parte di frammenti biotici intestinali di pazienti celiaci (42,43). Ciò nonostante, queste stesse proteine inducono un'infiltrazione linfocitaria

nell'epitelio rettale e una stimolazione specifica in cellule T isolate dall'intestino di pazienti celiaci (128,129), tanto che l'eventuale inserimento dell'avena nella GFD è ancora in discussione.

Le prolamine di alcune varietà di grano duro presentano una tossicità ridotta sia in cellule di intestino fetale di ratto che in quelle di pazienti celiaci (130). Anche per un cereale primitivo, noto come grano monococco, è stato dimostrato un certo grado di atossicità (131).

D'altra parte, alcune specie cerealicole come il *tripsacum lacrima Jobi*, il miglio e il sorgo sono filogeneticamente vicine al mais e, pertanto, è probabile che non siano tossiche per i pazienti celiaci. Sulla stessa linea, specie come il grano saraceno, l'amaranto e la quinoa sono dicotiledoni e, presumibilmente, prive di frazioni proteiche tossiche (Figura 1.5). Tuttavia, non sono stati ancora condotti studi scientifici sulla sicurezza d'uso di queste specie.

2.3 Quesiti scientifici

La maggior parte delle conoscenze sulla tossicità dei cereali deriva da studi parziali, eseguiti utilizzando metodi in vitro e test clinici datati. Tra i metodi in vitro, è possibile menzionare gli studi di tossicità eseguiti sull'intestino fetale di ratto (130), quelli di proliferazione e capacità di formare colonie realizzati sulle linee cellulari di adenocarcinoma colico umano CaCo2 e quelli di agglutinazione operati sulle cellule eritroidi umane indifferenziate della linea K562 (132,133), tutti sistemi in grado di esprimere alcune caratteristiche degli enterociti del piccolo intestino. Oggi è possibile studiare gli effetti tossici dei cereali direttamente su frammenti intestinali o, in alternativa, su cellule isolate da tessuto o sangue periferico di soggetti affetti da MC (42,129).

Data la disponibilità di questi nuovi metodi di studio, sarebbe auspicabile verificare la presunta tossicità di alcuni cereali quali l'orzo e la segale. Inoltre, qualora venisse confermata la ridotta tossicità dei grani duro e monococco e si chiarisse la posizione dell'avena, si potrebbero aprire nuove prospettive per la dieta dei pazienti celiaci. Parimenti, si potrebbe ridurre il livello di esposizione della popolazione generale (inclusi i celiaci latenti e potenziali) a prodotti alimentari contenenti proteine potenzialmente tossiche. Rimane infine da confermare l'atossicità di cereali o specie affini quali il *tripsacum lacrima Jobi*, il miglio, il sorgo, il grano saraceno, l'amaranto e la quinoa.

2.4 Un nuovo metodo di studio: la coltura d'organo

Questo metodo, già utilizzato allo scopo di indagare la tossicità di alcuni frammenti gliadinici (134,135), prevede la coltura di biopsie intestinali sia in solo terreno che in presenza di gliadina o di prolamine estratte da altri cereali, al fine di valutare la produzione anticorpale e/o l'espressione dei marcatori di attivazione tissutale stimolati dal contatto con i vari antigeni. I controlli interni sono

costituiti dalle biopsie coltivate in solo terreno (risultato atteso: assenza di produzione anticorpale e di espressione dei marcatori tissutali) e in terreno addizionato del digesto peptico-triptico (PT) di gliadina (risultato atteso: produzione anticorpale ed espressione dei marcatori tissutali). La notevole semplicità di esecuzione e, considerando che è in grado di valutare la tossicità dei cereali direttamente sulla mucosa intestinale di pazienti celiaci, l'alta specificità dei risultati, fanno di questo metodo un approccio sperimentale di facile applicazione e di ampie potenzialità in vantaggio agli scopi del presente studio.

3. SCOPO DELLO STUDIO

Dato che, fatta eccezione del frumento, la tossicità degli altri membri del gruppo Triticaceae è stata stabilita sulla sola base della vicinanza tassonomica con il primo cereale (44), uno scopo del presente studio è stato verificare l'effetto delle prolamine estratte da orzo e segale sulla mucosa intestinale di soggetti affetti da MC.

In secondo luogo, nonostante l'elevato numero degli studi eseguiti per chiarire il ruolo dell'avena nei processi patogenetici della MC (42,43,128,129), l'inserimento di questo cereale nella GFD è ancora in discussione. Un altro scopo del presente studio è stato, quindi, chiarire l'effetto delle prolamine estratte dall'avena sulla mucosa intestinale di soggetti affetti da MC.

Il protocollo sperimentale ha previsto la coltura di biopsie intestinali, in solo terreno e in presenza di prolamine estratte da frumento, orzo, segale e avena, al fine di valutare la produzione anticorpale (risposta umorale) e l'espressione dei marcatori di attivazione tissutale (risposta cellulo-mediata) stimolati dal contatto con i vari antigeni. Per quanto concerne la risposta cellulo-mediata, l'espressione dei marcatori di attivazione tissutale è stata valutata con una tecnica di immunoistochimica, in pieno accordo con gli standard qualitativi riscontrati in letteratura (66,72,74,75,83,134). Al contrario, per quanto concerne la risposta umorale, i dati disponibili sono piuttosto confusi. Vale a dire che, se da un lato la determinazione degli EMA in coltura si è dimostrata utile in varie occasioni (42,135), dall'altro ha prodotto alcuni dati conflittuali, dovuti soprattutto alla soggettività della lettura in immunofluorescenza indiretta (136,137). Nell'ottica di migliorare le prestazioni della coltura d'organo, lo scopo intermedio di questo studio è stato verificare la presenza degli anticorpi anti-tTG, misurati con l'oggettività di un metodo quantitativo, nei sovrinatanti di coltura delle biopsie intestinali.

4. MATERIALI E METODI

4.1 Pazienti esaminati

Ventuno pazienti celiaci alla diagnosi (6M/15F, età media 29.2, range 18-63 anni) con positività sierologica agli EMA/anti-tTG e 21 pazienti celiaci in remissione (9M/12F, età media 32.5, range 19-66 anni) con negatività sierologica agli EMA/anti-tTG, sono stati valutati in questo studio. Inoltre, 15 pazienti con malattie gastroenterologiche diverse dalla MC (6M/9F, 8 con reflusso gastro-esofageo, 2 con ulcera e 5 con infezione da *Helicobacter pilori*, età media 30.1, range 20-62 anni) sono stati valutati come gruppo di controllo.

4.2 Campioni biotici intestinali

Ogni paziente valutato in questo studio è stato sottoposto ad esofagogastroduodenoscopia allo scopo di prelevare campioni biotici multipli a livello della seconda porzione duodenale (peso minimo richiesto: 5 mg/campione). In dettaglio, a seconda dei pazienti e del disegno dello studio, il numero dei campioni è stato:

- **Pazienti celiaci alla diagnosi** → in tutti i casi: 3 campioni biotici, 1 per l'analisi istologica e 2 per la coltura d'organo.
- **Pazienti celiaci in remissione** → in 9 casi: 3 campioni biotici, 1 per l'analisi istologica e 2 per la coltura d'organo; in 2 casi: 4 campioni biotici, 1 per l'analisi istologica, 2 per la coltura d'organo e 1 per la cinetica di produzione anticorpale; in 10 casi: 6 campioni biotici, 1 per l'analisi istologica e 5 per la coltura d'organo.
- **Pazienti di controllo** → in tutti i casi: 3 campioni biotici, 1 per l'analisi istologica e 2 per la coltura d'organo.

Tutte le procedure eseguite in questo studio sono risultate in accordo con gli standard etici stabiliti dal comitato istituzionale responsabile della sperimentazione umana.

4.3 Esame morfometrico

Per ogni paziente, un frammento biotico è stato fissato in formaldeide al 10%, quindi incluso in paraffina e, successivamente, tagliato in sezioni dello spessore di 3-5 µm. In seguito, le sezioni sono state colorate con ematossilina-eosina e sottoposte ad esame morfometrico al fine di valutare la presenza di cellule infiammatorie infiltranti la lamina propria, lo stato morfologico dei villi e quello delle cripte di Lieberkhün. Tutte le lesioni del III grado della classificazione di Marsh sono state considerate indicative di MC (122,123).

4.4 Estrazione, analisi, purificazione e digestione enzimatica delle prolamine

Le prolamine sono state estratte in soluzioni alcoliche secondo il metodo sequenziale di Osborne. Come descritto precedentemente, l'analisi delle frazioni proteiche è stata eseguita tramite elettroforesi monodimensionale A-PAGE, SDS-PAGE, IEF e cromatografia size-exclusion HPLC (127,131,138,139), mentre la purificazione è stata eseguita tramite HPLC e free-flow IEF (140). I digesti peptico-triptici (PT) di gliadina, avenina, ordeina e secalina sono stati ottenuti per digestione enzimatica sequenziale di frazioni prolamينية estratte, rispettivamente, da varietà pure di frumento (San Pastore), avena (Astra), orzo (Arma) e segale (500 2G) (130,141).

4.5 Preparazione dei terreni di coltura

Il terreno utilizzato per la coltura d'organo è stato preparato come segue (preparazione per 20 ml di terreno):

- | | |
|---|----------|
| • Trowell T8 medium | 13 mL |
| • NCTC 135 medium | 4 mL |
| • Siero di vitello fetale | 3 mL |
| • Penicillina 10000 UI/mL-Streptomicina 10000 µg/mL | 2 mL |
| • l-glutamina 200 mM | 0.2 ml |
| • Gentamicina | 10 mg/mL |

Il terreno è stato portato a pH 7.4, sterilizzato a mezzo di filtri sterili monouso a Ø 0.22 µm e utilizzato sia in questa forma che addizionato del PT di gliadina, avenina, ordeina e secalina (in tutti i casi, a una concentrazione di 1 mg/mL).

