

5^o WORKSHOP FC e 7^o CONVEGNO NAZIONALE AIC

La biopsia intestinale nella diagnosi e nel follow-up della malattia celiaca

8 e 9 Novembre 2018 Roma

ATTI CONGRESSUALI

INDICE

PREFAZIONE. M. Silano	p. 5
7° CONVEGNO NAZIONALE AIC, 9 Novembre 2018: LA BIOPSIA INTESTINALE NELLA DIAGNOSI E NEL FOLLOW-UP DELLA MALATTIA CELIACA - Moderatore: M. Silano	
Programma Scientifico	p. 8
L'istologia: problemi di interpretazione – F. Biagi	p. 10
Celiachia senza biopsia – C. Ciacci	p. 11
Mancato Mucosal healing in corso di dieta senza glutine: quando preoccuparsi A. Carroccio	p. 12
Problemi di istologia in pediatria – R. Troncone	p. 13
Atrofia dei villi: sempre celiachia? – G. R. Corazza	p. 14
SESSIONE POSTER 9 Novembre 2018	da p. 15 a p. 31
5° WORKSHOP RICERCA FC 8 Novembre 2018 – Moderatori: G.R. Corazza, M. Silano, R. Troncone	
Grant FC: Progress and Final Scientific Reports	
Programma Scientifico	p. 34
Final Report Investigator Grant triennale FC 013/2014 – A. Carroccio	p. 35
Final Report Investigator Grant triennale FC 017/2014 – M. Caproni	p. 36
Final Report Investigator Grant biennale FC 016/2015 – R. Ciccocioppo	p. 38
Progress Report Fellowship Grant triennale FC 003/2016 – M.C. Rossi	p. 40
Progress Report Fellowship Grant triennale FC 004/2016 – G. Bologna	p. 42
Progress Report Fellowship Grant triennale FC 005/2016 – M. Porpora	p. 43
Progress Report Fellowship Grant triennale FC 007/2016 – F. Ricci	p. 45
Progress Report Fellowship Grant triennale FC 009/2016 – S. Vitale	p. 47

Prefazione

La biopsia intestinale nella diagnosi e nel follow-up della malattia celiaca

*Marco Silano – Coordinatore Board del Comitato Scientifico AIC
Direttore Unità Operativa Alimentazione, Nutrizione e Salute, Dipartimento Sanità Pubblica Veterinaria
e Sicurezza Alimentare – Istituto Superiore di Sanità – Roma*

Il consueto appuntamento annuale con il Convegno Nazionale organizzato dall'Associazione Italiana Celiachia è giunto alla 7° edizione, anche quest'anno accompagnato dalla 5° edizione del Workshop sulla ricerca finanziata da Fondazione Celiachia.

Questa edizione del convegno è dedicata all'approfondimento sulla biopsia intestinale per la diagnosi e il follow-up della celiachia. Gli Esperti, individuati dal Comitato Scientifico come relatori, affronteranno le diverse problematiche legate a questo accertamento, tuttora considerato il *golden standard* per la diagnosi di celiachia: quando va eseguito, quando è possibile evitarlo e soprattutto come interpretare i casi dubbi, quali la celiachia senza atrofia mucosale o la mancata risoluzione dell'atrofia nei soggetti che riferiscono un'ottima compliance alla dieta senza glutine.

In un periodo in cui false ed errate informazioni scientifiche vengono veicolate dai social media senza nessun filtro e verifica preliminare, i Convegni scientifici si stanno affermando ulteriormente, se mai ce ne fosse stata la necessità, come un momento di diffusione di informazioni scientifiche valide, basate su evidenze sperimentali consolidate e condivise. In particolare, il Convegno nazionale AIC, ormai un riferimento annuale per tutti coloro che si occupano di celiachia in Italia, riveste un'importanza significativa per l'aggiornamento e la formazione dei Medici della rete medica di AIC, al fine di aumentare il numero di diagnosi esatte di celiachia in Italia. A maggior ragione, se si considera che la celiachia e il suo agente eziologico ambientale, il glutine, sono oggetto frequente di *fake news*, quali i supposti benefici per le persone non celiache dell'eliminazione del glutine dalla dieta o l'auto-diagnosi di celiachia.

PROGRAMMA SCIENTIFICO

09.30 - 10.30

Registrazione dei partecipanti

10.30 - 10.45

Introduzione ai lavori

Giuseppe Di Fabio, Presidente AIC

10.45 - 11.00

Saluti Autorità

11.00 - 13.30 SESSIONE I

11.00 - 11.25

L'istologia: problemi di interpretazione

Federico Biagi

11.25 - 12.00

Celiachia senza biopsia

Carolina Ciacci - Renata Auricchio

12.00 - 12.25

Mancato Mucosal healing in corso di dieta senza glutine: quando preoccuparsi

Antonio Carroccio

12.25 - 12.50

Problemi di istologia in pediatria

Riccardo Troncone

12.50 - 13.15

Atrofia dei villi: sempre celiachia?

Gino Roberto Corazza

13.15 - 13.30

Discussione

13.30 - 15.00

Lunch e Sessione Poster

15.00 - 17.00 SESSIONE II

CASI CLINICI*: Presentazione di 5 Casi Clinici selezionati dal Comitato Scientifico del Convegno

Gino Roberto Corazza

17.00 - 17.30

Chiusura lavori e Questionario di valutazione dell'apprendimento

* Relazione con sessione di domande in televoto e successiva discussione

7° CONVEGNO NAZIONALE AIC
9 Novembre 2018

La biopsia intestinale

nella diagnosi e nel follow-up della malattia celiaca

Moderatore: Marco Silano – Coordinatore Board del Comitato Scientifico AIC; Reparto Alimentazione, Nutrizione e Salute, Dipartimento Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare – Istituto Superiore di Sanità – Roma

L'istologia: problemi di interpretazione

F. Biagi – Centro per lo Studio della Malattia Celiaca, Clinica Medica 1, Policlinico San Matteo – Università di Pavia

Nonostante la scarsa riproducibilità intra ed inter-osservatore della classificazione di Marsh-Oberhuber sia già stata dimostrata da tempo [1], sono ormai quasi 20 anni che tale classificazione del danno della mucosa duodenale viene routinariamente impiegata nella diagnosi istologica di malattia celiaca [2]. L'utilità clinica di tale classificazione, basata su ben 7 gradi di danno, è stata inoltre aspramente criticata dallo stesso Mike Marsh che, di recente, ha manifestato il suo disappunto per la reinterpretazione clinica dei risultati di un suo lavoro che non aveva finalità cliniche [3,4]. Tale studio era infatti rivolto esclusivamente all'analisi dinamica delle modificazioni morfologiche indotte dal glutine sulla mucosa intestinale di pazienti con malattia celiaca [3].

Negli ultimi 15 anni, prima di inviarle ai patologi, abbiamo sempre analizzato le biopsie duodenali con il microscopio a dissezione (MD). È questa una metodica sicuramente grossolana ma che, qualora evidenziasse franca atrofia dei villi, permette di instaurare la dieta aglutinata il giorno stesso della biopsia, con ovvio guadagno di tempo. Pur essendo perfettamente consapevoli dei limiti della MD, abbiamo sempre avuto l'impressione che la concordanza tra MD e istologia tradizionale (IT) fosse abbastanza buona. Questo sarebbe una forte evidenza che una classificazione dettagliata del diverso grado di atrofia dei villi non sarebbe necessaria nella diagnosi di malattia celiaca e altre enteropatie atrofiche. Recentemente abbiamo studiato quanto i risultati di queste due metodiche fossero paragonabili [5]. In particolare, abbiamo analizzato retrospettivamente i dati clinico-istopatologici di tutti i pazienti sottoposti a biopsia duodenale presso il nostro centro all'Università di Pavia tra il settembre 1999 e il giugno 2015. I risultati della valutazione della mucosa duodenale, sia in MD sia in IT, sono stati raccolti e confrontati mediante statistica Kappa.

Nel periodo studiato, 1537 pazienti sono stati sottoposti a 2075 biopsie. La statistica Kappa ha mostrato un accordo sostanziale tra le due metodiche (0,78). La sensibilità della MD per il rilevamento di una grave atrofia dei villi è stata dell'85% (95% IC, 81.2%-88.5%) e la specificità del 95% (95% IC, 93.8%-96%). L'aver dimostrato che nella pratica clinica di tutti i giorni la diagnosi di malattia celiaca può basarsi, nella stragrande maggioranza dei casi, su una metodica grossolana come la MD, suggerisce che una classificazione del diverso grado di atrofia dei villi, basata su 7 diversi livelli, non è necessaria per la diagnosi di malattia celiaca.

Una classificazione del grado di atrofia della mucosa duodenale potrebbe avere invece una sua utilità qualora fosse necessario procedere a un confronto prima e dopo l'instaurazione della dieta aglutinata, per valutare cioè il grado di miglioramento istologico ottenuto con

tale dieta. In questo caso è però sicuramente da preferire la classificazione di Corazza-Villanacci che, basandosi su solo 3 gradi di danno, si è dimostrata essere molto più attendibile e riproducibile di quanto non sia la classificazione di Marsh-Oberhuber [1].

Referenze

1. Corazza GR, Villanacci V, Zambelli C, et al. Comparison of the interobserver reproducibility with different histologic criteria used in celiac disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007;5:838-43
2. 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
3. Marsh MN. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology* 1992;102:330-54
4. Marsh MN, Johnson MW, Rostami K. Mucosal histopathology in celiac disease: a rebuttal of Oberhuber's sub-division of Marsh III. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2015;8:99-109
5. Biagi F, Vattiato C, Burrone M, Schieppati A, Agazzi S, Maiorano G, Luinetti O, Alvisi C, Klersy C, Corazza GR. Is a detailed grading of villous atrophy necessary for the diagnosis of enteropathy? *J Clin Pathol* 2016;69:1051-4

Celiachia senza biopsia

C. Ciacci – Università di Salerno

Background La celiachia si presenta in modo molto variabile a tutte le età [1]. Si sospetta la celiachia per i sintomi, i segni clinici o la familiarità. Abbiamo a disposizione anticorpi con una sensibilità e specificità che poche altre indagini hanno [2]. Quindi, una positività della sierologia specifica della celiachia rende la diagnosi finale di malattia celiaca molto probabile. Tuttavia, poiché in passato, in assenza di tali anticorpi, la diagnosi si fondava essenzialmente sulla sintomatologia gastrointestinale, malassorbitiva e sull'esito dell'esame istologico della biopsia duodenale, ancora oggi negli adulti si ritiene indispensabile procedere con essa anche quando ci sono pochi dubbi.

Relazione In realtà, tutti gli esperti sono preoccupati della possibilità di non eseguire la biopsia. I motivi sono diversi. Il primo è che nell'adulto può rendersi necessario escludere un'altra diagnosi, ad esempio un tumore primitivo del digerente superiore o secondario all'esposizione prolungata al glutine in persona già sensibile [3, 4]. Un altro motivo è che si potrebbe decidere di fare diagnosi in un potenziale celiaco, cioè una persona che abbia gli anticorpi positivi ma ancora presenti una mucosa normale. Il terzo motivo è che ci si preoccupa delle false positività o delle minime positività che potrebbero non avere affatto un significato clinico, in questi casi la biopsia è fortemente necessaria per dirimere ogni dubbio.

Conclusioni e Prospettive Bisogna considerare che l'endoscopia è procedura invasiva, un ostacolo per molte persone. Sappiamo di pazienti che non la vogliono eseguire e che per questo rinunciano alla diagnosi definitiva e ai suoi vantaggi economici. Sappiamo che nella quasi totalità dei casi la mucosa apparirà affetta da lesioni tipiche della celiachia, sappiamo che i tumori sono rari e in più raramente visibili alla prima biopsia perché non

necessariamente localizzati nel tratto raggiungibile da un gastroscopio. Sappiamo infine che i pediatri hanno adottato nuove linee guida che in molti casi evitano l'endoscopia (età pediatrica, alto titolo di anticorpi specifici e sintomi) [5].

In questi mesi è partito uno studio internazionale che ha lo scopo di evidenziare se esista un sottogruppo di pazienti che possa in sicurezza non sottoporsi alla gastroscopia e biopsia e avere una diagnosi certa di celiachia. Un esempio? Una ragazza ventenne, anemica, con sintomi intestinali, con un fratello celiaco e anticorpi antitransglutaminasi IgA presenti, ripetuti, e ad alto titolo. Se avesse avuto 14 anni molto verosimilmente non avrebbe dovuto praticare l'endoscopia per avere la diagnosi ma ne ha 20. La nostra paziente ha lo stesso identico rischio di patologie più complesse, ma per ora dovrà sottoporsi alla endoscopia e biopsia. Quindi stessi rischi, stesse probabilità ma una differente gestione.

Referenze

1. Bai, J.C. and C. Ciacci, *World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: Celiac Disease February 2017*. *J Clin Gastroenterol*, 2017. 51(9): p. 755-768.
2. Hill, P.G., et al., *IgA antibodies to human tissue transglutaminase: audit of routine practice confirms high diagnostic accuracy*. *Scand J Gastroenterol*, 2004. 39(11): p. 1078-82.
3. Biagi, F. and G.R. Corazza, *Mortality in celiac disease*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2010. 7(3): p. 158-62.
4. Biagi, F., et al., *PROgnosticating COeliac patieNts SURvival: the PROCONSUL score*. *PLoS One*, 2014. 9(1): p. e84163.
5. Giersiepen, K., et al., *Accuracy of diagnostic antibody tests for coeliac disease in children: summary of an evidence report*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2012. 54(2): p. 229-41.

Celiachia senza biopsia

R. Auricchio - Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali, Università Federico II, Napoli

La diagnosi di malattia celiaca in età pediatrica ha avuto negli ultimi anni un'importante cambiamento rappresentato dalla possibilità di evitare di sottoporre il piccolo paziente alla biopsia duodenale nel caso di una franca sintomatologia correlabile alla celiachia, di un titolo marcatamente aumentato degli anticorpi anti-transglutaminasi, confermati dalla positività degli anticorpi anti-endomisio e dalla presenza degli aplotipi HLA di rischio (DQ2 e/o DQ8).

Tuttavia dalla pubblicazione di questi nuovi criteri, varie criticità sono emerse dalla loro applicazione, come spesso succede poi nella pratica clinica. Un primo problema è stata la definizione di sintomi correlati alla malattia celiaca, che apre la questione di quali debbano essere i sintomi suggestivi di questa condizione (sintomi gastrointestinali) e quale peso dare invece a sintomi più "atipici" come l'anemia sideropenica, la bassa statura, il ritardo puberale, ect., molto frequenti in età pediatrica ma non sempre altamente specifici. Altra questione emersa è l'attendibilità dei test sierologici, su cui tanto si punta oggi, data

la documentata specificità per la malattia celiaca e la correlazione degli stessi con il danno intestinale. È emerso nell'ambito di studi prospettici molto validi, che non tutti i test sierologici hanno la stessa attendibilità e che molta attenzione va fatta anche al titolo degli stessi, perché l'accuratezza diagnostica può cambiare anche in maniera significativa, soprattutto nel caso si decida di omettere la biopsia. La stessa interpretazione della biopsia duodenale può celare problema di interpretazione se non correttamente orientata e analizzata da anatomopatologici formati in questo ambito. Ancora, ci si chiede se sia effettivamente necessario affiancare al dosaggio degli anticorpi anti-transglutaminasi anche il dosaggio degli anticorpi anti-endomisio e quale ruolo rimane per gli anticorpi anti-peptidi deamidati della gliadina. E l'HLA, che contributo ulteriore aggiunge all'accuratezza diagnostica in un soggetto che non viene sottoposto a biopsia?

Infine ci si chiede se effettivamente è necessario tenere separato l'iter diagnostico dei soggetti sintomatici da quelli asintomatici, in cui il sospetto di malattia celiaca è stato posto in maniera occasionale oppure perché il bambino appartiene a categorie a rischio maggiore di celiachia (parenti di primo grado, diabetici, etc).

Probabilmente la revisione dei criteri diagnostici da parte di un gruppo di esperti del settore a livello europeo e la revisione sistematica della produzione scientifica degli ultimi 6 anni proverà a dare una risposta a queste domande.

1. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabo I.R, et al. 2012 ESPGHAN guidelines for the diagnosis of celiac disease. *JPGN* 54:136-160.

2. Werkstetter K, Korponay-Szabo I.R, Popp A. et al. Accuracy in diagnosis of celiac disease without biopsies in clinical practice. *Gastroenterology* 2017

Mancato Mucosal healing in corso di dieta senza glutine: quando preoccuparsi

A. Carroccio - Dipartimento Biomedico di Medicina Interna e Specialistica - Università di Palermo

Il "mucosal healing" è la guarigione mucosale che si ottiene quando il paziente celiaco segue correttamente la dieta senza glutine. Si tratta cioè della verifica della ricostituzione di villi intestinali normali nel duodeno. Il controllo istologico, ripetendo dunque la biopsia intestinale, era una tappa obbligatoria del "vecchio" percorso diagnostico basato sulle due o tre biopsie duodenali, in diverse fasi della dieta, nell'epoca in cui la diagnosi si basava esclusivamente sull'istologia, e non si giovava di test sierologici accurati ("pre-sierologia"). Oggi che la diagnosi sierologica ha spesso sostituito quella istologica nel bambino, e la si propone anche nell'adulto, è giusto chiedersi perché cercare il "mucosal healing". Fra l'altro gli studi della letteratura dimostrano quasi unanimemente che, dopo diversi anni di dieta priva di glutine, una significativa percentuale di pazienti non ottiene la completa "riparazione

mucosale”, riportandosi una percentuale di istologie immutate o peggiorate rispetto al momento della diagnosi, anche in oltre il 50% dei pazienti. Nella maggior parte dei casi, tale mancato miglioramento o il mancato “mucosal healing” può essere attribuito a errori dietetici (ingestione volontaria o involontaria di cibi contenenti glutine) e dunque si potrebbe suggerire che la rivalutazione istologica è necessaria per valutare l’aderenza alla dieta. Tuttavia, in un contesto di corretto e regolare “counseling” con il supporto di dietisti qualificati, la necessità della rivalutazione istologica è da dimostrare. Inoltre, il mancato “mucosal healing” può essere attribuito a cause differenti, e non necessariamente “preoccupanti”, dalla scarsa aderenza alla dieta gluten-free. Resterebbe anche da definire il “timing” ideale della seconda biopsia. Studi scandinavi hanno dimostrato che, a 12 mesi dall’avvio della dieta priva di glutine, circa il 50% dei pazienti mostra ancora una atrofia dei villi; questo dato sembra molto ridursi in frequenza allungando il tempo di follow-up, ma non esistono indicazioni sul “quando” verificare il “mucosal healing”. Fra l’altro, un ampio studio scandinavo su oltre 700 pazienti, non dimostrava alcuna differenza prognostica fra pazienti che ripetevano la biopsia duodenale dopo un anno di dieta e pazienti che non la ripetevano; né si osservava differenza fra coloro nei quali persisteva l’atrofia dei villi (circa il 40%) e coloro che mostravano il “mucosal healing”. Si può concludere che la ricerca del mucosal healing non deve essere generalizzata e che un follow-up più “prudente” e invasivo (ripetizione dell’istologia) va individualizzato, identificando le caratteristiche di “rischio” del singolo paziente. In questo senso, per esempio, è stato dimostrato che una diagnosi di celiachia posta in soggetti anziani e/o con quadro clinico di severo malassorbimento espone a un maggior rischio di complicanze. Si potrebbe dunque suggerire un follow-up endoscopico e istologico più accurato in questa categoria di pazienti.

Ovviamente, il “mucosal healing” va sempre cercato se il paziente non risponde sul piano clinico alla dieta priva di glutine. La persistenza dei sintomi a dieta gluten-free è un importante allarme che deve fare perfino rivalutare la diagnosi iniziale di celiachia e che deve prevedere la ripetizione della biopsia duodenale, talvolta anche prima che sia trascorso un anno dall’inizio della dieta. Una sintomatologia associata a severa sindrome di malassorbimento è suggestiva di sprue refrattaria (RCD) e la diagnosi istologica con la distinzione fra RCD tipo I e tipo II è fondamentale per il corretto inquadramento, il trattamento e la prognosi.

Problemi di istologia in pediatria

R. Troncone – Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali e Laboratorio Europeo per lo Studio delle Malattie Indotte da Alimenti (ELFID) – Università Federico II, Napoli

I criteri enunciati dalle linee guida per la diagnosi di celiachia pubblicate dall’ESPGHAN nel 2012 sono stati validati da importanti studi prospettici. Ciononostante la biopsia resta per molti bambini un elemento decisivo per la diagnosi. La sua interpretazione pone ancora oggi molti problemi irrisolti.

Uno di questi è la riproducibilità del referto. In uno studio molto recente si è riscontrato un disaccordo tra il patologo locale e quello di riferimento, relativamente alla diagnosi di celiachia, in 46 su 686 casi (meno del 10%), ma molto maggiore (58%) quando si trattava di definire il grado di atrofia. Per quanto riguarda la valutazione istopatologica del bulbo, è stata recentemente sottolineata la necessità di avere sempre una campione bioptico dal bulbo a causa della descrizione di casi che presentavano lesione solo a questo livello. Altri studi più recenti, tuttavia, hanno segnalato il rischio di artefatti e di errori di interpretazione. L’uso di procedure standardizzate e validate, con corretto orientamento e taglio dei campioni bioptici intestinali, è necessario.

Un rapporto villi/cripte inferiore a 2 è considerato necessario per la diagnosi di celiachia. Il termine celiachia potenziale identifica soggetti con architettura mucosale normale e presenza di autoanticorpi specifici della celiachia. In questi soggetti ulteriori indagini (conta linfociti T con recettore gammadelta, esame depositi di IgA antitransglutaminasi) possono aiutare a capire i rapporti con la lesione celiaca. Il termine potenziale indica la capacità di questi soggetti di procedere verso l’atrofia della mucosa. Le differenze tra mucose Marsh 0 e Marsh 1 e i fattori predittivi della evoluzione verso l’atrofia saranno discussi.

Atrofia dei villi: sempre celiachia?

G. R. Corazza – Clinica Medica, IRCCS Policlinico S. Matteo – Università di Pavia

L’atrofia dei villi rappresenta l’alterazione anatomico-patologica più caratterizzante e clinicamente importante della malattia celiaca. Tuttavia, tale alterazione non è specifica e può essere presente in numerose altre condizioni. Queste ultime, per loro natura, non sono glutine-responsive e, pertanto, devono essere clinicamente differenziate non dalla celiachia come tale ma dalla sua forma refrattaria. In alcune l’atrofia dei villi è occasionale o addirittura aneddotica, in altre (enteropatia autoimmune, enteropatia da olmesartan, sprue collagenosica, sprue inclassificata, malattia da rigetto contro l’ospite) è invariabilmente presente. Alcune evidenze suggeriscono che la lista, già lunga, delle condizioni con mucosa piatta diversa dalla celiachia non sia ancora completa e, a conferma, l’evi-

denza che la prolungata assunzione di bloccanti il recettore dell'angiotensina possa portare ad atrofia dei villi risale a non più di cinque anni fa. In molte di queste condizioni l'atrofia dei villi è indistinguibile da quella presente nella celiaca e, per nostra esperienza, il mancato aumento dei linfociti intraepiteliali, l'assenza di cellule di Goblet, la presenza di bande collagene e il mancato riscontro di depositi mucosali di transglutaminasi non rappresenta un sicuro carattere istintivo. Questo argomento è in espansione epidemiologica e concettuale. Esistono numerosi punti da chiarire: (a) i meccanismi molecolari attraverso i quali *noxae* diverse da glutine determinano lo stesso tipo di lesione, (b) l'identificazione di marker istopatologici (e non) in grado di differenziare queste forme, (c) l'individuazione di ulteriori condizioni potenzialmente caratterizzate da queste lesioni.

SESSIONE POSTER

9 Novembre 2018

GRANT FC IN PROGRESS

Vitamina D e celiachia

Investigator Grant 008_FC_2015 triennale

C. Ciacci, Gastroenterologia Università di Salerno

Background La celiachia (CeD) causa riduzione della massa ossea. Alcuni studi pubblicati indicano che i livelli plasmatici di 25(OH) VitD sono più frequentemente bassi nella CeD, altri non trovano questa alterazione. Non esistono dati nei celiaci che riguardino i livelli della forma attiva, la 1,25 (OH)VitD. Due eventi potrebbero fare chiarezza, e cioè la possibilità di dosare routinariamente la forma attiva, la 1,25 (OH)VitD e la possibilità di caratterizzare la densità dell'osso in modo tridimensionale attraverso la Peripheral quantitative computed tomography (pQCT).

Scopo

1. Valutare in pazienti celiaci i livelli plasmatici delle due forme di VitD e le caratteristiche di massa e densità dell'osso.
2. Valutare l'effetto della VitD sulla mucosa intestinale di CeD in relazione al danno da glutine.

Metodi

Studio in vivo: valutazione dei livelli di 1,25(OH) e di 25-OH VitD, di Ca e P e del PTH e delle caratteristiche dell'osso misurate con la pQCT in 100 celiaci, alla diagnosi e a GFD.