4.6 Coltura d'organo

I frammenti bioptici sono stati lavati in soluzione fisiologica (NaCl 9‰), orientati con la superficie villare in alto e quella sierosa in basso e, infine, stesi su di un supporto costituito da una retina d'acciaio inox a trama fitta posizionata sopra il pozzetto centrale di una piastra di Petri per coltura d'organo. Il pozzetto centrale della piastra è stato riempito con 1 mL di solo medium o di medium addizionato del PT di gliadina, avenina, ordeina o secalina, in modo tale da bagnare il campione bioptico soltanto a livello della superficie sierosa. I frammenti bioptici così trattati sono stati incubati per 24 ore a 37°C in un ambiente costituito da una miscela di ossigeno (95%) e anidride carbonica (5%). Al termine della coltura, i frammenti bioptici sono stati inclusi in OCT compound e congelati ai vapori di azoto. Anche i sovranatanti sono stati raccolti e, insieme ai frammenti bioptici precedentemente congelati, sono stati conservati a -70°C fino all'uso (141). Tutte le fasi di cui sopra sono state eseguite sotto cappa a flusso laminare, in ambiente rigorosamente sterile.

In dettaglio, a seconda dei pazienti e del disegno dello studio, il protocollo è stato:

- **Pazienti celiaci alla diagnosi** → in tutti i casi: 1 campione biotico coltivato in solo medium, 1 in medium addizionato del PT di gliadina.
- **Pazienti celiaci in remissione** → in 9 casi: 1 campione biotico coltivato in solo medium, 1 in medium addizionato del PT di gliadina; in 2 casi: 1 campione biotico coltivato in solo medium, 1 in medium addizionato del PT di gliadina, 1 in medium addizionato del PT di gliadina con prelievi multipli di 100 µL ognuno e rimpiazzo di una pari quantità di terreno fresco a 1h, 2h, 4h, 6h e 24h; in 10 casi: 1 campione biotico coltivato in solo medium, 1 in medium addizionato del PT di gliadina, 1 in medium addizionato del PT di avenina, 1 in medium addizionato del PT di ordeina, 1 in medium addizionato del PT di secalina.
- **Pazienti di controllo** → in tutti i casi: 1 campione biotico coltivato in solo medium, 1 in medium addizionato del PT di gliadina.

Laddove non specificato la coltura è stata portata, senza interruzioni, a 24h.

4.7 Anticorpi anti-endomisio

Per la determinazione degli EMA è stato utilizzato un kit commerciale (Eurospital, Trieste, Italia) che sfrutta la tecnica di immunofluorescenza indiretta (IFA) su sezioni della terza porzione inferiore di esofago di scimmia.

In breve, i sovrinatanti di coltura indiluiti sono stati incubati in camera umida e a temperatura ambiente per 45 minuti. Dopo lavaggio in PBS, un anticorpo secondario anti-IgA umane coniugato con fluoresceina isotiocianato (FITC) è stato incubato per 30 minuti nelle stesse condizioni di cui sopra. Dopo un secondo lavaggio in PBS, i vetrini contenenti le sezioni sono stati chiusi con lastre coprioggetto tramite l'uso di un opportuno medium di montaggio. La lettura della prima sezione, in cui si dispone il controllo positivo, funziona da riferimento morfologico per il segnale di fluorescenza atteso. In presenza di questo segnale, è possibile sostenere l'occorrenza degli EMA mentre, in caso contrario, si è di fronte ad assenza anticorpale. La positività EMA si esprime con una fluorescenza di tipo reticolare disposta sulla muscolaris mucosae della sezione di esofago di scimmia, il cui colore verde brillante è dovuto all'utilizzo del fluorocromo FITC. Nel presente studio, i risultati sono stati espressi qualitativamente come positivo/negativo.

4.8 Anticorpi anti-transglutaminasi tessutale

Per il dosaggio degli anticorpi anti-tTG è stato utilizzato un kit commerciale (Eurospital, Trieste, Italia) che sfrutta la tecnica Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) su micropiastre seminate con tTG ricombinante umana.

In breve, i sovranatanti di coltura diluiti 1:5 sono stati incubati a temperatura ambiente per 1h. Dopo lavaggio in PBS, un anticorpo secondario anti-IgA umane coniugato con perossidasi di rafano è stato incubato per 1h nelle stesse condizioni di cui sopra. Dopo lavaggio in PBS, un'opportuna soluzione cromogena è stata incubata per 30 minuti nelle stesse condizioni di cui sopra, dopodiché la reazione è stata bloccata con H_2SO_4 0,5 M. L'assorbanza (A) è stata misurata tramite un lettore per piastre ELISA munito di filtri in grado di leggere a 450 nm (lettura standard) e a 620 nm (lettura di riferimento). La lettura del primo pozzetto, in cui è stato dosato il controllo positivo, ha funzionato da riferimento numerico indicativo della buona riuscita del test. I risultati sono stati espressi quantitativamente come valori $A_{450\text{nm}}$.

4.9 Immunoistochimica

Innanzitutto, i campioni biotici sono stati portati alla temperatura della camera criostatica (-20°C), dopodiché si è proceduto al taglio. Le sezioni criostatiche, dello spessore di 4-5 μm , sono state lasciate a temperatura ambiente per 24 h e, quindi, fissate in acetone freddo per 10 minuti. Dopo ulteriori 45 minuti a temperatura ambiente, si è proceduto al blocco delle aspecificità tramite incubazione con albumina sierica bovina (BSA 3%) per 30 minuti. Dopo lavaggio in TBS, gli anticorpi primari [anticorpi monoclonali anti-CD25 (recettore per l'interleuchina-2 o IL-2R) o anti-ICAM-1 (Intercellular Adhesion molecole-1) - (DAKO, Denmark)] diluiti 1:50, sono stati incubati in camera umida per 1 h. Dopo lavaggio in TBS, gli anticorpi secondari (coniugati con fosfatasi per il CD25 e con biotina per l'ICAM-1) sono stati incubati in camera umida per 30 minuti. Dopo lavaggio in TBS, il reagente di visualizzazione [Alcalin Fosfatasi/Anti-Alcalin Fosfatasi (APAAP) per il CD25 e il complesso streptavidina/perossidasi per l'ICAM-1] è stato incubato in camera umida per 30 minuti. Dopo lavaggio in TBS, il cromogeno [naftolo AS-MX fosfato più Fast red per il CD25 e 3,3-diaminobenzidina tetraidrocloruro (DAB) per l'ICAM-1] è stato incubato per pochi minuti, quindi la reazione è stata arrestata con acqua di fonte. Tutte le incubazioni sono state eseguite a temperatura ambiente. Le sezioni così trattate sono state controcolorate con ematossilina, dopodiché i vetrini sono stati chiusi con lastrine coprioggetto tramite l'uso di un opportuno medium di montaggio. Il numero totale delle cellule esprimenti i marcatori immunologici di interesse è stato valutato in un'area di 1mm^2 di lamina propria. La conta è stata eseguita al microscopio ottico con l'ausilio di una griglia calibrata allineata parallelamente alla sezione.

4.10 Analisi statistica

Le differenze tra le concentrazioni anticorpali e tra i numeri delle cellule esprimenti i marcatori di attivazione tessutale misurati nei vari gruppi sono state determinate con il test di Mann-Whitney

mentre, le differenze tra le colture eseguite con e senza i PT delle varie prolamine all'interno dello stesso gruppo, sono state valutate con il test di Wilcoxon. Valori di $p \leq 0,05$ sono stati considerati significativi.

Per l'analisi statistica sono stati utilizzati dei test non parametrici perché i valori delle concentrazioni anticorpali e i numeri delle cellule esprimenti i marcatori di attivazione tessutale misurati nei vari gruppi non rientravano in una distribuzione normale di tipo gaussiana. Per lo stesso motivo, anziché in forma di media e deviazioni standard, i dati sono stati descritti utilizzando i concetti di mediana e quartili.

5. RISULTATI

All'esame morfometrico, tutti i pazienti celiaci alla diagnosi hanno mostrato evidenza di atrofia villare (7 con grado IIIa, 10 con grado IIIb e 4 con grado IIIc della classificazione di Marsh), mentre i pazienti celiaci in remissione, così come i controlli, non hanno mostrato segni istologici indicativi di MC.

La presenza di EMA (Figura 5.1) è stata riscontrata nei sovrinatanti di tutti i pazienti celiaci alla diagnosi, indipendentemente dalle condizioni di coltura (con o senza il PT di gliadina). Per quanto concerne i pazienti celiaci in remissione, la presenza di EMA è stata verificata nel 71.4% dei sovrinatanti di campioni biotici coltivati con il PT di gliadina (15/21 casi esaminati), mentre questi anticorpi non sono mai stati verificati nei sovrinatanti di campioni biotici coltivati con il solo terreno. La presenza di EMA non è mai stata riscontrata nei sovrinatanti dei controlli, indipendentemente dalle condizioni di coltura (Tabella 5.1).