Studio in vitro: esposizione alle 2 forme di VitD della mucosa intestinale di 10 celiaci alla diagnosi e 10 a GFD e valutazione degli effetti sulla infiammazione indotta sperimentalmente.

Risultati

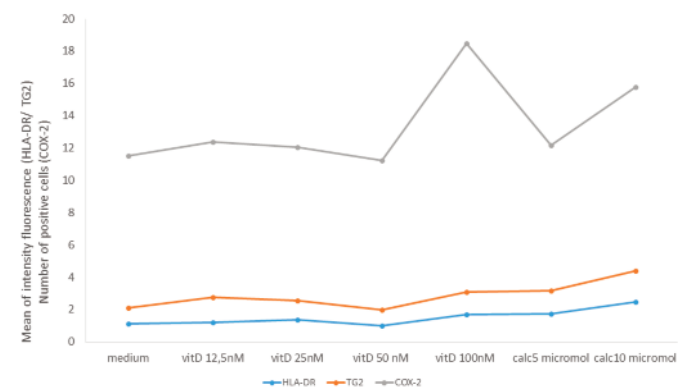
Studio in vivo Abbiamo concluso lo studio in vivo reclutando 131 pazienti celiaci di cui abbiamo dati completi per 111, 39 alla diagnosi e 72 al follow-up a GFD.

I livelli di 25OH VitD sono risultati simili alla diagnosi e a GFD (19.36 ± 8.7 vs 21.6 ± 8.9 p=ns).

I livelli di 1,25OH VitD sono risultati più alti alla diagnosi che non al GFD (61.63 ± 20.69 vs 54.91 ± 13.60 p=0.07), in accordo con un significativo aumento di iPTH alla diagnosi rispetto a GFD (73.15 vs 53.25 p=0.015).

La densità ossea è risultata più bassa alla diagnosi rispetto a GFD (299 gr/cm³ vs 315,43, p=0,05). Distinguiamo 3 gruppi a seconda dello Zeta score: 16 pazienti con uno score < -2.5 (9 a GFD); 50 pazienti con zeta score ≥ -2.5 & < -1 (34 a GFD) e 45 con uno score normale (40,5 %, 29 a GFD). Una analisi multivariata non ha evidenziato alcun rapporto tra densità ossea, vitamine D, sesso ed età. Nessuno dei pazienti studiati ha riportato fratture spontanee, due riferiscono fratture traumatiche dell'arto inferiore.

Studio in vitro Il grafico evidenzia come la presenza nel sistema in vitro di Vitamina D stimoli la espressione mucosale di marcatori dell'infiammazione, a diverse concentrazioni.



Conclusioni Troviamo una bassa densità di osso in circa il 60% dei nostri casi alla diagnosi e un valore di 25OHVitD nel siero uguale alla diagnosi e GFD. Il IPTH esercita una azione compensativa aumentando, nei pazienti alla diagnosi, il livello della forma attiva, la 1,25OHVitD. I dati in vitro evidenziano un effetto paradossale della vitamina D posta a contatto con la mucosa intestinale. Infatti, la mucosa reagisce alla presenza della vitamina D con un rialzo dei marcatori di infiammazione. Questi dati, in contrasto con dati preesistenti in letteratura, devono essere supportati da altre evidenze.

Pubblicazioni derivanti dal Grant

The value and significance of 25(OH) and 1,25(OH) vitamin D serum levels in adult coeliac patients: A review of the literature. Zingone F, Ciacci C. Dig Liver Dis. 2018 Aug;50(8):757-760. doi: 10.1016/j.dld.2018.04.005. Epub 2018 Apr 13. Review

Referenze

1. Ludvigsson, J.F., et al., *Diagnosis and management of adult coeliac disease: guidelines from the British Society of*

Gastroenterology. Gut, 2014.

2. Ciacci, C., et al., *Effects of dietary treatment on bone mineral density in adults with celiac disease: factors predicting response. Am J Gastroenterol, 1997. 92(6): p. 992-6.*

3. Heikkila, K., et al., *Celiac disease and bone fractures: a systematic review and meta-analysis. J Clin Endocrinol Metab, 2015. 100(1): p. 25-34.*

4. Corazza, G.R., et al., *Bones in coeliac disease: diagnosis and treatment. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2005. 19(3): p. 453-65.*

5. Ciacci C and Zingone F *The Value and Significance of 25(OH) and 1,25(OH) vitamin D serum levels in adult coeliac patients: a review of the literature DLD 2018*

Meccanismi di regolazione della funzione dei geni candidati nella malattia celiaca

Fellowship Grant FC_007/2017 triennale

D. Cielo, Dipartimento di scienze mediche traslazionali, Università degli Studi di Napoli Federico II

Background Gli studi di associazione genetica hanno identificato 112 polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) associati alla malattia celiaca (MC) di cui il 90% si trova in regioni non codificanti, suggerendo che la maggior parte di essi ha un ruolo potenzialmente regolatorio. Nel corso degli ultimi anni, è stato scoperto che gli RNA non codificanti (ncRNAs), definiti come piccole molecole di RNA che sono trascritte ma non tradotte in proteine, rappresentano la maggior parte dei trascritti umani. Inoltre, è anche noto che essi sono fortemente coinvolti nella regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica che quindi non è controllata solo da fattori di trascrizione. Gli RNA non codificanti che influenzano i processi epigenetici possono essere raggruppati in "short ncRNAs" e "long ncRNAs", questi ultimi saranno oggetto del nostro lavoro. Lo studio dei meccanismi di regolazione epigenetica potrebbe aiutare a completare le informazioni riguardo alla ereditarietà mancante della MC.

Obiettivi Nella prima parte di questo studio triennale l'obiettivo è quello di valutare l'effetto e la localizzazione di 7 SNPs presenti nella sequenza di 7 lncRNA associati alla MC che ne influenzano la loro funzionalità, in cellule intestinali epiteliali e non epiteliali e successivamente in sezioni fissate in formalina (FFPE) di biopsie intestinali di pazienti celiaci e controlli.

Metodi Abbiamo selezionato 7 SNPs associati alla MC che sono cis eQTL² cioè influenzano l'espressione delle regioni geniche in cui sono situati, localizzati all'interno di regioni codificanti lncRNA. Sono state reclutate le biopsie intestinali di 20 pazienti celiaci e 20 pazienti controllo, da cui mediante immuno-sorting con MicroBeads CD326 (EpCAM), abbiamo isolato le cellule epiteliali e non epiteliali per analizzare l'espressione dei lncRNA e dei geni da essi regolati mediante Real Time PCR. Successivamente selezioneremo le biopsie intestinali in paraffina di 20 soggetti celiaci e 20 soggetti controllo dalla nostra

banca dati. Su di esse osserveremo la localizzazione di lncRNA che risulteranno essere deregolati dall'analisi di espressione genica, combinando tecniche di ibridazione in situ (ISH) e immunohistochimica (IHC) sullo stesso campione in una popolazione cellulare specifica. Infine effettueremo un'analisi di predizione bioinformatica dei geni target e dei pathways molecolari regolati dai singoli lncRNA.

Risultati Ad oggi solo due geni sono stati analizzati mediante Real Time PCR; in particolare il gene KIAA 1109 e l'interleuchina IL21 entrambi geni coinvolti nei processi infiammatori. L'espressione è stata analizzata nei due compartimenti cellulari (epitelio e lamina propria) al fine di evidenziare eventuali differenze tra celiaci e controlli. Per il gene KIAA1109 non abbiamo trovato alcuna differenza mentre per l'interleuchina IL 21 abbiamo rilevato differenze statisticamente significative infatti è up-regolata sia in epitelio sia in lamina propria dei soggetti celiaci rispetto ai controlli. Questi dati rappresentano uno step ancora molto preliminare del lavoro, le analisi di espressione genica dei lncRNA sono attualmente in corso.

Referenze

1. Dubois PC, Trynka G, Franke L, et al. *Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. Nat Genet 2010;42:295-302*

2. Ricano-Ponce, C. *Wijmenga. Mapping of immune-mediated disease genes. Annu. Rev. Genom. Hum. Genet. 2013 (14): 325-353*

3. Fairfax BP, Makino S, Radhakrishnan J, Plant K, et al. *Genetics of gene expression in primary immune cells identifies cell type-specific master regulators and roles of HLA alleles. Nat. Genet. 2012; 44, 502-510 doi: 10.1038/ng.2205*

4. Fairfax BP1, Humburg P, Makino S, Naranbhai V et al. *Innate immune activity conditions the effect of regulatory variants upon monocyte gene expression. Science 2014; 343, doi: 10.1126/science.1246949*

5. Lee MN1, Ye C, Villani AC, Raj T, et al. *Common genetic variants modulate pathogen-sensing responses in human dendritic cells. Science 2014; 343, 1246980*

Il ruolo del Recettore CB2 nella patogenesi dell'osteoporosi associata alla malattia celiaca

Fellowship Grant FC_009/2017 triennale

C. Tortora, Dipartimento della Donna, del Bambino e di Chirurgia Generale e Specialistica, Università della Campania Luigi Vanvitelli, Napoli

Background La prevalenza dell'Osteoporosi (OP) in pazienti celiaci è più alta rispetto alla popolazione sana. L'eziologia dell'OP nei pazienti celiaci è multifattoriale e dovuta principalmente al malassorbimento dei micronutrienti essenziali per la mineralizzazione ossea e all'azione di citochine pro-infiammatorie che stimolano l'osteoclastogenesi. La dieta priva di glutine non è sempre sufficiente per ripristinare la massa ossea.

In studi precedenti abbiamo dimostrato un'associazione significativa tra una variante del gene CNR2 codificante il recettore CB2 e la malattia celiaca suggerendolo come biomarker

per la diagnosi della celiachia. Lo stesso recettore ha un ruolo protettivo nel mantenimento della massa ossea ed è stato suggerito come possibile bersaglio terapeutico per contrastare l'OP.

Obiettivi Lo studio mira alla comprensione del ruolo del recettore CB2 nella patogenesi dell'OP associata alla celiachia. Il primo obiettivo è caratterizzare il recettore CB2 in osteoclasti differenziati dal sangue periferico di pazienti celiaci al fine di valutare se la sua espressione risulta alterata rispetto agli osteoclasti dei donatori sani. Il secondo obiettivo è valutare se la stimolazione farmacologica del recettore CB2 con l'agonista JWH-133 è in grado di ridurre l'iperattività osteoclastica tipica del paziente celiaco.

Disegno Sperimentale Sono stati arruolati un paziente celiaco e un donatore sano. Dopo consenso informato, gli osteoclasti sono stati ottenuti dal differenziamento delle cellule mononucleate del sangue periferico dei soggetti arruolati e identificati come cellule multinucleate (numero di nuclei ≥ 3) TRAP positive mediante saggio colorimetrico (TRAP assay). Dopo estrazione di mRNA e proteine dagli osteoclasti maturi (21 giorni di differenziamento), è stata valutata l'espressione del recettore CB2. Dopo aver condotto questi esperimenti su una popolazione di studio più ampia, osteoclasti di pazienti celiaci saranno sottoposti a trattamento farmacologico con il JWH-133 e sarà valutata l'attività osteoclastica mediante TRAP assay e un saggio di riassorbimento osseo (Bone Resorption assay).

Risultati Da una prima valutazione emerge, come atteso, un aumento del numero e dell'attività degli osteoclasti del celiaco rispetto al controllo, confermando l'iperattività osteoclastica secondaria alla celiachia. Le analisi molecolari e biochimiche evidenziano, inoltre, una riduzione dei livelli di espressione genica e proteica del recettore CB2 nel celiaco rispetto al controllo. I dati ottenuti sono solo preliminari e necessitano di essere confermati su una popolazione di studio più ampia. Ci aspettiamo di dimostrare che l'iperattività osteoclastica del paziente con celiachia sia dovuta alla drastica riduzione del CB2 di cui è già noto il ruolo anti-osteoporotico. Inoltre ci aspettiamo che la stimolazione farmacologica del recettore con l'agonista JWH-133 sia in grado di diminuire tale iperattività osteoclastica.

Conclusioni Se questo progetto raggiungesse gli obiettivi prefissati condurrebbe all'identificazione di un marker predittivo, nonché target farmacologico, utile per selezionare alla diagnosi pazienti che necessitano, oltre che di una dieta priva di glutine, della somministrazione di farmaci attivi sul metabolismo osseo allo scopo di ridurre il rischio di frattura e migliorare la qualità di vita del paziente.

Referenze

1. Rossi F, Bellini G, Tolone C, Luongo L, Mancusi S, Papparella A, Sturgeon C, Fasano A, Nobili B, Perrone L, Maione S,

del Giudice EM. The cannabinoid receptor type 2 Q63R variant increases the risk of celiac disease: implication for a novel molecular biomarker and future therapeutic intervention. *Pharmacol Res.* 2012;66(1):88-94.
2. Rossi F, Bellini G, Tortora C, Bernardo ME, Luongo L, Conforti A, Starc N, Manzo I, Nobili B, Locatelli F, Maione S. CB(2) and TRPV(1) receptors oppositely modulate in vitro human osteoblast activity. *Pharmacol Res.* 2015;99:194-201.
3. Rossi F, Bellini G, Luongo L, Torella M, Mancusi S, De Petrocellis L, Petrosino S, Siniscalco D, Orlando P, Scafuoro M, Colacurci N, Perrotta S, Nobili B, Di Marzo V, Maione S; Endocannabinoid Research Group (ERG), Italy. The endovanilloid/endocannabinoid system: a new potential target for osteoporosis therapy. *Bone.* 2011;48(5):997-1007.
4. Galli G, Lahner E, Conti L, Esposito G, Sacchi MC, Annibale B. Risk factors associated with osteoporosis in a cohort of prospectively diagnosed adult coeliac patients. *United European Gastroenterol J.* 2018;6(8):1161-1168.
5. Di Stefano M, Bergonzi M, Benedetti I, De Amici M, Torre C, Brondino N, Miceli E, Pagani E, Marseglia GL, Corazza GR, Di Sabatino A. Alterations of Inflammatory and Matrix Production Indices in Celiac Disease With Low Bone Mass on Long-term Gluten-free Diet. *J Clin Gastroenterol.* 2018 Apr 18. doi: 10.1097/MCG.0000000000001032. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29672438.

Ottimizzazione di un protocollo per lo studio del ruolo dei linfociti T intraepiteliali $\gamma\delta+$ nella patologia celiaca mediante laser capture microdissection

Fellowship Grant FC_014/2017 triennale

V. Rotondi Aufiero, ISA-CNR, Napoli

Background e dati preliminari L'avvento della microdissezione laser (LCM) ha permesso di isolare singole cellule all'interno di un tessuto^[1] e pertanto potrebbe rappresentare un metodo di eccellenza per isolare i singoli linfociti intraepiteliali (IEL) T $\gamma\delta+$ nella mucosa intestinale dei pazienti celiaci nei vari stadi della patologia e chiarire il loro ruolo, ad oggi non del tutto chiaro, nella patogenesi della malattia celiaca (MC).

La collezione di RNA di alta qualità mediante LCM dipende da vari parametri, come la velocità di congelamento del campione, il tempo impiegato per la microdissezione e la quantità di materiale raccolto^[2].

Lo scopo di questo lavoro è stato l'ottimizzazione di un protocollo per l'isolamento dei IEL T $\gamma\delta+$ in sezioni criostatiche di mucosa intestinale di pazienti celiaci in fase attiva di malattia, al fine di ottenere una sufficiente quantità di RNA di buona qualità per le successive analisi di espressione genica mediante RT-qPCR, volte a spiegare la funzione dei IEL T $\gamma\delta+$ nella modulazione della risposta immune alla base della MC.

Metodologia Sezioni criostatiche di 8 μm sono state ottenute da biopsie di mucosa intestinale di pazienti celiaci floridi e raccolte su un vetrino ricoperto da una membrana sterile.

IEL T $\gamma\delta+$ sono stati identificati mediante tecnica immunostochimica (IHC) utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro il TCR $\gamma\delta$ umano.

IEL T $\gamma\delta+$ sono stati isolati mediante LCM, e l'RNA estratto da ogni campione è stato quan-

tizzato, retroscritto, e i livelli di espressione genica per il gene housekeeping GAPDH sono stati valutati mediante RT-qPCR.

Risultati Abbiamo ottenuto un RNA di buona qualità:

- minimizzando, rispetto al protocollo normale di IHC, i tempi di fissazione e di incubazione con i vari anticorpi e utilizzando soluzioni sterili, per prevenire la degradazione dell'RNA;

- accorciando al minimo i tempi della LCM, raccogliendo un sufficiente numero di cellule da cui è stata estratta una quantità adeguata di RNA per le successive analisi molecolari di RT-qPCR.

L'ottenimento di un RNA di buona qualità è fondamentale per lo studio del pattern di espressione delle citochine prodotte dai IEL T $\gamma\delta^+$ nella MC

Conclusioni La messa a punto di un efficiente protocollo sperimentale di IHC\LCM è fondamentale per una valutazione accurata delle varie citochine, proinfiammatorie e antiinfiammatorie, prodotte dai singoli IEL T $\gamma\delta^+$ isolati. In questo modo si chiarisce il ruolo di tali cellule nella patogenesi della MC e questo potrebbe essere di forte impatto per l'identificazione di possibili strategie terapeutiche per i pazienti affetti da MC.

Referenze

1. Iacomino G, Marano A, Stillitano I, Aufiero VR, Iaquinto G, Schettino M, Masucci A, Troncone R, Auricchio S, Mazzarella G. Celiac disease: role of intestinal compartments in the mucosal immune response. *Mol Cell Biochem.* 2016 Jan;411(1-2):341-9.
2. Iacomino G, Aufiero VR, Marena P, Venezia A, Troncone R, Auricchio S, Mazzarella G. Laser Capture Microdissection as a Tool to Study the Mucosal Immune Response in Celiac Disease. *Methods Mol Biol.* 2018;1723:139-154.

Profili di espressione di microRNA in plasma e feci di soggetti affetti da celiachia mediante Next-Generation-Sequencing

Fellowship Grant FC_015/2017 triennale

A. Francavilla, Italian Institute for Genomic Medicine (IIGM) Torino

Background e dati preliminari La celiachia è una malattia autoimmune complessa associata a una componente genetica che si verifica in circa l'1% della popolazione mondiale (1). Purtroppo, ad oggi, molti casi rimangono non diagnosticati, quindi la ricerca di nuovi marcatori molecolari per la diagnosi e il monitoraggio della celiachia è molto importante. I microRNA (miRNA) e altri small non-coding RNA (sncRNA) costituiscono specie molecolari molto interessanti da studiare in vari tipi di campioni biologici. Infatti, la loro espressione alterata caratterizza varie malattie, candidandoli quindi come potenziali biomarcatori anche per questa patologia complessa. Solo pochi studi hanno studiato

l'espressione dei miRNA in relazione alla celiachia in tessuto primario e sangue ma, a nostra conoscenza, nessuno in campioni di feci (2,3).

Il presente studio ha come obiettivo lo studio dei profili di espressione dei miRNA e di altri sncRNA in campioni fecali di soggetti reclutati alla diagnosi di celiachia e a un anno di dieta gluten-free. Le stesse analisi vengono eseguite anche in un gruppo di soggetti celiaci in dieta già da tempo. I risultati verranno comparati con quelli di individui sani, privi di restrizioni alimentari e di pazienti affetti da malattie gastrointestinali croniche che coinvolgono processi infiammatori. Allo studio degli sncRNA si affianca anche lo studio della composizione del microbioma intestinale.

Al momento, abbiamo già identificato un pannello di miRNA disregolati nel tumore del colon-retto, polipi e infiammazioni e raccolto parte dei campioni previsti per lo studio sulla celiachia.

Metodologia Dai partecipanti allo studio vengono raccolti: un campione di sangue da cui viene isolato il plasma, un campione di feci e un questionario riguardante lo stile di vita e le abitudini alimentari. Da tutti i campioni biologici ottenuti viene isolato l'RNA e sequenziato (small RNA-sequencing) per valutare l'espressione degli sncRNA. Per i campioni di feci, oltre all'RNA, viene isolato anche il DNA e sequenziato mediante whole metagenomic sequencing per esplorare la composizione del microbioma intestinale. I dati ottenuti dai due tipi di sequenziamento saranno utilizzati per le analisi bioinformatiche e statistiche per confrontare le diverse categorie oggetto di studio.

Risultati Si prevede di ottenere profili di espressione di sncRNA e microbioma intestinale che caratterizzano i soggetti celiaci prima e dopo il cambio della dieta, rispetto ad individui sani o con altre patologie gastrointestinali (quali coliti ulcerose, morbo di Crohn, polipi intestinali e tumore al colon-retto). Cambiamenti nei profili di espressione di miRNA e altri sncRNA con conseguente alterazione dei pathway biologici che regolano, insieme ai profili d'espressione del microbioma intestinale, potrebbero riflettere il cambiamento di regime alimentare.

Referenze

1. B Lebowitz, JF Ludvigsson, PH Green. Celiac disease and non-celiac gluten sensitivity. *BMJ* 2015;351:h4347.
2. S. Magni, G. Buoli Comani, L. Elli, S. Vanessi, E. Ballarini, G. Nicolini, et al. miRNAs affect the expression of innate and adaptive immunity proteins in celiac disease. *Am J Gastroenterol* 2014;109(10):1662-74.
3. G. Buoli Comani, R. Panceri, M. Dinelli, A. Biondi, C. Mancuso, R. Meneveri, et al. miRNA-regulated gene expression differs in celiac disease patients according to the age of presentation. *Genes Nutr* 2015; 10(5):482.

GRANT FC CONCLUSI

I microRNA circolanti come nuovi potenziali biomarcatori per la malattia celiaca e per la risposta alla dieta priva di glutine

Investigator Grant CONCLUSO FC_018/2013 triennale

A. Masotti – Istituto: Ospedale Pediatrico Bambino Gesù-IRCCS

Background e dati preliminari La malattia celiaca (CD) è una enteropatia sistemica immuno-mediata innescata dal glutine alimentare. L'unico trattamento è una dieta priva di glutine (GFD) che porta alla remissione sintomatica, sierologica e istologica nella maggior parte dei pazienti. L'attuale *gold standard* per la diagnosi è una piccola biopsia intestinale (con sierologia positiva), sebbene in età pediatrica la biopsia venga richiesta in caso di sierologia dubbia e solo quando sia ritenuta praticabile. Inoltre, non esistono linee guida chiare per valutare l'esito o l'adesione alla GFD. Quindi, la scoperta di nuovi biomarcatori è necessaria non solo per la diagnosi di CD, ma anche per la valutazione della risposta/adesione alla dieta.

Negli ultimi anni, è stata ampiamente dimostrata in letteratura l'importanza dei microRNA circolanti come biomarcatori in molte malattie [1-4]. La nostra ipotesi è che i miRNA circolanti possano essere utilizzati in combinazione con altri test sierologici come biomarcatori meno invasivi, rispetto alla biopsia, per la diagnosi della CD e la risposta alla dieta.

Metodologia Sono stati arruolati 64 pazienti con malattia celiaca, di età compresa tra i 3 e i 15 anni, 141 celiaci a dieta priva di glutine e 94 controlli sani (studio approvato dal CE dell'Ospedale Bambino Gesù). A tale casistica si sono aggiunti successivamente 6 pazienti con morbo di Crohn e 8 pazienti con rettocolite ulcerosa (in collaborazione con la Dr.ssa Lionetti e Dr.ssa Gatti del gruppo del Prof. Catassi di Ancona) per ulteriore confronto. Inoltre, per confermare la validità di tali biomarcatori, è stata considerata una popolazione di 14 pazienti celiaci "borderline" (cioè aplotipo HLA-DQ2/DQ8 e livello di anticorpi anti-TG2 < 10x il limite superiore del normale (ULN)). I microRNA circolanti sono stati studiati con *next generation sequencing* (NGS) e qPCR.

Risultati ottenuti ad oggi I dati ottenuti hanno evidenziato che i profili di espressione dei microRNA nei pazienti celiaci sono significativamente diversi rispetto ai controlli e ai celiaci a dieta gluten-free. È stato ricavato un pannello di microRNA significativamente deregolati e diversi da quelli trovati in pazienti con morbo di Crohn o con rettocolite ulcerosa. Infine è stata condotta un'analisi di correlazione per identificare quei microRNA

da poter utilizzare come biomarcatori di danno intestinale, di severità di patologia e di rispondenza alla dieta.

Conclusioni e prospettive Il presente studio ha consentito di identificare profili specifici di microRNA circolanti nella malattia celiaca e durante GFD, da utilizzare come biomarcatori diagnostici o come marcatori di danno intestinale. Inoltre questo studio ha consentito di studiare il profilo dei microRNA circolanti anche nel morbo di Crohn e nella rettocolite ulcerosa, sebbene sia necessaria una casistica più ampia.

Eventuali nuovi sviluppi successivi alla chiusura del Grant Dopo la fine del Grant, abbiamo proseguito lo studio dei microRNA circolanti su un ulteriore gruppo di pazienti definiti "borderline" per validare l'uso dei biomarcatori studiati nel progetto e poter definire con esattezza la loro efficacia e sensibilità. Ad ogni modo, lo studio su tali pazienti necessiterebbe di una numerosità campionaria maggiore, da effettuare possibilmente mediante studio multicentrico, in modo da raffinare ulteriormente i soddisfacenti dati ottenuti.