Figura 5.1 - Pattern EMA (400x)

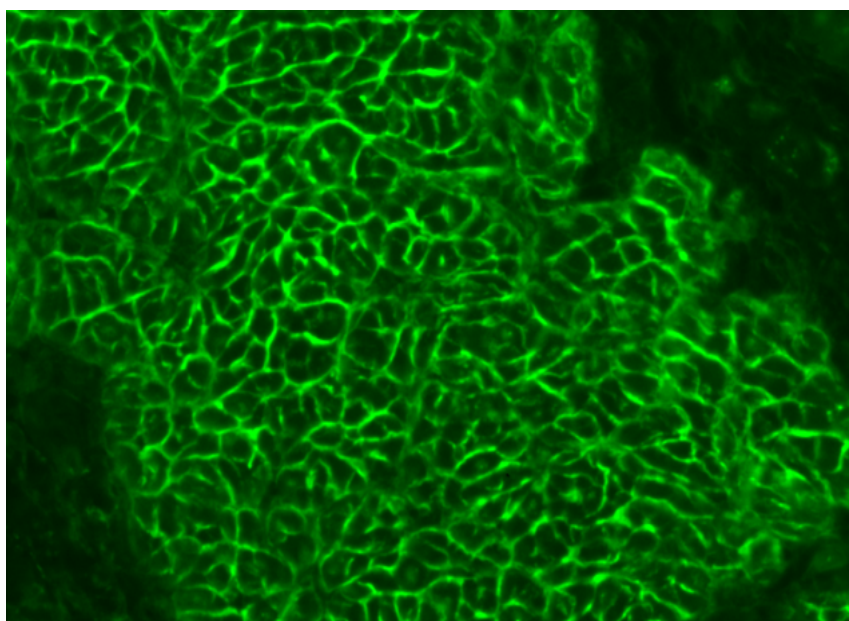


Tabella 5.1 - EMA positivi in relazione alle prolamine del frumento

	Solo terreno	Terreno + PT-gliadina
Pts celiaci a diagnosi (n=21)	21/21	21/21
Pts celiaci in remissione (n=21)	0/21	15/21
Pts di controllo (n=15)	0/15	0/15

Le concentrazioni degli anticorpi anti-tTG misurate nei sovrinatanti dei pazienti celiaci alla diagnosi sono risultate significativamente più alte rispetto a quelle determinate nei sovrinatanti dei pazienti celiaci in remissione e dei controlli, indipendentemente dalle condizioni di coltura. Concentrazioni degli anticorpi anti-tTG significativamente più alte nelle colture eseguite con il PT di gliadina rispetto a quelle eseguite con il solo terreno, sono state riscontrate solo nei pazienti celiaci in remissione (Figura 5.2).

Figura 5.2 - Anticorpi anti-tTG in relazione alle prolamine del frumento

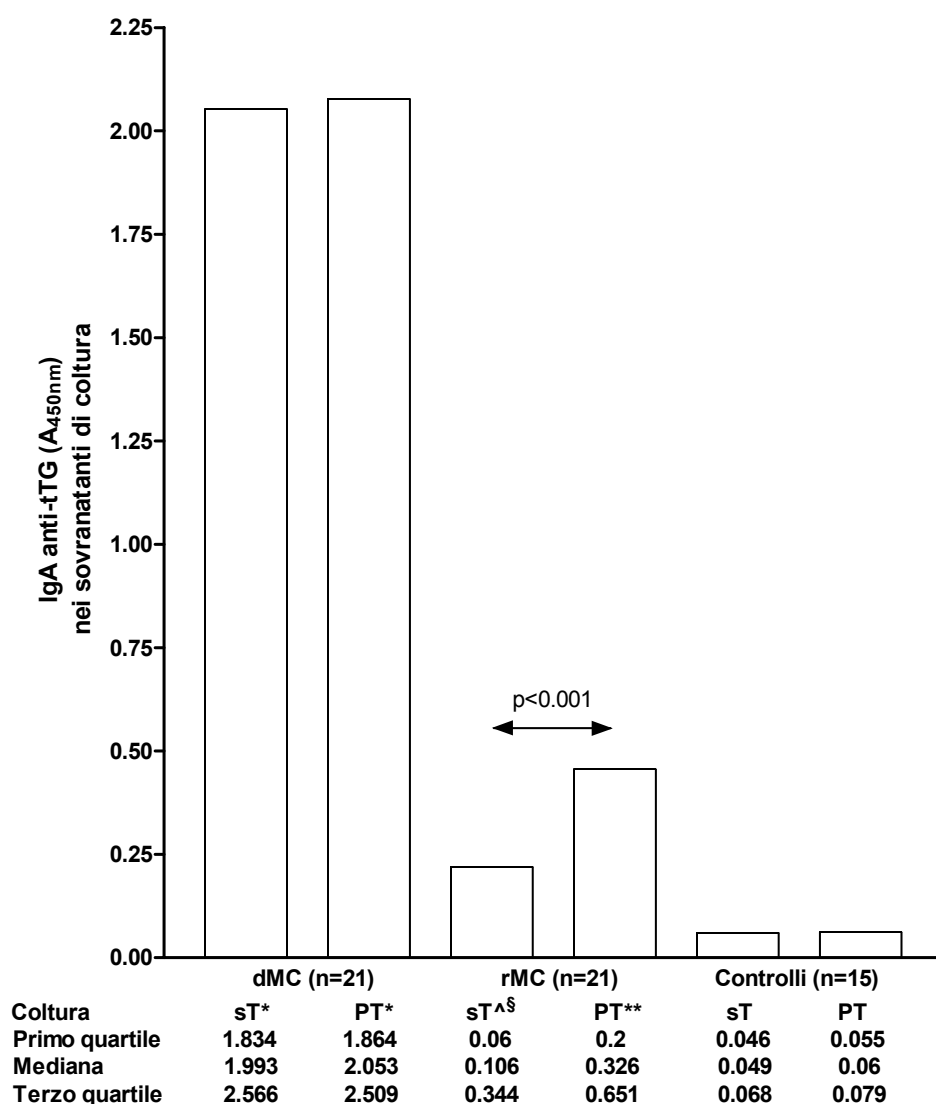
Concentrazioni degli anti-tTG (A_{450nm}) nei sovrinatanti di biopsie ottenute da pazienti celiaci a diagnosi (dMC), da pazienti celiaci in remissione (rMC) e da controlli, coltivate in solo terreno (sT) e in terreno + PT di gliadina (PT). Il numero dei pazienti, i punti quartile e la mediana dei valori degli anti-tTG, sono riportati. Il valore di p riportato nel grafico è riferito al test di Wilcoxon tra le concentrazioni degli anti-tTG misurate nelle colture eseguite con e senza PT di gliadina. I risultati del test di Mann-Whitney tra i valori degli anti-tTG misurati nei gruppi in studio, sono:

* $p < 0.001$ vs rMC e controlli (sia sT che PT)

^ $p = 0.009$ vs controlli (sT)

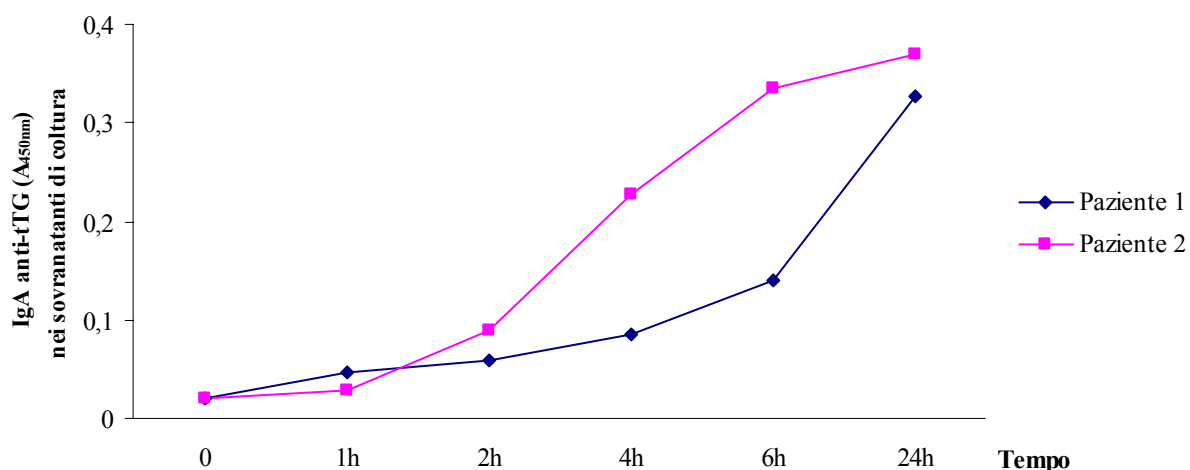
§ $p = 0.015$ vs controlli (PT)

** $p < 0.001$ vs controlli (sia sT che PT)



Nei sovrinatanti dei campioni biotici di due pazienti celiaci in remissione verificati in più tempi di esposizione al PT di gliadina, dopo un'ora di challenge gli anticorpi anti-transglutaminasi sono aumentati di 1,4-2,3 volte, dopo due ore di 2,9-4,5 volte, dopo quattro ore di 4,25-11,35 volte, dopo sei ore di 7,05-16,75 volte e, infine, dopo ventiquattro ore di esposizione al PT di gliadina, questi anticorpi sono cresciuti di ben 16,3-18,5 volte (Figura 5.3).

Figura 5.3 - Cinetica della produzione in vitro degli anticorpi anti-tTG



Le concentrazioni degli anticorpi anti-tTG misurate nei sovrinatanti dei campioni biotici di pazienti celiaci in remissione coltivati con il PT di gliadina, avenina, ordeina e secalina sono risultate significativamente più alte rispetto a quelle determinate nei sovrinatanti dei campioni biotici di pazienti celiaci in remissione e dei controlli coltivati in solo terreno (Figura 5.4).

Nei pazienti celiaci in remissione, il valore medio del numero di cellule/mm² di lamina propria che esprimono il CD25 e l'ICAM-1 (Figure 5.5 e 5.6) è risultato significativamente più alto nelle colture eseguite in presenza del PT di gliadina, ordeina e secalina rispetto a quelle eseguite in solo terreno e in terreno addizionato del PT di avenina ($p < 0,001$). Inoltre, il valore medio del numero di cellule/mm² di lamina propria che esprimono il CD25 e l'ICAM-1 riscontrato nei soggetti appartenenti alla popolazione di controllo è risultato paragonabile a quello rilevato nelle biopsie dei pazienti celiaci in remissione coltivate in solo terreno e in terreno addizionato del PT di avenina (Figura 5.7).