Pubblicazioni derivate dal Grant:

È in corso la stesura del manoscritto relativo alla parte sperimentale dei microRNA circolanti.

Referenze

1. Masotti A, Baldassarre A, Guzzo MP, Iannuccelli C, Barbato C, Di Franco M. Circulating microRNA Profiles as Liquid Biopsies for the Characterization and Diagnosis of Fibromyalgia Syndrome. *Mol Neurobiol.* 2016 Oct 29.
2. Masotti A, Baldassarre A, Fabrizi M, Olivero G, Loreti MC, Giammaria P, Veronelli P, Graziani MP, Manco M. Oral glucose tolerance test unravels circulating miRNAs associated with insulin resistance in obese preschoolers. *Pediatr Obes.* 2017 Jun;12(3):229-238.
3. Baldassarre A, Felli C, Prantera G, Masotti A. Circulating microRNAs and Bioinformatics Tools to Discover Novel Diagnostic Biomarkers of Pediatric Diseases. *Genes (Basel).* 2017 Sep 19;8(9).
4. Felli C, Baldassarre A, Masotti A. Intestinal and Circulating MicroRNAs in Coeliac Disease. *Int J Mol Sci.* 2017 Sep 6;18(9).

Un test genetico per la diagnosi della sensibilità al glutine non celiaca

Investigator Grant CONCLUSO FC_046/2013 triennale

M. Sallese, Università G. D'Annunzio Chieti-Pescara

Background La sensibilità al glutine non celiaca (NCGS) è un disturbo associato al consumo di glutine che provoca dolori addominali, diarrea, stanchezza, mente annebbiata e dermatiti, in analogia con altre patologie legate al glutine 1-3. Nei pazienti affetti da NCGS si riscontra un lieve aumento di linfociti intraepiteliali nella mucosa duodenale, mentre non sono presenti anticorpi caratteristici né l'atrofia villosa, elementi tipici della celiachia 1,3.

Obiettivi Attualmente non ci sono biomarcatori per la NCGS, la diagnosi è basata sulla valutazione dei sintomi durante un challenge con glutine e sull'esclusione di altre affezioni affini come la malattia celiaca e la sindrome dell'intestino irritabile^{3,4}.

In questo studio abbiamo analizzato l'espressione genica per identificare profili di espressione caratteristici da sfruttare come biomarcatori a supporto della diagnosi di NCGS e per ottenere informazioni sui meccanismi patogenetici coinvolti in questa malattia.

Disegno Sperimentale Sono stati reclutati pazienti con NCGS diagnosticata in base ai criteri disponibili all'inizio dello studio⁵, e pazienti affetti da celiachia diagnosticata in base alla positività anticorpale e istologica. Come controlli sono stati reclutati pazienti affetti da patologie gastrointestinali non correlate al consumo di glutine. I pazienti sono stati sottoposti a biopsia duodenale e l'RNA totale estratto da questi campioni è stato utilizzato per determinare l'espressione di miRNA selezionati, tramite qPCR. Alcuni miRNA differenzialmente espressi sono stati validati in un secondo gruppo di pazienti. Inoltre, è stata condotta un'analisi di espressione genica "genome wide" tramite microarray.

Risultati L'analisi di espressione dei miRNA ha portato all'identificazione di 7 miRNA differenzialmente espressi nei pazienti NCGS rispetto ai controlli (FDR<0.1). Sei di questi miRNA sono stati validati con successo, (FDR<0.05), su una coorte più ampia di pazienti.

Lo studio condotto con microarray nei pazienti NCGS e controlli ha identificato 300 trascritti differenzialmente espressi (FC>2 e FDR <0.05). Il 33% di questi sono RNA codificanti proteici, mentre il resto sono RNA non codificanti che includono small nucleolar RNAs (SNORA e SNORD), RNA antisense, trascritti intronici, e long non coding RNA. La possibile rilevanza degli RNA non codificanti nella NCGS è sottolineata anche dal fatto che circa lo 0.8% degli RNA non codificanti avevano un'espressione differenziale contro il solo 0.35% (2 volte meno!) degli RNA codificanti.

L'analisi di espressione genica nei pazienti celiaci e controlli ha identificato 1877 trascritti differenzialmente espressi di cui il 55% sono RNA codificanti e il 46% non codificanti. Infine, dal confronto tra pazienti NCGS e celiaci sono stati rilevati 1500 RNA differenziali equamente distribuiti tra RNA codificanti e non codificanti.

Conclusioni I risultati dello studio indicano che:

un profilo di espressione costituito da 6 miRNA è caratterizzante per i pazienti affetti da NCGS; questa peculiarità può essere sfruttata come biomarcatore a supporto della diagnosi di NCGS;

sulla base dell'espressione genica i pazienti NCGS sono una popolazione geneticamente distinta dai celiaci e dai controlli;

l'alterazione del trascrittoma non codificante è caratteristico della NCGS e non rilevabile nella malattia celiaca;

le alterazioni genetiche sono potenzialmente utilizzabili sia per corroborare la diagnosi che per far luce sui meccanismi patogenetici della NCGS.

Referenze

1. Mansueto P., Seidita A., D'Alcamo A., Carroccio A. Non-Celiac Gluten Sensitivity: Literature Review. *Journal of the American College of Nutrition*, 2014; 33: 39-54.
2. Fasano A., Sapone A., Zevallos V., Schuppan D. Nonceliac gluten sensitivity. *Gastroenterology*, 2015; 148: 1195-1204.
3. Catassi C, Bai JC, Bonaz B, Bouma G, Calabro A, Carroccio A, et al. Non-Celiac Gluten sensitivity: the new frontier of gluten related disorders. *Nutrients*, 2013; 5: 3839-3853.
4. Catassi C., Elli L., Bonaz B., Bouma G., Carroccio A., Castillejo G., Cellier C., Cristofori F., de Magistris L., Dolinsek J., Dieterich W., Francavilla R., Hadjivassiliou M., Holtmeier W., Korner U., Leffler D.A., Lundin K.E.A., Mazzarella G., Mulder C.J., Pellegrini N., Rostami K., Sanders D., Skodje G.I., Schuppan D., Ullrich R., Volta U., Williams M., Zevallos V.F., Zopf Y., Fasano A. Diagnosis of Non-Celiac Gluten Sensitivity (NCGS): The Salerno Experts' Criteria. *Nutrients*, 2015; 7: 4966-4977.
5. Sapone A, Bai JC, Ciacci C, Dolinsek J, Green PH, Hadjivassiliou M, et al. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Med* 2012, 10: 13.

Storia naturale dell'attivazione della malattia celiaca: implicazioni cliniche

Investigator Grant CONCLUSO FC_053/2013 triennale

R. Troncone, ELFID (Laboratorio Europeo per lo Studio delle Malattie Indotte da Alimenti) e Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali, Università Federico II Napoli

Background La malattia celiaca (CD) è una malattia autoimmune, causata dall'ingestione di glutine in individui geneticamente suscettibili. Alcuni peptidi del glutine generano una risposta cellulare T mentre altri, come il peptide dell'A-gliadina P31-43, attivano i percorsi della immunità innata. In particolare, il P31-43 è in grado di alterare il traffico endocitico e di incrementare l'espressione dell'interleuchina-15 (IL-15), una citochina coinvolta nell'attivazione di linfociti intraepiteliali nella mucosa. Come suggerito da studi epidemiologici e genetici altri fattori ambientali potrebbero essere in grado di suscitare lo sviluppo di CD in individui geneticamente suscettibili, tra questi in primo luogo le infezioni virali. A favore del possibile ruolo di virus, dati preliminari di altri laboratori e del nostro hanno mostrato un aumento di IFN di tipo 1 nel piccolo intestino di pazienti celiaci.

Obiettivo di questo progetto è stato quello di studiare i pathways della immunità innata attivati da peptidi di glutine e/o virus e il loro ruolo nell'induzione del danno, analizzandoli nel contesto di diverse fasi della malattia.

Metodologia Sono state utilizzate linee di celle epiteliali (CaCo2) e biopsie ottenute da

pazienti controllo e da pazienti celiaci in fase attiva di malattia e potenziali. Sono state studiate in condizioni basali e dopo cultura in presenza di peptidi della gliadina. PCR, immunostochimica e analisi biochimica delle proteine (Western blot) ci hanno consentito di valutare i pathways attivati dai peptidi della gliadina e dai ligandi virali. Esperimenti condotti silenziando HRS hanno consentito di valutare il ruolo delle alterazioni del traffico endocitico nell'attivazione dell'immunità innata. Lo studio delle biopsie di soggetti con celiachia potenziale mediante immunostochimica e FACS ha permesso di chiarire alcuni dei meccanismi responsabili dello sviluppo dell'atrofia dei villi.

Risultati In questo progetto abbiamo dimostrato:

- 1) oltre all'aumentata espressione di IL15, l'attivazione del pathway dell'interferone alpha (IFN) nell'intestino di soggetti celiaci in fase acuta.
- 2) che il peptide della gliadina P31-43, resistente alle endopeptidasi intestinali, è in grado di indurre l'attivazione dell'INF-alpha in biopsie di soggetti celiaci in fase acuta e in fase di remissione della malattia.
- 3) che in un modello cellulare di epitelio intestinale il P31-43 attiva la via dell'INF-alpha analogamente al ligando virale Loxoribine (LOX). Le due molecole possono agire sinergicamente e in entrambi i casi causano una alterazione del traffico vescicolare intracellulare.
- 4) che il blocco del traffico intracellulare è in grado "per sè" di indurre attivazione del pathway dell'INF-alpha.
- 5) che alterazioni sono costitutivamente presenti già nei soggetti con celiachia potenziale rendendoli suscettibili all'azione del peptide 31-43, ma che, in questi ultimi, i meccanismi dell'immunità innata non sono pienamente espressi. In particolare la minore espressione di IL21 e la diversa espressione di marcatori NK sui linfociti intraepiteliali è verosimilmente il motivo del mancato sviluppo di atrofia dei villi.

Conclusioni I risultati qui presentati suggeriscono che insieme alle infezioni virali, proteine alimentari, in grado di simulare e potenziare la risposta immunitaria innata ai virus, possono innescare una malattia autoimmune. Nel caso della celiachia, perché si abbia il danno è necessaria accanto alla risposta CD4 adattativa la piena espressione dei meccanismi dell'immunità innata.

Pubblicazioni derivate dal Grant:

1. Setty M, Discepolo V, Abadie V, Kamhawi S, Mayassi T, Kent A, Ciszewski C, Maglio M, Kistner E, Bhagat G, Semrad C, Kupfer SS, Green PH, Guandalini S, Troncone R, Murray JA, Turner JR, Jabri B. Distinct and synergistic contributions of epithelial stress and adaptive

immunity to functions of intraepithelial killer cells and active celiac disease. *Gastroenterology* 2015;149:681-91.

2. Tosco A, Maglio M, Paparo F, Greco L, Troncone R, Auricchio R. Discriminant score for celiac disease based on immunohistochemical analysis of duodenal biopsies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2015;60:621-5.

3. Borrelli M, Gianfrani C, Lania G, Aitoro R, Ferrara K, Nanayakkara M, Ponticelli D, Zanzi D, Discepolo V, Vitale S, Barone MV, Troncone R, Auricchio R, Maglio M. In the Intestinal Mucosa of Children With Potential Celiac Disease IL-21 and IL-17A are Less Expressed than in the Active Disease. *Am J Gastroenterol.* 2016;111:134-44.

4. Paoletta G, Lepretti M, Barone MV, Nanayakkara M, Di Zenzo M, Sblattero D, Auricchio S, Esposito C, Caputo I. Celiac anti-type 2 transglutaminase antibodies induce differential effects in fibroblasts from celiac disease patients and from healthy subjects. *Amino Acids.* 2017;49:541-550.

5. Camarca A, Auricchio R, Picascia S, Fierro O, Maglio M, Miele E, Malamisura B, Greco L, Troncone R, Gianfrani C. Gliadin-reactive T cells in Italian children from preventCD cohort at high risk of celiac disease. *Pediatr Allergy Immunol* 2017;28:362-369.

6. Nanayakkara M, Lania G, Maglio M, Auricchio R, De Musis C, Discepolo V, Miele E, Jabri B, Troncone R, Auricchio S, Barone Mv. P31-43, an undigested gliadin peptide, mimics and enhances the innate immune response to viruses and interferes with endocytic trafficking: a role in celiac disease. *Sci Rep.* 2018 ;8:10821.