Figura 5.4 - Anticorpi anti-tTG in relazione alle prolamine dei vari cereali

Concentrazioni degli anti-tTG (A_{450nm}) nei sovrantanti di biopsie ottenute da pazienti celiaci in remissione (rMC) e da controlli (C), coltivate in solo terreno (sT), in terreno + PT di gliadina (PTG), in terreno + PT di avenina (PTA), in terreno + PT di ordeina (PTO) e in terreno + PT di secalina (PTS). Il numero dei pazienti, i punti quartile e la mediana dei valori degli anti-tTG, sono riportati. I risultati dei test di Mann-Whitney e Wilcoxon tra i valori degli anti-tTG misurati nei trattamenti e nei gruppi in studio, sono:

* $p < 0.05$ vs controlli (sT)

§ $p < 0.05$ vs rMC (sT)

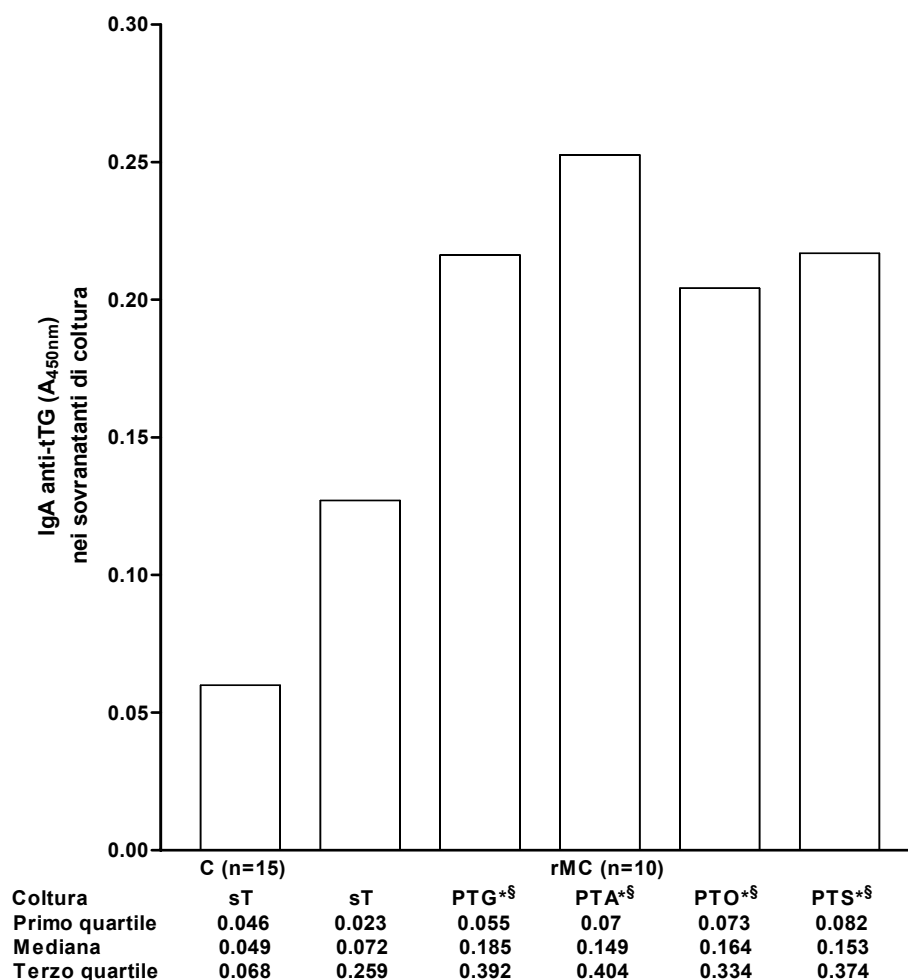


Figura 5.5 - Incrementata espressione del CD25 (a sinistra)

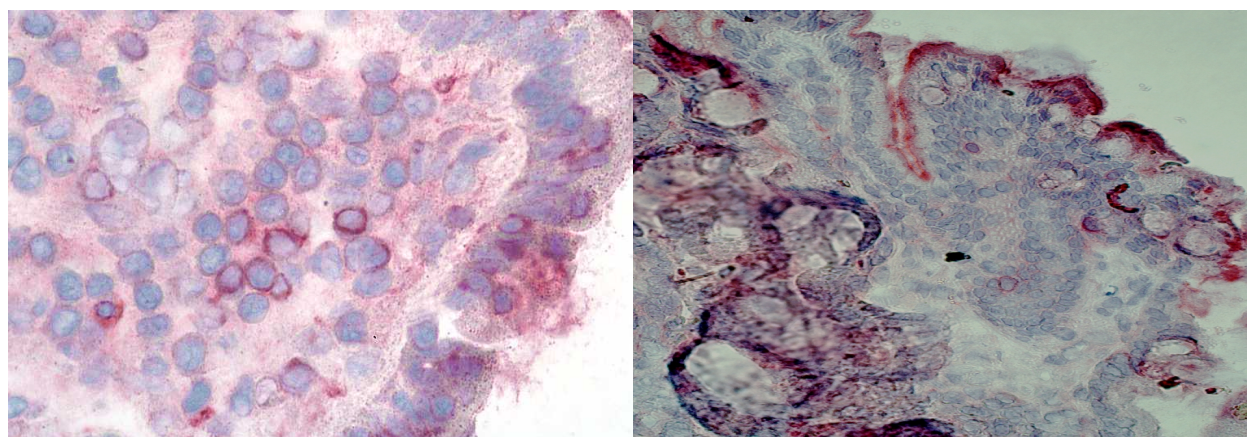


Figura 5.6 - Incrementata espressione dell'ICAM-1 (a sinistra)

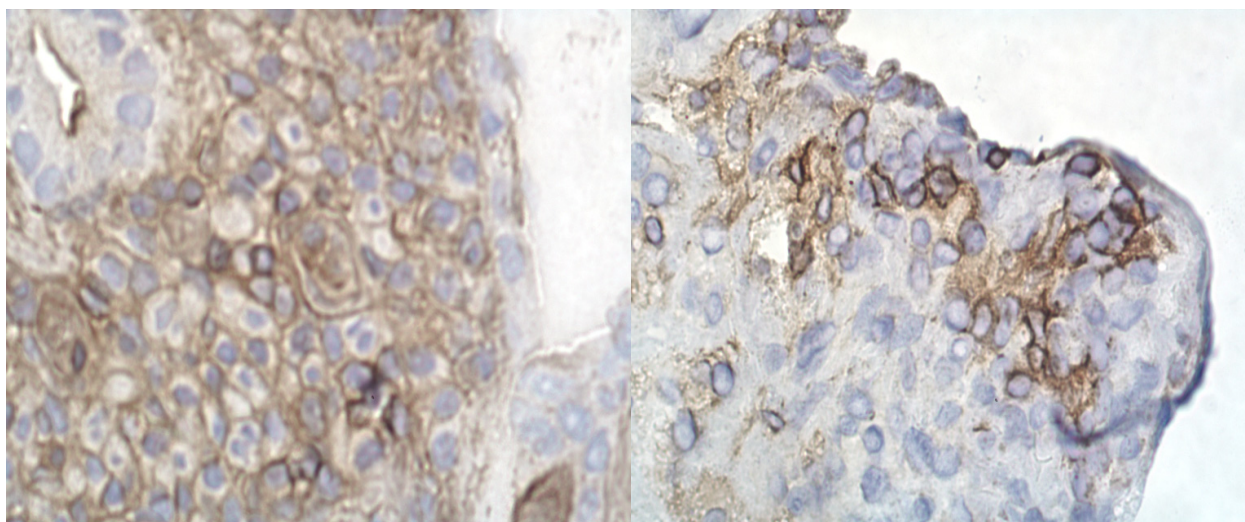
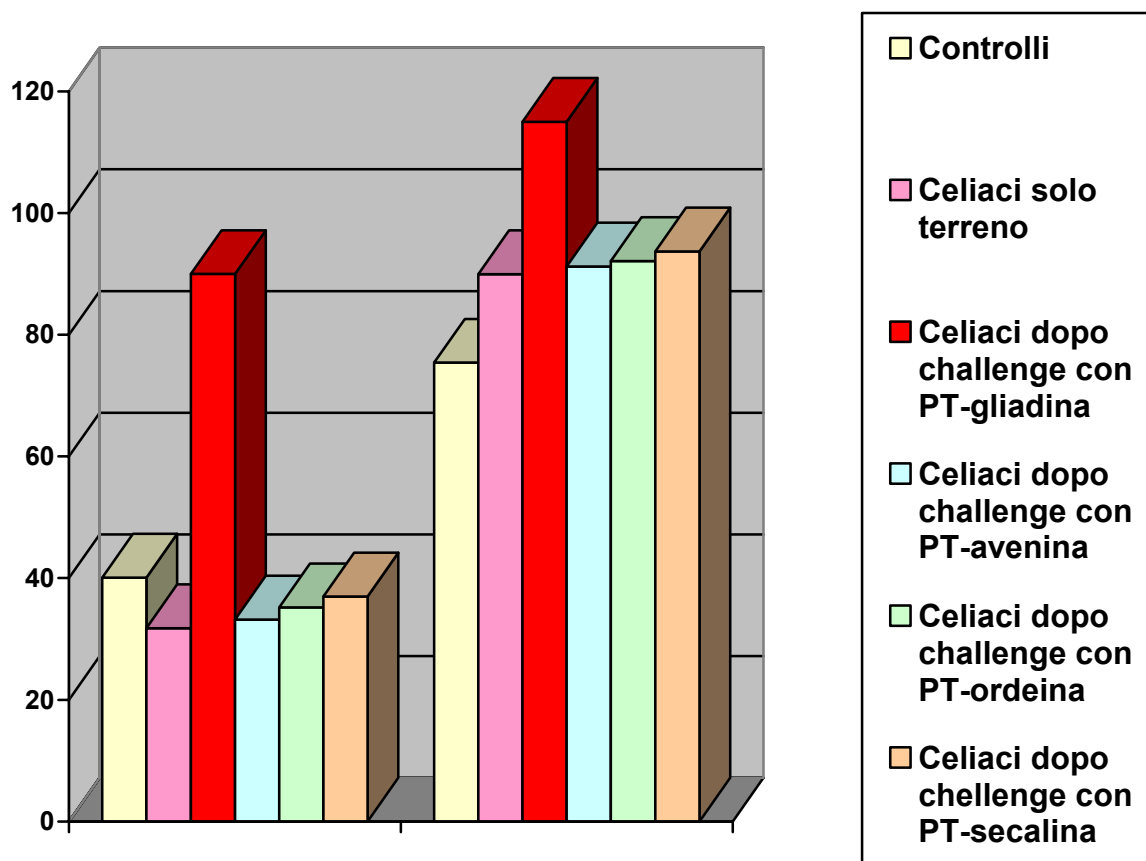


Figura 5.7 - Numero di cellule/mm² di lamina propria che esprimono CD25 (a sinistra) e ICAM-1 (a destra)



* $p < 0,001$ vs celiaci dopo challenge con PT-avenina, celiaci solo terreno e controlli solo terreno

6. DISCUSSIONE

La diagnosi di MC è basata sull'evidenza istologica di atrofia villare, quadro che recede dopo trattamento con una dieta priva di glutine. La presenza di EMA e/o anti-tTG circolanti e la loro scomparsa dopo dieta, supporta la diagnosi (1). D'altra parte, è stato dimostrato che gli EMA possono essere rilevati nei sovrantanti di coltura di biopsie intestinali di pazienti celiaci non trattati, così come in quelli di pazienti celiaci trattati dopo esposizione "in vitro" a uno stimolo antigenico specifico (142). Questo sistema è stato recentemente proposto nella procedura diagnostica della MC (124,125) anche se alcuni dati conflittuali, dovuti soprattutto alla soggettività della lettura degli EMA in immunofluorescenza indiretta, hanno limitato la sua diffusione (136,137). Rimarcabile è anche la scadenza rapida di emissione della fluorescenza da parte dell'anticorpo secondario adeso alle sezioni che, spesso, non consente a più operatori di osservare la stessa zona morfologica con adeguata accuratezza. Lo stesso discorso vale per le applicazioni nel campo della ricerca dove, a tutt'oggi, questo sistema "stenta a decollare".

I risultati intermedi ottenuti nel presente studio dimostrano chiaramente che l'impiego degli anticorpi anti-tTG nella coltura d'organo è in grado di incrementare la sensibilità e, soprattutto, l'obiettività, l'affidabilità e la riproducibilità di un metodo che, date le enormi potenzialità diagnostiche e sperimentali, è stato troppo a lungo e ingiustamente sottovalutato. Queste caratteristiche sono conferite dalla natura quantitativa del metodo di dosaggio degli anticorpi anti-tTG che, fra l'altro, non solo ha permesso di discriminare le varie popolazioni in studio in un ampio range numerico (Figura 5.2), ma ha confermato la bontà del metodo della coltura d'organo nell'individuare e caratterizzare la risposta umorale a seguito dell'esposizione, in vitro, di frammenti intestinali ottenuti da pazienti celiaci in remissione a vari stimoli antigenici (142). In questo senso, rimarcabile è anche il risultato ottenuto nella cinetica di produzione anticorpale (Figura 5.3), che ha assicurato agli anti-tTG un ottimo livello di specificità nel dimostrare l'induzione della risposta umorale da parte dell'antigene primario della MC, laddove questo fattore ritrova, in vitro come in vivo, la sede del bersaglio patogenetico (41). D'altra parte i risultati ottenuti con gli EMA (Tabella 5.1), se pur altrettanto buoni, evidenziano una lieve inflessione di sensibilità che ben si associa con la natura "labile" degli esiti normalmente forniti dall'immunofluorescenza indiretta.

E' per questi motivi che, nella seconda fase dello studio, il dosaggio degli anticorpi anti-tTG nei sovrantanti di biopsie esposte alle prolamine di vari cereali è stato scelto quale marcatore elettivo di induzione della risposta umorale. Per quanto concerne la risposta cellulo-mediata, ci si è basati sull'espressione dei marcatori di attivazione tessutale CD25 e ICAM-1.

I risultati ottenuti in questa fase dello studio confermano, innanzitutto, il ruolo delle prolamine del frumento quali antigeni scatenanti i processi patogenetici della MC (41). Rimarcabile è invece l'evidenza che l'ordeina e la secalina mostrano gli stessi effetti attivatori della gliadina, sia in termini di risposta umorale che cellulo-mediata (Figure 5.4 e 5.7). Anche se questa risposta non è poi così sorprendente, sembra confermare la tesi che tutti i membri del gruppo tassonomico delle Ordacee o Triticacee siano tossici per i soggetti affetti da MC (44), direzionando ulteriori messaggi di allerta verso l'eventuale inclusione di cereali come il farro, il kamut e il tritcale nella GFD.

Di natura ben diversa, invece, sono i risultati che riguardano l'avena. Infatti, se da un lato l'esposizione di frammenti bioptici alle prolamine di questo cereale sembrano non indurre una risposta di tipo cellulo-mediata (Figura 5.7), dall'altro sono proprio le biopsie esposte a questa condizione sperimentale a mostrare una più intensa induzione della risposta umorale, con un'estensione dei valori anticorpali osservati maggiore anche a quella stimolata dalla gliadina del frumento (Figura 5.4). Questi dati evidenziano, per l'avena, una palese dissociazione tra la risposta umorale e quella cellulo-mediata, mentre meno chiare si presentano le motivazioni che possono condurre, se pur in vitro, a una condizione del genere.

D'altra parte, nonostante da qualche anno gli eventuali effetti tossici di questo cereale siano oggetto approfondito di studio (42,43,128,129), a tutt'oggi non si è ancora giunti a una conclusione definitiva. Sembra comunque che la presenza nell'intestino dei celiaci di cellule T rispondenti all'avenina, sia di tipo gliadina-ristrette in grado di cross-reagire con altre prolamine che di tipo avenina-ristrette, depongano per un ruolo tossico (129). Un'osservazione diversa che però, apparentemente, sembra essere in accordo con il presente studio, vede le prolamine dell'avena incapaci di stimolare la produzione di citochine a profilo Th1 da parte della mucosa intestinale di soggetti affetti da MC (43). L'assenza di citochine a profilo Th1 da un lato e la presenza di un'abnorme risposta umorale dall'altro, portano a pensare che la mucosa intestinale reagisca all'avenina con un pathway diverso da quello che caratterizza le tipiche risposte "da glutine". In questo senso, una risposta polarizzata verso un profilo citochinico Th2 potrebbe spiegare l'assenza di sintomi e/o lesioni intestinali spesso osservate in celiaci sottoposti a challenge in vivo con avena (41). D'altra parte in un modello murino di sclerosi multipla, designata come encefalomielite autoimmune sperimentale, si è visto che polarizzando la tipica risposta Th1 verso un profilo Th2, attraverso un complesso meccanismo immunitario coinvolgente i tipi cellulari Th3 e Tr1 e le citochine IL-10 e TGF- β , si ottiene un effetto allergico-simile di natura protettiva (143). Nonostante la loro natura intrigante, resta comunque il fatto che tali ipotesi andrebbero confermate con nuove evidenze sperimentali, suggerendo ulteriormente, per l'avena, uno dei ruoli più complicati nel grande puzzle della malattia celiaca.

Bibliografia

1. Fasano A, Catassi C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology* 2001;120:636-51.
2. Gee S. On the celiac affection. *St Bartholomew Hosp Rep* 1888;24:17-20.
3. Dicke WK, Weijers HA, Van De Kanmer JH. Celiac disease II: the presence in wheat of a factor having deleterious effects in cases of celiac disease. *Acta Pediatr* 1953;42:34-42.
4. Accomando S, Cataldo F. The global village of celiac disease. *Dig Liv Dis* 2004;36:492-8.
5. Ciclitira PJ. AGA technical review on celiac sprue. *Gastroenterology* 2001;120:1526-40.
6. Davidson LSP, Fountain JR. Incidence of sprue syndrome with some observations on the natural history. *BMJ* 1950;1:1157-61.
7. Mylotte M, Egan-Mitchell B, McCarthy CF, McNicholl B. Incidence of celiac disease in the West of Ireland. *BMJ* 1973;1:703-5.
8. Van Stirum J, Baerlocker K, Fanconi A, Gugler E, Shmerling DH. The incidence of celiac disease in children in Switzerland. *Helv Pediatr Acta* 1982;37:421-30.
9. Logan RFA, Rifking EA, Busuttil A, Gilmours HM, Ferguson A. Prevalence and incidence of celiac disease in Edinburgh and the Lothian region of Scotland. *Gastroenterology* 1986;90:334-42.
10. Rossi TM, Albini CH, Kumar V. Incidence of celiac disease identified by the presence of serum antiendomysial antibodies in children with chronic diarrhoea, short stature or insulin dependent diabetes mellitus. *J Ped* 1993;123:262-4.
11. Talley NJ, Valdovinos M, Petterson TM, Carpenter HA, Melton L Jr. Epidemiology of celiac sprue: a community-based study. *Am J Gastroenterol* 1994;89:843-6.
12. Tommasini A, Not T, Kiren V, Baldas V, Santon D, Trevisiol C, Berti I, Neri E, Gerarduzzi T, Bruno I, Lenhardt A, Zamuner E, Spano A, Crovella S, Martellosi S, Torre G, Sblattero D, Marzari R, Bradbury A, Tamburlini G, Ventura A. Mass screening for celiac disease using antihuman transglutaminase antibody assay. *Arch Dis Child* 2004;89:512-5.
13. Vancikova Z, Chlumecky V, Sokol D, Horakova D, Hamsikova E, Fucikova T, Janatkova I, Ulcova-Gallova Z, Stepan J, Limanova Z, Dvorak M, Kocna P, Sanchez D, Tuckova L, Tlaskalova-Hogenova H. The serologic screening for celiac disease in the general population (blood donors) and in some high-risk groups of adults (patients with autoimmune diseases, osteoporosis and infertility) in the Czech republic. *Folia Microbiol (Praha)* 2002;47:753-8.