Referenze

1. Nanayakkara M1, Lania G, Maglio M, Discepolo V, Sarno M, Gaito A, Troncone R, Auricchio S, Auricchio R, Barone MV. An undigested gliadin peptide activates innate immunity and proliferative signaling in enterocytes: the role in celiac disease. *Am J Clin Nutr.* 2013; 98:1123-35.
2. Barone MV, Troncone R, Auricchio S. Gliadin peptides as triggers of the proliferative and stress/innate immune response of the celiac small intestinal mucosa. *Int J Mol Sci.* 2014; 15:20518-37.
3. Barone MV, Zimmer KP. Endocytosis and transcytosis of gliadin peptides. *Mol Cell Pediatr.* 2016;3:8.

Analisi dell'espressione dei geni HLA di rischio e della risposta infiammatoria al glutine, in pazienti celiaci con genotipo DR5/DR7

Investigator Grant CONCLUSO FC_014/2014 annuale

G. Del Pozzo, Istituto di Genetica e Biofisica, CNR- Napoli

Background e dati preliminari Abbiamo recentemente dimostrato, nei pazienti celiaci, un'elevata espressione degli alleli di rischio DQA1*05 e DQB1*02 (DQ2.5), in cellule presentanti l'antigene (APC) con genotipo eterozigote DR1/DR3 (Pisapia, J. of Autoimmun, 2016). In conseguenza di questa espressione genica differenziale, risulta significativamente elevata sia la molecola DQ2.5 sia la capacità di presentare i peptidi tossici del glutine nelle APC eterozigoti, pari ai livelli osservati nelle APC DR3/DR3, omozigoti per il DQ2.5. Successivamente abbiamo esteso l'analisi alle APC ottenute da pazienti celiaci con genotipo DR5/DR7 caratterizzati dall'aver gli alleli di rischio DQA1*05 e DQB1*02 in configurazione *trans*. È noto, infatti, che questo genotipo ha un'elevata frequenza nell'ambito della popolazione italiana e conferisce un alto rischio di ammalarsi di celiachia. Anche per questo gruppo di pazienti abbiamo iniziato la quantizzazione dell'espressione degli alleli predisponenti la celiachia rispetto a quelli non predisponenti e l'analisi dell'attivazione della risposta T CD4⁺ infiammatoria da parte delle APC DR5/DR7.

Metodologia Cellule B immortalizzate (B-LCLs) da pazienti DR5/DR7 sono state utilizzate per preparare l'RNA totale e quantizzare i trascritti degli alleli di rischio DQA1*05 e DQB1*02 rispetto agli alleli DQA1*02 e DQB1*03 non associati alla celiachia. La quantità di RNA è stata determinata in seguito a retrotrascrizione e Real-Time PCR, effettuata con coppie di primers allele-specifici. Le stesse B-LCLs sono state utilizzate come cellule presentanti i peptidi antigenici della gliadina al fine di stimolare l'attivazione e la proliferazione di linee di linfociti CD4⁺ gliadina-specifici di origine intestinale. L'attivazione delle cellule T è stata determinata mediante quantizzazione del IFN γ attraverso saggi ELISA.

Risultati e conclusioni. Risultati preliminari hanno dimostrato che nelle APC DR5/DR7 l'espressione degli alleli DQA1*05 e DQB1*02 è circa il 70-80% della quantità totale di ciascun trascritto, come già evidenziato per le APCs con genotipo DR1/DR3. L'espressione differenziale è evidente anche nel gruppo di controllo, cioè nelle APCs DR5/DR7 di individui sani, ma con un incremento minore. Infine l'espressione differenziale di questi alleli induce un aumento in membrana della molecola DQ2.5 che presenta i peptidi antigenici della gliadina e, di conseguenza, dell'attivazione dei linfociti T CD4⁺. L'attivazione dei linfociti CD4⁺ misurata come produzione di IFN γ risulta quindi paragonabile a quella ottenuta con le APCs DR1/DR3.

In conclusione questi risultati preliminari confermano che non solo il numero di copie ma anche l'espressione degli alleli predisponenti DQA1*05 e DQB1*02 è importante nella determinazione del livello di rischio di celiachia.

Prospettive Studi futuri consisteranno nell'analisi di una più ampia coorte di pazienti e controlli con genotipo DR1/DR3 e DR5/DR7 per dimostrare che l'espressione differenziale degli alleli di rischio è maggiormente significativa nei pazienti rispetto ai controlli e che questo parametro può essere usato a scopo diagnostico.

Inoltre è nostra intenzione investigare sui meccanismi che regolano i geni di rischio. Ci proponiamo infatti di verificare se l'espressione differenziale degli alleli DQA1*05 e DQB1*02 è dovuta a un incremento della trascrizione, determinata da sequenze regolative distali rispetto al promotore e associate all'aplotipo HLA. Inoltre ci proponiamo di analizzare l'importanza anche della regolazione post-trascrizionale, cioè se questa influisce sulla quantità dei trascritti attraverso l'interazione di "RNA binding proteins" con le regioni 3'UTR messengeri.

Publicazioni derivate dal Grant:

1. Pisapia L, Camarca A, Picascia S, Bassi V, Barba P, Del Pozzo G, Gianfrani C. HLA-DQ2.5 genes associated with celiac disease risk are preferentially expressed with respect to non-predisposing HLA genes: Implication for anti-gluten T cell response. J Autoimmun. 2016 Jun; 70:63-72
2. Gianfrani C, Pisapia L, Picascia S, Strazzullo M, Del Pozzo G. Expression level of risk genes of MHC class II is a susceptibility factor for autoimmunity: New insights. J Autoimmun. 2018 May; 89:1-10.

**5° WORKSHOP RICERCA FC,
8 Novembre 2018
Grant FC: Progress and Final Scientific Reports**

Moderatori:

G.R. Corazza, *Dipartimento Medicina Interna e Gastroenterologia, Policlinico San Matteo - Pavia*

M. Silano, *Coordinatore Board del Comitato Scientifico AIC; Direttore Unità Operativa Alimentazione, Nutrizione e Salute, Dipartimento Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare - Istituto Superiore di Sanità - Roma*

R. Troncone, *Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali, Università degli Studi Federico II - Napoli*

8

NOVEMBRE 2018/GIOVEDÌ

Starhotel Metropole
Via Principe Amedeo, 3
00185 Roma

5° WORKSHOP RICERCA FC

PROGRAMMA SCIENTIFICO

<p style="font-size: 10px; background-color: #0056b3; color: white; padding: 2px;">16:00</p> <p style="font-size: 10px; background-color: #e67e22; color: white; padding: 2px;">18:00</p> <p style="font-size: 10px; background-color: #e67e22; color: white; padding: 2px;">18:15</p> <p style="font-size: 10px; background-color: #e67e22; color: white; padding: 2px;">18:30</p> <p style="font-size: 10px; background-color: #e67e22; color: white; padding: 2px;">11:45</p> <p style="font-size: 10px; background-color: #e67e22; color: white; padding: 2px;">17:00</p>	<p>Introduzione, Presidente FC</p> <p>Introduzione del Moderatore G.R. Corazza</p> <p>Final Report: Investigator Grant 013FC2014 PI Corazza (Palermo) - Segue Discussione</p> <p>Final Report: Investigator Grant 017FC2014 PI Caporali (Firenze) - Segue Discussione</p> <p>Final Report: Investigator Grant 016FC2015 PI Cicciocioppo (Napoli) - Segue Discussione</p> <p>Progress Report: Fellowship Grant 003FC2016 PI Rossi (Firenze) - Segue Discussione</p>	<p style="font-size: 10px; background-color: #e67e22; color: white; padding: 2px;">18:15</p> <p style="font-size: 10px; background-color: #e67e22; color: white; padding: 2px;">18:30</p> <p style="font-size: 10px; background-color: #e67e22; color: white; padding: 2px;">18:45</p> <p style="font-size: 10px; background-color: #e67e22; color: white; padding: 2px;">17:45</p> <p style="font-size: 10px; background-color: #e67e22; color: white; padding: 2px;">17:50</p> <p style="font-size: 10px; background-color: #e67e22; color: white; padding: 2px;">18:00</p> <p style="font-size: 10px; background-color: #e67e22; color: white; padding: 2px;">19:00</p>	<p>Progress Report: Fellowship Grant 004FC2016 PI Balogh (Chieti) - Segue Discussione</p> <p>Progress Report: Fellowship Grant 005FC2016 PI Paparella (Napoli) - Segue Discussione</p> <p>Progress Report: Fellowship Grant 007FC2016 PI Rossi (Firenze) - Segue Discussione</p> <p>Progress Report: Fellowship Grant 009FC2016 PI Rossi (Napoli) - Segue Discussione</p> <p>Chiusura Lavori</p> <p>Presentazione dei Titolari dei Progetti selezionati con il Bando FC 2018</p> <p>Aperitivo in sala</p> <p style="font-size: 8px;">* Presentazione di cinescopi progettati a cura del chair: G.R. Corazza, M. Silano, R. Troncone</p>	<p style="color: #0056b3; font-weight: bold; font-size: 10px;">ICELA 2018</p> <p style="font-size: 8px;">>Antonio Carroccio: Dip. Biomedico di Med. Interna, Università degli Studi di Palermo >Marzia Caproni: Dip. Specialistiche Mediche, Azienda USL Toscana Centro, Firenze >Rachele Cicciocioppo: Dip. Di Medicina, Università di Verona >Maria Caterina Rossi: Dip. Medicina Sperimentale e Clinica, Università degli Studi di Firenze >Giuseppina Bologna: Dip. Medicina e Scienze dell'Invecchiamento, Università "G. D'Annunzio", Chieti-Pescara >Monia Porporato: Dip. Scienze Mediche Trasazionali, Laboratorio Europeo per lo Studio delle Malattie Indotte da Alimenti (ELFID), Università degli Studi Federico II, Napoli >Federica Ricci: Dip. Scienze Biomediche Sperimentali e Cliniche, Università degli Studi di Firenze >Serena Vitale: Istituto di Biochimica delle Proteine, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Napoli</p>
---	--	--	--	--

DIRETTORE SCIENTIFICO

>Marco Silano
Direttore del Reparto Alimentazione, Nutrizione e Salute - Dipartimento Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare
Istituto Superiore di Sanità
Roma

Chair

>Marco Silano
>Gino Roberto Corazza
Dipartimento Medicina Interna e Gastroenterologia
Polichinco San Matteo
Pavia
>Ricardo Troncone
Dipartimento di Scienze Mediche Trasazionali
Università degli Studi Federico II
Napoli

ICEM
L'evento non è accreditato.

MODALITÀ DI ISCRIZIONE : La partecipazione al Workshop è GRATUITA ma è riservata a un numero limitato di partecipanti. La scheda di iscrizione è **OBBLIGATORIA** e deve essere inviata alla segreteria organizzativa:
info@double-em.it - Tel. E. Fax 010 8602968

SEDE
Starhotel Metropole - Via Principe Amedeo, 3 - 00185 Roma

Come raggiungere la sede: L'hotel dista 300 mt. dalla stazione ferroviaria di Roma Termini. Dall'aeroporto Leonardo da Vinci di Fiumicino (35km), prendere il treno Leonardo Express per la stazione di Roma Termini, con partenze ogni 30 minuti. Dalla A1 Roma/Milano prendere l'uscita Grande Raccordo Anulare/Via Salaria, proseguire verso il centro di Roma. Dalla A2 Roma/Napoli uscita Grande Raccordo Anulare/Via Tuscolana, proseguire verso il centro di Roma.

Segreteria Organizzativa:
DOUBLE EM SRL
Via E. Baroni 2/3 SC, DN - 16129 Genova
Tel. e Fax +39 010 8602968 - cell. +39 373 7911195
info@double-em.it - www.double-em.it

Ente Promotore: Fondazione Celiachia FC

Luigo Novellino - Responsabile Ufficio Scientifico FC - email: ufficioscientifico@celiachia.it
Silvia Blondet - Segreteria Nazionale AIC - email: sblondet@celiachia.it - tel. +39 010 8449402

Con il patrocinio di: AIC - Associazione Italiana Celiachia, e SBS - Spiga Baratta Service

Final Report Investigator Grant triennale FC 013/2014 – Relazione Orale e Poster

A. Carroccio, Di.Bi.M.I.S. Università di Palermo

Sensibilità al Glutine Non Celiaca – Area: Studio Clinico

Studio sulla sensibilità al frumento non celiaca (gluten sensitivity): rischio di malnutrizione, osteoporosi e malattie autoimmuni associate

Il progetto aveva lo scopo di studiare diversi aspetti della “sensibilità al frumento non celiaca”, condizione di recente “comparsa” in letteratura, più comunemente conosciuta come “non-celiac gluten-sensitivity” (NCGS).

Il progetto ha dato risultati che sono stati pubblicati in numerosi articoli.