14. Fasano A, Berti I, Gerarduzzi T, Not T, Colletti RB, Drago S. Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. *Arch Intern Med* 2003;163:286-92.
15. Tatar G, Elsurer R, Simsek H, Balaban YH, Hascelik G, Ozcebe OI, Buyukasik Y, Sokmensuer C. Screening of tissue transglutaminase antibody in healthy blood donors for celiac disease screening in the Turkish population. *Dig Dis Sci* 2004;49:1479-84.
16. Gursoy S, Guven K, Simsek T, Yurci A, Torun E, Koc N, Patiroglu TE, Ozbakir O, Yucesoy M. The prevalence of unrecognized adult celiac disease in central Anatolia. *J Clin Gastroenterol* 2005;39:508-11.
17. Farrell RJ, Kelly CP. Diagnosis of celiac sprue. *Am J Gastroenterol* 2001;96:3237-46.
18. Catassi C, Ratsch IM, Gandolfi L, Pratesi R, Fabiani E, El Asmar R, Frijia M, Bearzi I, Vizzoni L. Why is celiac disease endemic in the people of the Sahara? *Lancet* 1999;354:647-8.
19. Catassi C, Doloretta Macis M, Ratsch IM, De Virgiliis S, Cucca F. The distribution of DQ genes in the Saharawi population provides only a partial explanation for the high celiac disease prevalence. *Tissue Antigens* 2001;58:402-6.
20. Logan RFA. Problems and pitfalls in epidemiological studies of celiac disease. *Din Nutr Res* 1992;2:14-24.
21. Sollid LM. Celiac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nature Rev Immunol* 2002;2:647-55.
22. Ellis A. Celiac disease: previous family studies. In: McConnell RB, editor. *The genetics of celiac disease*. Lancaster: MTP Press, Copenhagen, 1981, pp. 197-9.
23. Sollid LM, Thorsby E. HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. *Gastroenterology* 1993;105:910-22.
24. Risch N. Assessing the role of HLA-linked and unlinked determinants of disease. *Am J Hum Genet* 1987;40:1-14.
25. 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 celiac disease. *Ann Hum Genet* 1997;61:307-17.
26. Bevan S, Popat S, Braegger CP, Busch A, O'Donoghue D, Falth-Magnusson K, Ferguson A, Godkin A, Hogberg L, Holmes G, Hosie KB, Howdle PD, Jenkins H, Jewell D, Johnston S, Kennedy NP, Kerr G, Kumar P, Logan RF, Love AH, Marsh M, Mulder CJ, Sjoberg K, Stenhammer L, Walker-Smith J, Marossy AM, Houlston RS. Contribution of the MHC region to the familial risk of celiac disease. *J Med Genet* 1999;36:687-90.

27. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Immunologia cellulare e molecolare. IV ed. Piccin, Padova, 2002.
28. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Genetica in medicina. I ed. Idelson-Gnocchi, Napoli, 2005.
29. Kagnoff MF. Celiac disease: genetic, immunological and environmental factors in disease pathogenesis. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1985;114:45-54.
30. Mearin ML, Mulder CJJ. HLA-DR, -DP and -DQ antigens in celiac disease. In: *Celiac Disease*. Kluwer Academy Publisher, Boston, 1991, pp. 27-34.
31. 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;61:513-7.
32. Robins G, Howdle PD. Advances in celiac disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2005;21:152-61.
33. Sollid LM. Molecular basis of celiac disease. *Annu Rev Immunol* 2000;18:53-81.
34. 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;14:329-33.
35. 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 celiac disease genes. *Hum Mol Genet* 1997;6:1335-9.
36. 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 celiac disease. *Am J Hum Genet* 1998;62:669-75.
37. Djilali-Saiah I, Schmitz J, Harfouch-Hammoud E, Mougenot JF, Bach JF, Caillat-Zucman S. CTLA-4 gene polymorphism is associated with predisposition to celiac disease. *Gut* 1998;43:187-9.
38. Naluai AT, Nilsson S, Samuelsson L, Gudjonsdottir AH, Ascher, Ek J, Hallberg B, Kristiansson B, Martinsson T, Nerman O, Sollid LM, Wahlström J. The CTLA-4/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;56:350-5.

39. Clot F, Fulchignoni-Lataud MC, Renoux C, Percopo S, Bouguerra F, Babron MC, Djiali-Saiah I, Caillat-Zucman S, Clerget-Darpoux F, Greco L, Serre JL. Linkage and association study of the CTLA-4 region in celiac disease for Italian and Tunisian populations. *Tissue Antigens* 1999;54:527-30.
40. Mora B, Bonamico M, Indovina P, Megiorni F, Ferri M, Carbone MC, Cipolletta E, Mazzilli MC. CTLA-4 +49 A/G dimorphism in Italian patients with celiac disease. *Hum Immunol* 2003;64:297-301.
41. Ciccocioppo R, Di Sabatino A, Corazza GR. The immune recognition of gluten in celiac disease. *Clin Exp Immunol* 2005;140:408-16.
42. Picarelli A, Di Tola M, Sabbatella L, Gabrielli F, Di Cello T, Anania MC, Mastracchio A, Silano M, De Vincenzi V. Immunological evidence of no harmful effect of oats in celiac disease. *Am J Clin Nutr* 2001;74:137-40.
43. Kilmartin C, Lynch S, Abuzabouk M, Wieser H, Feighery C. Avenin fails to induce a Th1 response in celiac tissue following in vitro culture. *Gut* 2003;52:47-52.
44. Kasarda DD. Grains in relation to celiac disease. *Cereal Foods World* 2001;46:209-10.
45. Ceruti A. *Il nuovo Pokorny*. IV ed. Loescher, Torino, 1986.
46. 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.
47. Sturgess RP, Ellis HJ, Ciclitira PJ. Cereal chemistry, molecular biology, and toxicity in celiac disease. *Gut* 1991;32:1055-60.
48. 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;171:430-6.
49. Wieser H, Springer G, Belitz HD, Ashkenazi A, Idar D. Toxicity of different wheat gliadins in celiac disease. *Z Lebensm Unter Forsch* 1982;175:321-6.
50. Wieser H, Seilmeier W, Eggert M, Belitz HD. Tryptophan content of cereal proteins. *Z Lebensm Unters Forsch* 1983;177:457-60.
51. Schuppan D. Current concepts of celiac disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2000;119:234-42.
52. Jones RW, Taylor NW, Senti FR. Electrophoresis and fractionation of wheat gluten. *Arch Biochem Biophys* 1959;84:363-76.
53. Shewry PR, Tatham AS, Forde J. The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: a reassessment. *J Cer Sci* 1986;4:97-106.

54. Wieser H, Môdl A, Seilmeir W, Belitz HD. High performance liquid chromatography of gliadins from different wheat varieties. Amino acid composition and N-terminal amino acid sequence of components. *Z Lebensm Unter Forsch* 1987;185:371-8.
55. Wieser H. The precipitating factor in celiac disease. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1995;9:191-207.
56. Molberg Ø, Solheim Flæte N, Jensen T, Lundin KEA, Arentz-Hansen H, Anderson OD, Kjersti Uhlen A, Sollid LM. Intestinal T-cell responses to high-molecular-weight glutenins in celiac disease. *Gastroenterology* 2003;125:337-44.
57. Cavalli-Sforza LL, Menozzi P, Piazza A. *Storia e geografia dei geni umani*. I ed. Adelphi, Milano, 2000.
58. Cordain L. Cereal grains: humanity's double-edged sword. *World Rev Nutr Diet* 1999;84:19-73.
59. Kerneis S, Chauviere G, Darfeuille Michaud A, Aubel D, Coconnier MH, Joly B, Servin AL. Expression of receptors for enterotoxigenic *Escherichia coli* during enterocytic differentiation of human polarized intestinal epithelial cells in culture. *Infect Immun* 1992;60:2572-80.
60. Balboni GC, Bastianini A, Brizzi E, Castorina S, Comparini L, Donato RF, Filogamo G, Fusaroli P, Giordano Lanza G, Grossi CE, Manzoli FA, Marinozzi G, Miani A, Mitolo V, Motta P, Nesci E, Orlandini GE, Passaponti A, Pizzini G, Reale E, Renda T, Ridola C, Ruggeri A, Santoro A, Tedde G, Zaccheo D. *Anatomia umana*. Vol. 2. III ed. Edi-Ernes, Milano, 1993.
61. Eckert R, Randall D. *Fisiologia animale*. II ed. Zanichelli, Bologna, 1994.
62. Ferguson A, Murray D. Quantitation of intraepithelial lymphocytes in human jejunum. *Gut* 1971;12:988-94.
63. Stallmach A, Strober W, MacDonald TT, Lochs H, Zeitz M. Induction and modulation of gastrointestinal inflammation. *Immunol Today* 1998;19:438-41.
64. Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Le basi patologiche delle malattie*. Vol 2. VI ed. Piccin, Padova, 2000.
65. Andersen KJ, Schjøsby H, Skagen DW. Jejunal mucosal enzymes in untreated and treated celiac disease. *Scand J Gastroenterol* 1983;18:251-6.
66. 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;111:608-16.

67. Zimmer KP, Naim H, Weber P, Ellis HJ, Ciclitira PJ. Targeting of gliadin peptides, CD8, alpha/beta-TCR and gamma/delta-TCR to golgi complexes and vacuoles within celiac disease enterocytes. *FASEB J* 1998;12:1349-57.
68. 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;43:435-41.
69. 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;79:1489-99.
70. Clemente MG, De Virgiliis S, Kang JS, Macatagney R, Musu MP, Di Pierro MR, Drago S, Congia M, Fasano A. Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. *Gut* 2003;52:218-23.
71. 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 celiac disease. *Lancet* 2000;355:1518-9.
72. Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V, Auricchio S, Picard J, Osman M, Quarantino S, Londei M. Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in celiac disease. *Lancet* 2003;362:30-7.
73. Schuppan D, Esslinger B, Dieterich W. Innate immunity and celiac disease. *Lancet* 2003;362:3-4.
74. Maiuri L, Ciacci C, Auricchio S, Brown V, Quarantino S, Londei M. Interleukin 15 mediates epithelial changes in celiac disease. *Gastroenterology* 2000; 119:996-1006.
75. Maiuri L, Ciacci C, Vacca L, Ricciarelli I, Auricchio S, Quarantino S, Londei M. IL-15 drives the specific migration of CD94+ and TCR- $\gamma\delta$ + intraepithelial lymphocytes in organ cultures of treated celiac patients. *Am J Gastroenterol* 2001;96:150-6.
76. Koning F. Celiac disease: caught between a rock and a hard plase. *Gastroenterology* 2005;129:1294-301.
77. Kim C-H, Quarsten H, Bergseng E, Khosla C, Sollid LM. Structural basis for HLA-DQ2-mediated presentation of gluten epitopes in celiac disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:4175-9.
78. Sárdy M, Kárpáti S, Merkl B, Paulsson M, Smyth N. Epidermal transglutaminase (Tgase 3) is the autoantigen of dermatitis Herpetiformis. *J Exp Med* 2002;195:747-57.

79. Sugai E, Chernavsky A, Pedreira S, Smecuol E, Vazquez H, Niveloni S, Mazure R, Mauriño E, Rabinovich GA, Bai JC. Bone-specific antibodies in sera from patients with celiac disease: characterization and implications in osteoporosis. *J Clin Immunol* 2002;22:353-62.
80. 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.
81. 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;47:520-6.
82. Natter S, Granditsch G, Reichel GL, Baghestanian M, Valent P, Elfman L, Grönlund 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;31:918-28.
83. 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;115:564-72.
84. Arranz E, Ferguson A. Intestinal antibody pattern of celiac disease: occurrence in patients with normal jejunum biopsy histology. *Gastroenterology* 1993;104:1263-72.
85. Duggan JM. Celiac disease: the great imitator. *MJA* 2004;180:524-6.
86. Ventura A, Magazzu G, Greco L. Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. SIGEP Study Group for Autoimmune Disorders in Celiac Disease. *Gastroenterology* 1999;117:297-303.
87. Pierucci A, Fofi C, Bartoli B, Simonetti BM, Pecci G, Sabbatella L, Di Tola M, Greco R, Anania MC, Picarelli A. Antiendomysial antibodies in Berger's disease. *Am J Kidney Dis* 2002;39:1176-82.
88. Picarelli A, Sabbatella L, Di Tola M, Vetrano S, Casale C, Anania MC, Porowska B, Vergari M, Schiaffini R, Gargiulo P. Anti-endomysial antibody of IgG1 isotype detection strongly increases the prevalence of celiac disease in patients affected by type I diabetes mellitus. *Clin Exp Immunol* 2005;142:111-5.
89. Elliott RB, Martin JM. Dietary protein: a trigger of insulin-dependent diabetes in the BB rat? *Diabetologia* 1984;26:297-9.
90. Amin R, Murphy N, Edge J, Ahmed ML, Acerini CL, Dunger DB. A longitudinal study of the effects of a gluten-free diet on glycemic control and weight gain in subjects with type 1 diabetes and celiac disease. *Diabetes Care* 2002;25:1117-22.
91. Collin P, Salmi J, Hallstrom O, Reunala T, Pasternack A. Autoimmune thyroid disorders and celiac disease. *Eur J Endocrinol* 1994;130:137-40.

92. Kowalska E, Wasowska-Krolikowska K, Toporowska-Kowalska E. Estimation of antithyroid antibodies occurrence in children with celiac disease. *Med Sci Monit* 2000;6:719-21.
93. Sategna-Guidetti C, Volta U, Ciacci C, Usai P, Carlino A, De Franceschi L, Camera A, Pelli A, Brossa C. Prevalence of thyroid disorders in untreated adult celiac disease patients and effect of gluten withdrawal: an Italian multicenter study. *Am J Gastroenterol* 2001;96:751-7.
94. Hadjivassiliou M, Grunewald R, Sharrack B, Sanders D, Lobo A, Williamson C, Woodroffe N, Wood N, Davies-Jones A. Gluten ataxia in perspective: epidemiology, genetic susceptibility and clinical characteristics. *Brain* 2003;126:685-91.
95. Chinnery PF, Reading PJ, Milne D, Gardner-Medwin D, Turnbull DM. CSF antigliadin antibodies and the Ramsay Hunt syndrome. *Neurology* 1997;49:1131-3.
96. Mukamel M, Rosenbach Y, Zahavi I, Mimouni M, Dinari G. Celiac disease associated with systemic lupus erythematosus. *Isr J Med Sci* 1994;30:656-8.
97. Kallikorm R, Uibo O, Uibo R. Celiac disease in spondyloarthropathy: usefulness of serological screening. *Clin Rheumatol* 2000;19:118-22.
98. Scott BB, Losowsky MS. Celiac disease: a cause of various associated diseases? *Lancet* 1975;2:956-7.
99. Klemola T, Savilahti E, Koskimies S, Pelkonen P. HLA antigens in IgA deficient paediatric patients. *Tissue Antigens* 1988;32:218-23.
100. Caforio AL, Martinetti M, Schwarz G, Bonifacio E, Gavazzi A, Graziano G, Lorini R, Cuccia M, McKenna WJ, Bottazzo GF. Idiopathic dilated cardiomyopathy: lack of association between circulating organ-specific cardiac antibodies and HLA-DR antigens. *Tissue Antigens* 1992;39:236-40.
101. Clerici N, Fernandez M, Saiz I, Sainz T, Polanco I. Human leukocyte antigen alleles and haplotypes associated with selective immunoglobulin A deficiency in Spanish pediatric patients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993;16:381-6.
102. Czaja AJ, Santrach PJ, Moore SB. HLA-DQ associations in type 1 autoimmune hepatitis. *Mayo Clin Proc* 1995;70:1154-60.
103. Bao F, Yu L, Babu S, Wang T, Hoffenberg EJ, Rewers M, Eisenbarth GS. One third of HLA DQ2 homozygous patients with type 1 diabetes express celiac disease-associated transglutaminase autoantibodies. *J Autoimmun* 1999;13:143-8.
104. Yu L, Brewer KW, Gates S, Wu A, Wang T, Babu SR, Gottlieb PA, Freed BM, Noble J, Erlich HA, Rewers MJ, Eisenbarth GS. DRB1*04 and DQ alleles: expression of 21-hydroxylase autoantibodies and risk of progression to Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:328-35.

105. Rood MJ, van Krugten MV, Zanelli E, van der Linden MW, Keijsers V, Schreuder GM, Verduyn W, Westendorp RG, de Vries RR, Breedveld FC, Verweij CL, Huizinga TW. TNF-308A and HLA-DR3 alleles contribute independently to susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2000;43:129-34.
106. Larizza D, Calcaterra V, De Giacomo C, De Silvestri A, Asti M, Badulli C, Autelli M, Coslovich E, Martinetti M. Celiac disease in children with autoimmune thyroid disease. *J Pediatr* 2001;139:738-40.
107. Nakken B, Jonsson R, Brokstad KA, Omholt K, Nerland AH, Haga HJ, Halse AK. Associations of MHC class II alleles in Norwegian primary Sjogren's syndrome patients: implications for development of autoantibodies to the Ro52 autoantigen. *Scand J Immunol* 2001;54:428-33.
108. Said-Nahal R, Miceli-Richard C, Gautreau C, Tamouza R, Borot N, Porcher R, Charron D, Dougados M, Breban M. The role of HLA genes in familial spondyloarthropathy: a comprehensive study of 70 multiplex families. *Ann Rheum Dis* 2002;61:201-6.
109. Walker-Smith JA, Guandalini S, Schmitz J, Shmerling DH, Visakorpi JK. Revised criteria for diagnosis of celiac disease. *Arch Dis Child* 1990;65:909-11.
110. Karpati S, Stolz W, Meurer M, Krieg T, Braun-Falco O. Extracellular binding sites of IgA antijejunal antibodies on normal small bowel detected by indirect immunoelectronmicroscopy. *J Invest Dermatol* 1991;96:228-33.
111. Lock J, Gilmour JEM, Unsworth DJ. Anti-tissue transglutaminase, anti-endomysium and anti-R1-reticulin autoantibodies, the antibody trinity of celiac disease. *Clin Exp Immunol* 1999;116:258-62.
112. Volta U, Molinaro M, De Franceschi L, Fratangelo D, Bianchi FB. IgA antiendomysial antibodies on human umbilical cord tissue for celiac disease screening. Save both money and monkeys. *Dig Dis Sci* 1995;40:1902-5.
113. 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;33:1633-7.
114. Valdimarsson T, Frazen L, Grodzinsky E, Skogh T, Strom M. Is small bowel biopsy necessary in adults with suspected celiac disease and IgA antiendomysial antibodies? *Dig Dis Sci* 1996;41:83-7.
115. Picarelli A, Di Tola M, Sabbatella L, Mastracchio A, Trecca A, Gabrielli F, Di Cello T, Anania MC, Torsoli A. Identification of a new celiac disease subgroup: antiendomysial and anti-transglutaminase antibodies of IgG class in the absence of selective IgA deficiency. *J Intern Med* 2001;249:181-8.