La valutazione del contenuto minerale osseo è stata eseguita (Carroccio A et al. BMC Med. 2014;12:230) in settantacinque pazienti con NCGS diagnosticata mediante challenge in doppio cieco (DBPC challenge) (63 donne; median age 36 anni) che sono stati sottoposti a densitometria ossea. I pazienti sono stati valutati con DBPC challenge anche per le proteine del latte vaccino e 30/75 risultavano affetti da ipersensibilità alimentare multipla (MFH). Trentacinque pazienti con NCGS (46.6%) mostrarono osteopenia o osteoporosi. Un basso body mass index (BMI) è risultato correlato con la presenza di osteopenia/osteoporosi e con la presenza di MFH. I pazienti con NCGS avevano un introito giornaliero di calcio nella dieta significativamente inferiore a quello del gruppo di controllo.

Per quel che riguarda la coesistenza di malattie autoimmuni e la frequenza di autoanticorpi sierici nella NCGS, è stato condotto uno studio su 131 pazienti (121 donne; mean age 29 anni) diagnosticati con DBPC challenge. Abbiamo dimostrato che una identica percentuale, il 29%, di soggetti con NCGS e di pazienti celiaci (controlli) presentavano malattie autoimmuni (tiroidite di Hashimoto in 29 NCGS), con frequenza significativamente maggiore che nei pazienti IBS di controllo (4%) (P < .001). Inoltre, il 46% dei pazienti con NCGS presentava positività per anticorpi ANA nel siero (titolo mediano 1:80) la positività degli ANA correlava con presenza dell'aplotipo DQ2/DQ8. (Carroccio A, et al. Gastroenterology. 2015;149:596-603). Questi risultati hanno evidenziato per la prima volta che un'alta percentuale di pazienti con NCGS sviluppano malattie autoimmuni e hanno anticorpi anti-nucleo positive nel siero.

Sempre sul versante clinico-immunologico, abbiamo valutato la relazione fra NCGS e la dermatite da contatto con ipersensibilità al nickel valutata con PATCH test. Abbiamo osservato che la frequenza di dermatite da contatto era significativamente maggiore nei soggetti con NCGS che nei controlli con IBS: 6/60 (10%) fra gli NCGS rispetto al 5% nei

controlli ($P = 0.04$). La principale caratteristica clinica dei pazienti con NCGS e allergia al nickel era la presenza di sintomi cutanei dopo ingestione di frumento. (D'Alcamo A et al. *Nutrients* 2017, 9, 103; doi:10.3390/nu9020103).

Infine, per quel che riguarda i markers di imaging o immunologici di NCGS, sono stati condotti diversi studi. Uno studio ecografico dell'addome non ha mostrato caratteristiche distintive della NCGS; in particolare, la valutazione delle anse intestinali non ha evidenziato alterazioni distintive rispetto a pazienti con IBS (controlli), al contrario di quanto è noto nella malattia celiaca (Soresi M et al. *J Clin Gastroenterol* 2017).

Gli studi immunologici sono stati due. Il primo ha incluso 22 pazienti con NCGS che sono stati sottoposti a biopsie rettali prima e dopo challenge con frumento. Gli immunociti sono stati isolati dalle biopsie rettali e caratterizzati per produzione di citochine e markers di superficie. Nei pazienti con NCGS è stata evidenziata un incremento significativo di CD45+ e di linfociti CD3+ e CD3-; i CD3- hanno dimostrato una significativa produzione di IFN- γ . I linfociti CD3- sono stati identificati come "type-1 innate lymphoid cells (ILC1). Le cellule ILC1 che producevano IFN- γ si sono significativamente ridotte dopo due settimane di dieta priva di frumento (Di Liberto D et al. *Clin Transl Gastroenterol* 2016; 7).

Il secondo studio di immunocistochimica ha mostrato in 78 pazienti con NCGS che l'infiammazione mucosale è presente sia a livello duodenale che rettale; in questa sede anzi la flogosi sembra più marcata. I pazienti con NCGS hanno in entrambi i distretti un significativo aumento di CD3+ IEL, lamina propria CD45+, e eosinofili rispetto ai controlli. A livello duodenale l'infiltrato eosinofilo si è dimostrato più marcato nei pazienti NCGS con dispepsia rispetto a quelli con sintomi da IBS. Nelle conclusioni si ipotizza il ruolo patogenetico degli eosinofili nella NCGS. (Carroccio A et al. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2018, *in press*).

Final Report Investigator Grant triennale FC 017/2014 – Relazione Orale e Poster

M. Caproni, Direttore SOS Malattie Rare Dermatologiche, USL Toscana Centro, Università di Firenze

Dermatite Erpetiforme – Area: Clinica

L'insorgenza della dermatite erpetiforme (DH) nei pazienti con celiachia: definizione della risposta T cellulare specifica verso i principali autoantigeni ed antigeni esogeni coinvolti

Background La dermatite erpetiforme (DH) rappresenta la manifestazione cutanea specifica della malattia celiaca (CD)[1] Solo un sottogruppo di pazienti con CD sviluppa la DH ma le ragioni patogenetiche non sono ancora note. Un ruolo centrale nella patogenesi della DE sembra essere svolto dalla presenza di immunocomplessi IgA circolanti legati

alla transglutaminasi 3 (TG3), come avviene per la transglutaminasi 2 (TG2) nella CD. Ulteriori studi sembrano essere necessari per valutare se la TG3 possa essere considerata il principale antigene bersaglio nella DE e per definire meglio il fenotipo della risposta immunitaria coinvolta nella patogenesi della DE.

L'obiettivo dello studio è stato quello di indagare, ex vivo, il fenotipo delle differenti popolazioni linfocitarie, (in particolare Th1, Th2, Th17), l'espressione di alcune citochine prodotte dai differenti subset linfocitari (IFN- γ , IL-17A, IL-4, TNF- α) riscontrate nella cute, nell'intestino e nel sangue circolante dei pazienti con DH in fase attiva e a dieta libera; i risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli dei pazienti celiaci senza impegno cutaneo. Inoltre sono stati analizzati i linfociti T presenti sia a livello cutaneo che a livello intestinale, per valutare se il loro principale bersaglio molecolare sia rappresentato, come avviene nella celiachia, dalla transglutaminasi tissutale (TG2), oppure corrisponda a un altro antigene in grado di indirizzare il fenotipo della malattia verso la comparsa delle manifestazioni cutanee.

Metodologia Sono stati arruolati nello studio 16 pazienti affetti da DH e 13 da MC; sulle cellule mononucleate (MNC) provenienti dalle linee policlonali dei pazienti con DH, ottenute dai campioni di sangue periferico, dai frammenti cutanei e dalle biopsie intestinali, sono state effettuate valutazioni mediante analisi multiparametrica con citometria a flusso per definire il repertorio TCR $\alpha\beta$ /gd, la produzione di IFN- γ , IL-17, IL-4 e TNF- α da parte delle cellule TCD4+ e TCD8+. Inoltre linee di cellule T (TCL) antigene-specifiche sono state generate mettendo in coltura 1×10^6 cellule mononucleate del sangue periferico in presenza di TG2 o TG3 (5 $\mu\text{g/ml}$). Le TCL indotte dal TG2 sono state ri-testate con il loro antigene induttore (TG2), con la TG3, con un controllo negativo e un controllo positivo; viceversa per le TCL indotte da TG3. In caso di cross-reattività, una cellula della corrispondente linea cellulare è stata aggiunta in coltura, dando origine ad una popolazione clonale omogenea. La specificità clonale è stata valutata mediante analisi citofluorimetrica della regione V- β del T-cell receptor.

Risultati I risultati mostrano un' aumentata produzione di TNF- α da parte dei linfociti TCD4+ ottenuti dalle linee policlonali isolati dalla cute dei pazienti con DH rispetto ai pazienti con CD. Una maggiore espressione di IL-4 veniva inoltre rilevata a livello cutaneo da parte dei linfociti TCD4+ ottenuti dalle stesse linee policlonali senza raggiungere tuttavia la significatività statistica ($P 0,051$). A livello intestinale invece si riscontrava una significativa iperproduzione di IFN- γ da parte dei linfociti TCD8+ ottenuti dalle linee policlonali nei pazienti con CD rispetto a quelli con DH. Riguardo al test di specificità antigenica lo studio dimostra l'esistenza di cloni linfocitari cross-reattivi alla TG2 e alla TG3 nei pazienti con CD e in quelli con DH per una cross-reattività del TCR verso TG2 e TG3.

Conclusioni I risultati ottenuti suggeriscono che nei pazienti con DH i linfociti T originati a livello intestinale possano cross-reagire con la Tg3 una volta raggiunta la cute e mediare il danno cutaneo. Tuttavia la risposta linfocitaria alla TG appare fenotipicamente diversa nella cute del paziente con DH rispetto a quella intestinale. Inoltre, l'aumento del TNF- α a livello cutaneo potrebbe anche svolgere un ruolo cruciale. Il monitoraggio dei pazienti a dieta priva di glutine sta continuando al fine di ottenere risultati a uno e due anni. Se tali dati preliminari saranno confermati dai nostri studi più ampi, il motivo per cui solo un gruppo di pazienti CD svilupperà DH sarà chiarito e dovrebbero essere proposti nuovi possibili trattamenti poiché la maggior parte dei pazienti con DH risponde molto lentamente a dieta priva di glutine.

Pubblicazioni derivanti dal Grant

Serum levels and tissue expression of interleukin-31 in dermatitis herpetiformis and bullous pemphigoid. Bonciani D, Quintarelli L, Del Bianco E, Bianchi B, Caproni M. *J Dermatol Sci.* 2017 Aug; 87(2):210-212. doi: 10.1016/j.jdermsci.2017.04.008.

Referenze

- [1] M. Caproni, E. Antiga, L. Melani, P. Fabbri, and Italian Group for Cutaneous Immunopathology, "Guidelines for the diagnosis and treatment of dermatitis herpetiformis," *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, vol. 23, no. 6, pp. 633–8, Jun. 2009.
- [2] A. Görög, K. Németh, K. Kolev, J. J. Zone, B. Mayer, P. Silló, P. Bognár, and S. Kárpáti, "Circulating Transglutaminase 3-Immunoglobulin A Immune Complexes in Dermatitis Herpetiformis," 2016.
- [3] D. Su, M. Shen, X. Li, and L. Sun, "Roles of $\gamma\delta$ T cells in the pathogenesis of autoimmune diseases," *Clin. Dev. Immunol.*, vol. 2013, p. 985753, 2013.
- [4] A. Zebrowska, M. Wagrowska-Danilewicz, M. Danilewicz, O. Stasikowska-Kanicka, A. Cynkier, A. Sysa-Jedrzejowska, and E. Waszczykowska, "IL-17 expression in dermatitis herpetiformis and bullous pemphigoid," *Mediators Inflamm.*, vol. 2013, p. 967987, 2013.

Final Report Investigator Grant biennale FC 016/2015 – Relazione Orale e Poster

R. Ciccocioppo, Dipartimento di Medicina, AOUI Policlinico G.B. Rossi & Università di Verona

Celiachia – Area: Infiammazione

Studio della composizione del microbiota intestinale nella malattia celiaca dell'adulto

Razionale Il presente studio si è proposto di indagare la composizione del microbiota intestinale in pazienti affetti dalle varie forme di malattia celiaca dell'adulto, potenziale, attiva, trattata e complicata, al fine di valutare se l'eventuale disbiosi preceda o consegua lo sviluppo di enteropatia e la capacità della dieta di ripristinare una normale composizione, nonché le differenze tra le varie condizioni e rispetto a soggetti di controllo. Il microbiota intestinale svolge importanti funzioni immunitarie, metaboliche, endocrine e

neuronal attraverso la produzione di fattori che modulano la permeabilità intestinale, lo strato di muco, la funzione delle cellule epiteliali, l'immunità innata e adattativa, la motilità intestinale e la neurotrasmissione. Precedenti studi hanno dimostrato alterazioni della composizione microbica nei celiaci adulti attivi e trattati, ma non nei complicati.

Metodi Lo studio è stato condotto su DNA isolato da campioni di saliva, mucosa intestinale e feci di pazienti affetti da malattia celiaca (n=54) e soggetti di controllo (n=32), utilizzando procedure di sequenziamento NGS di ampliconi ottenuti utilizzando come target le regioni ipervariabili V3-V4 della regione conservata del RNA ribosomiale 16S batterico. L'analisi dei dati è stata condotta con una pipeline allestita ad hoc per identificare i diversi livelli tassonomici e utilizzando come riferimento il database Greengenes ver 13_8. Sono stati calcolati gli indici di diversità alfa e beta e la ricchezza e Chao-1 che considera anche le specie rare e di Shannon che considera sia le OTU che la ricchezza e l'uniformità. Per le valutazioni statistiche è stato utilizzato il test Mann-Whitney per i confronti a coppie e il test R Kruskal-Wallis per i confronti a più gruppi. I valori di significatività ottenuti ($p < 0,05$) sono stati corretti utilizzando la procedura di Benjamini-Hochberg per il calcolo della prevalenza e per il confronto seriale tra i gruppi, con soglia di prevalenza del 20%.