116. 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;115:1317-21.
117. 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;115:1222-8.
118. Wong RC, Wilson RJ, Steele RH, Radford-Smith G, Adelstein S. A comparison of 13 guinea pig and human anti-tissue transglutaminase antibody ELISA kits. *J Clin Pathol* 2002;55:488-94.
119. Peracchi M, Trovato C, Longhi M, Gasparin M, Conte D, Tarantino C. Tissue transglutaminase antibodies in patients with end-stage heart failure. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2850-4.
120. Di Tola M, Sabbatella L, Anania MC, Viscido A, Caprilli R, Pica R, Paoluzi P, Picarelli A. Anti-tissue transglutaminase antibodies in inflammatory bowel disease: new evidence. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:1092-7.
121. Picarelli A, Triglionone P, Mariani P, Di Giovambattista F, Greco M, Gurnari M, Paoluzzi P, Bonamico M, Ballati G. Use of threshold serum level of anti-gliadin antibodies improves diagnostic efficiency of the test in adult celiac disease but is unreliable as a screening test. *Ital J Gastroenterol* 1996;28:70-5.
122. Marsh MN, Crowe PT. Morphology of the mucosal lesion in gluten sensitivity. *Ballieres Clin Gastroenterol* 1995;9:273-93.
123. Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H. The histopathology of celiac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;11:1185-94.
124. Carroccio A, Iacono G, D'Amico D, Cavataio F, Teresi S, Caruso C, Di PL, Colombo A, D'Arpa F, Florena A, Notarbartolo A, Montalto G. Production of anti-endomysial antibodies in cultured duodenal mucosa: usefulness in celiac disease diagnosis. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:32-8.
125. Picarelli A, Di Tola M, Sabbatella L, Anania MC, Calabrò A, Renzi D, Bai JC, Sugai E, Carroccio A, Di Prima L, Bardella MT, Barisani D, Ribes-koninckx C, Donat Aliaga E, Gasparin M, Bravi E, and the multicenter organ culture system study group. Usefulness of the organ culture system in the in vitro diagnosis of celiac disease: a multicenter study. *Scand J Gastroenterol* 2006, in press.
126. Payne PI. Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on breadmaking quality. *Annu Rev Plant Physiol* 1987;38:141-53.

127. Pogna NE, Autran JC, Mellini F, Lafiandra D, Feillet P. Chromosome 1B-encoded gliadins and glutenin subunits in durum wheat: genetics and relationship to gluten strength. *J Cer Sci* 1990;11:15-34.
128. 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 celiac rectal mucosa. *J Pediatr Gastr Nutr* 1997;24:3.
129. Arentz-Hansen H, Fleckenstein B, Molberg O, Scott H, Koning F, Jung G, Roepstorff P, Lundin KE, Sollid LM. The molecular basis for oat intolerance in patients with celiac disease. *PLoS Med* 2004;1:84-92.
130. Auricchio S, De Ritis G, De Vincenzi M, Occorsio P, Silano V. Effects of gliadin-derived peptides from bread and durum wheats on small intestine cultures from rat fetus and celiac children. *Pediatr Res* 1982;16:1004-10.
131. De Vincenzi M, Luchetti R, Giovannini C, Pogna NE, Saponaro C, Galterio G, Gasbarrini G. In vitro toxicity testing of alcohol-soluble proteins from diploid wheat *Triticum monococcum* in celiac disease. *J Biochem Toxicol* 1996;11:314-8.
132. Giovannini C, Lucchetti R, De Vincenzi M. The activities of peptides "31-43", "44-55" and "56-58" of A-gliadin on in vitro cultures of CaCo-2 cells. *ATLA* 1997;25:437-43.
133. De Vincenzi M, Stamatii AL, Lucchetti R, Silano M, Gasbarrini G, Silano V. Structural specificities and significance for celiac disease of wheat gliadin peptides able to agglutinate or to prevent agglutination of K562(S) cells. *Toxicology* 1998;127:97-106.
134. Maiuri L, Troncone R, Mayer M, Coletta S, Picarelli A, De Vincenzi M, Pavone V, Auricchio S. In vitro activities of A-gliadin-related synthetic peptides: damaging effect on the atrophic celiac mucosa and activation of mucosal immune response in the treated celiac mucosa. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31:247-53.
135. 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;34:1099-102.
136. 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.
137. Biagi F, Parnell DJ, Ellis HJ, Ciclitira PJ. Endomysial antibody production is not related to histological damage after in vitro gluten challenge. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000;12:57-60.

138. De Vincenzi M, Dessì 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 celiac disease as determined by their agglutinating activity. *ATLA* 1996;24:39-48.
139. De Vincenzi M, Luchetti R, Dal Belin Peruffo A, Curioni A, Pogna NE, Gasbarrini G. In vitro assessment of acetic-acid-soluble proteins (glutenin) toxicity in celiac disease. *J Biochem Toxicol* 1996;11:205-10.
140. Curioni A, Dal Belin Peruffo A, Pogna NE. Electroendosmotic preparative electrophoresis as one-step method for purification of high-molecular-weight subunits of wheat glutenin. *Cer Chem* 1989;66:133-5.
141. De Ritis G, Occorsio P, Auricchio S, Gramenzi F, Morisi G, Silano V. Toxicity of wheat flour proteins and protein-derived peptides for in vitro developing intestine from rat fetus. *Pediatr Res* 1979;13:1255-1261.
142. 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 celiac disease. *Lancet* 1996;348:1065-7.
143. O'Garra A, Steinman L, Gijbels K. CD4+ T-cell subsets in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 1997;9:872-83.

Indice

1. La malattia celiaca: una collisione evolutiva tra uomo e ambiente	2
1.1 Dati epidemiologici	2
1.2 Fattori genetici	5
1.2.1 <i>Il sistema HLA</i>	6
1.2.2 <i>I geni HLA associati alla MC</i>	8
1.2.3 <i>I geni non-HLA associati alla MC</i>	9
1.2.4 <i>Le regioni geniche associate alla MC: classificazione internazionale</i>	11
1.3 Fattori ambientali	11
1.3.1 <i>I cereali e altre specie da cui si ricavano farine: tassonomia, cenni storici e maggiori impieghi alimentari</i>	11
1.3.2 <i>Le proteine tossiche e/o immunogeniche</i>	14
1.4 Teorie evoluzionistiche	20
1.4.1 <i>Il primo incontro dell'uomo con il glutine</i>	20
1.4.2 <i>La mezzaluna fertile, l'evoluzione e la diffusione del grano</i>	21
1.4.3 <i>L'origine e l'evoluzione della MC</i>	25
1.4.4 <i>La teoria dell'HLA vincente: una visione attuale</i>	26
1.5 La mucosa dell'intestino tenue	27
1.5.1 <i>Componenti cellulari del sistema immunitario associato alla mucosa intestinale</i>	29
1.5.2 <i>Alterazioni mucosali tipiche di MC</i>	29
1.6 Patogenesi	31
1.6.1 <i>Ingresso dei peptidi del glutine nella lamina propria e permeabilità intestinale</i>	31
1.6.2 <i>Risposta innata</i>	32
1.6.3 <i>Risposta adattativa</i>	34
1.6.4 <i>Ruolo della transglutaminasi tissutale</i>	34
1.6.5 <i>Legame dei peptidi immunodominanti con le molecole HLA di classe II</i>	35
1.6.6 <i>Risposta cellulo-mediata e rimodellamento mucosale</i>	36
1.6.7 <i>Risposta umorale</i>	37
1.6.8 <i>Autoimmunità secondaria</i>	38
1.6.9 <i>Immunomodulazione</i>	40
1.7 Manifestazioni cliniche e patologie associate	40
1.7.1 <i>Celiachia tipica</i>	41
1.7.2 <i>Celiachia atipica</i>	41

<i>1.7.3 Celiachia silente</i>	42
<i>1.7.4 Patologie associate</i>	43
1.8 Protocollo diagnostico	45
<i>1.8.1 Anticorpi anti-endomisio</i>	46
<i>1.8.2 Anticorpi anti-transglutaminasi tessutale</i>	46
<i>1.8.3 Anticorpi anti-gliadina</i>	46
<i>1.8.4 Esame istologico</i>	46
<i>1.8.5 Esame colturale</i>	47
1.9 Trattamento e management del paziente celiaco	47
2. I cereali: implicazioni nella malattia celiaca e possibili approcci di studio	49
2.1 Cereali tossici	49
2.2 Cereali a ridotta tossicità	49
2.3 Quesiti scientifici	50
2.4 Un nuovo metodo di studio: la coltura d'organo	50
3. Scopo dello studio	52
4. Materiali e metodi	53
4.1 Pazienti esaminati	53
4.2 Campioni bioptici intestinali	53
4.3 Esame morfometrico	53
4.4 Estrazione, analisi, purificazione e digestione enzimatica delle prolamine	54
4.5 Preparazione dei terreni di coltura	54
4.6 Coltura d'organo	54
4.7 Anticorpi anti-endomisio	55
4.8 Anticorpi anti-transglutaminasi tessutale	55
4.9 Immunoistochimica	56
4.10 Analisi statistica	56
5. Risultati	58
6. Discussione	63
7. Bibliografia	65
Indice	