Risultati e Conclusioni Il presente studio ha evidenziato una disbiosi a livello del batterioma dei pazienti affetti dalle varie forme di malattia celiaca dell'adulto, compresa la potenziale. Il tessuto mucosale è risultato il più idoneo a rilevare la disbiosi. Le differenze statisticamente significative sono state osservate tra celiaci non trattati e controlli e tra non trattati e trattati. È possibile che la mancanza di significatività negli altri gruppi sia legata alla numerosità campionaria. La differenza che sembra particolarmente interessante è l'alto livello di *Neisseria* trovato in tutti i celiaci rispetto ai controlli, sia nei campioni di saliva sia di mucosa, confermando dati precedenti acquisiti su una popolazione pediatrica. Inoltre, la concordanza tra i risultati ottenuti nei campioni di saliva con quelli ottenuti nei campioni di mucosa pone le basi per il possibile uso di un campionamento non invasivo per lo studio della relazione tra batteri patobionti e malattia celiaca.

Pubblicazioni derivanti dal Grant

1. Ciccocioppo R, et al. The Transcriptomic Analysis of Circulating Immune Cells in a Celiac Family Unveils Further Insights Into Disease Pathogenesis. *Front Med* 2018; 19; 5:182.
2. De Marchi G, et al. There Is No Association between Coeliac Disease and Autoimmune Pancreatitis. *Nutrients* 2018; 24: 10(9).
3. Panelli S., et al. Study of the microbiota composition in adulthood celiac disease. In preparation.
3. Panelli S, et al. Study of the microbiota composition in adult celiac disease. (Abstract) *Gut* 2017.

5. Biagi F, et al. Study of the microbiota composition in adult celiac disease. (Abstract) Proceedings of the 17th International Celiac Disease Symposium.
6. Biagi F, et al. Study of the microbiota composition in different forms of adult celiac disease. (Abstract) Internal & Emergency Medicine 2017.
7. Schiapatti A, et al. Composition of salivary, mucosal and faecal microbiota in adulthood celiac disease. (Abstract) Digestive & Liver Disease 2018.

Referenze

1. Wacklin P, et al. Altered duodenal microbiota composition in celiac disease patients suffering from persistent symptoms on a long-term gluten-free diet. *Am J Gastroenterol* 2014;109:1933–41.
2. McMurdie PJ, Holmes P. An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE* 2013;8(4):e61217.
3. D'Argenio V, et al. Metagenomics Reveals Dysbiosis and a Potentially Pathogenic *N. flavescentis* Strain in Duodenum of Adult Celiac Patients. *Am J Gastroenterol* 2016; 111: 879-90.
4. Liu G, et al. Non-pathogenic *Neisseria*: members of an abundant, multi-habitat, diverse genus. *Microbiology* 2015;161:1297–312.
5. Lagkouravdos I, et al. Rhea: a transparent and modular R pipeline for microbial profiling based on 16S rRNA gene amplicons. *PeerJ* 2017;5:e2836.

Progress Report Fellowship Grant triennale FC 003/2016 – Relazione Orale e Poster

M.C. Rossi, Dipartimento di medicina Sperimentale e Clinica, Università di Firenze

Dermatite Erpetiforme – Area: Immunologia

Caratterizzazione fenotipica e antigenica della risposta T specifica in pazienti celiaci affetti da dermatite erpetiforme

Background La dermatite erpetiforme (DH) è considerata la manifestazione cutanea della celiachia (CD). Entrambe le patologie infatti sono caratterizzate da uno stimolo specifico (il glutine), dalla presenza di un background genetico HLA-DQ2/DQ8 e dalla componente autoimmunitaria rappresentata dalla produzione di anticorpi contro la transglutaminasi tissutale (TG2). La TG2 è inoltre coinvolta nel meccanismo patogenetico che media il danno intestinale: essa infatti modifica i peptidi del glutine rendendoli particolarmente affini alla tasca di HLA-DQ2 o HLA-DQ8. Questo genera un'iper-attivazione della risposta T helper (prevalentemente di tipo 1, Th1) responsabile dell'infiammazione cronica della mucosa intestinale, del malassorbimento e dei numerosi sintomi secondari e malattie autoimmuni associate, tra cui anche la dermatite erpetiforme. Tuttavia resta ancora da chiarire perché solo un ristretto gruppo di pazienti celiaci sviluppi anche le manifestazioni cutanee[1].

Nel campo delle malattie immuno-mediate, oltre alle cellule Th1 hanno recentemente

assunto un ruolo sempre più preponderante le cellule Th17 caratterizzate peraltro da una spiccata tendenza a mutare il loro fenotipo in senso Th1 (Th17/Th1)[2]. Il coinvolgimento dei diversi sottotipi T helper nello sviluppo della dermatite erpetiforme è stato ipotizzato solo in pochi preliminari lavori [3], scopo del presente studio è pertanto di caratterizzare la risposta linfocitaria T in quei pazienti celiaci che manifestano la dermatite erpetiforme.

Metodologia Cellule mononucleate sono state isolate dal sangue periferico (PB), biopsia cutanea e biopsia gastro-duodenale di 6 pazienti celiaci affetti da dermatite erpetiforme (nuova diagnosi). Le poche cellule ricavate dai campioni biopsici e un'aliquota di quelle di sangue periferico sono state espresse in vitro caratterizzate, mediante citofluorimetria, sia per l'espressione di marcatori di membrana che per la loro capacità di produrre citochine specifiche di diversi sottotipi T helper. Lo stesso tipo di valutazione immunofenotipica è stata condotta sul sangue periferico, a fresco, allo scopo di eseguire un follow-up dei pazienti durante dieta agglutinata (GFD=gluten free diet).

Risultati I dati mostrano che la frequenza di cellule esprimenti i marcatori di membrana specifici di Th17 e Th17/Th1, è incrementata nelle linee derivate dalle cellule dell'intestino rispetto al PB, con una tendenza analoga per quelle ottenute dalle cellule cutanee. Si osserva inoltre un'aumentata frequenza di cellule producenti IFN γ nell'intestino, e di cellule producenti TNF α nelle linee della cute quando confrontate con quelle di sangue periferico. La produzione di TNF α risulta anche significativamente ridotta nei campioni di sangue periferico dopo un anno di dieta agglutinata.

Referenze

1. Bonciani D, Verdelli A, Bonciolini V, et al. Dermatitis herpetiformis: from the genetics to the development of skin lesions. *Clin Dev Immunol* 2012;2012:239691.
2. Annunziato F, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med.* 2007 Aug 6;204(8):1849-61. Epub 2007 Jul 16.
3. Antiga E, Quaglino P, Pierini I, et al. Regulatory T cells and T helper 17 cells in the pathogenesis of dermatitis herpetiformis. *J Invest Dermatol* 2012;132 (Supplement 2):S31.

Celiachia – Area: Biologia

Caratterizzazione delle microvescicole circolanti nel sangue periferico di pazienti affetti da celiachia come potenziale strumento diagnostico delle complicanze associate alla patologia

Background La celiachia è una enteropatia immuno-mediata, causata dall'instaurarsi di una sensibilità permanente al glutine. Le microvescicole (MV), rilasciate in risposta a stimoli di diversa natura, sono state rinvenute nel sangue periferico, dove sono state identificate MV di origine piastrinica, leucocitaria, endoteliale ed epiteliale. Le MV hanno un ruolo di fondamentale importanza in diverse condizioni patologiche e rappresentano un potenziale biomarcatore utile per monitorare la progressione della malattia o la risposta alle terapie (1). Nei nostri laboratori abbiamo dimostrato un aumento dei numeri delle MV di origine epiteliale e leucocitaria nel sangue periferico di pazienti celiaci, presumibilmente correlato rispettivamente all'alterazione dell'architettura dell'epitelio intestinale e all'infiammazione associata alla celiachia. Per questo motivo, abbiamo ipotizzato che queste alterazioni possano essere legate ad una variazione del contenuto delle MV (proteine, mRNA e miRNA), il che potrebbe correlarsi alla patogenesi delle complicazioni legate alla celiachia.

Metodologia Tutti i soggetti coinvolti nello studio sono stati arruolati dall'Unità Operativa di Endoscopia digestiva e Gastroenterologia del P.O. "SS. Annunziata" (Chieti) secondo specifici criteri di inclusione (anti-TG positivi e sottoposti a biopsia). Le MV circolanti sono state identificate su campioni di sangue intero non trattato, mediante un metodo di conta volumetrica delle MV in citofluorimetria (6-colori, FACSVerse, BD), per identificare ed enumerare sia l'intero compartimento di MV che le diverse sottopopolazioni (2). I dati sono espressi come media \pm deviazione standard (DS) e le differenze statistiche sono state valutate mediante T-test.

Risultati Ad oggi, abbiamo valutato 22 adulti celiaci alla diagnosi, 22 pazienti celiaci sotto dieta (GFD) e 22 controlli sani, sovrapponibili per genere ed età ai pazienti. Mediante specifici marcatori di membrana (CD31, CD45, CD41a, CD326) è stato possibile sub-tipizzare le MV circolanti secondo la rispettiva origine cellulare. Dall'analisi quantitativa è risultato un numero totale di MV circolanti nei pazienti celiaci di nuova diagnosi significativamente più alto di quello presente nei controlli. Dall'analisi delle sottopopolazioni è emerso che le MV EpCAM+ (origine epiteliale) e le MV CD41a+ (derivazione piastrinica) sono significativamente incrementate nei pazienti celiaci rispetto ai controlli sani, mentre non sono

state evidenziate differenze tra i pazienti sotto GFD e i controlli. In merito alle MV di origine leucocitaria (CD45+) si può notare un aumento significativo di queste in pazienti con malattia celiaca, indipendentemente dall'esposizione al glutine, rispetto ai controlli. Considerando complessivamente i pazienti celiaci risulta che la presenza di atrofia dei villi intestinali evidenziata dall'analisi istologica con una classificazione \geq B1 secondo la classificazione Corazza-Villanacci non è correlata alla conta totale delle MV circolanti. Le MV EpCAM+, invece, sono notevolmente più alte in presenza di atrofia; la conta delle MV EpCAM+ epiteliali è, inoltre, significativamente associata alla predizione delle concentrazioni dei linfociti intraepiteliali (IEL) in un modello a regressione lineare multipla che include le conte delle CD31+, le CD45+ e le CD41a+ (R2 linear= 0.496, $p=$ 0.022; Pearson's $r=$ 0.676).

Pubblicazioni derivanti dal Grant

1. Circulating microvesicles, a novel mechanism of endocrine cellular cross-talk, are increased in newly diagnosed Celiac Disease patients. Konstantinos Efthymakis, **Giuseppina Bologna**, Paola Lanuti, Caterina Pipino, Pasquale Simeone, Angelo Milano, Francesco Larterza, Antonella Bonitatibus, Assunta Pandolfi, Marco Marchisio, Sebastiano Miscia, Matteo Neri. Department of Medicine and Ageing Sciences and Center for Excellence on Ageing and Translational Medicine (CeSI-MeT), "G. D'Annunzio" University and Foundation, Chieti, Italy [submitted]

Referenze

1. György B. et al., Cell Mol Life Sci, 2011
2. Lanuti P. et al., J Immunol Methods. 2012

Celiachia – Area: Biologia

Sviluppo dell'atrofia dei villi nella malattia celiaca potenziale: ricerca di nuovi biomarcatori

Background e dati preliminari La malattia celiaca (CD) è una malattia autoimmune caratterizzata da un'infiammazione della mucosa intestinale dovuta alla risposta immunitaria verso i peptidi del grano che porta ad atrofia dei villi intestinali e anti-transglutaminasi tissutali e/o anti-endomisio nel siero in soggetti positivi per HLA-DQ2 e/o HLA-DQ8. I soggetti che mostrano positività agli anticorpi ma hanno una normale

architettura intestinale sono definiti "celiaci potenziali". Questi pazienti presentano negli enterociti delle cripte attivazione del signalling dell'EGFR-ERK e proliferazione. La regolazione dell'attivazione e dello spegnimento del signalling dell'EGFR-ERK è regolato dal complesso multivescicolare degli endosomi. Gli endosomi precoci possono riciclare in membrana le proteine ritardandone la degradazione oppure trasferirle al compartimento lisosomiale promuovendone la degradazione. Questo è il principale meccanismo di attenuazione del signaling dell'EGF, per cui le alterazioni del compartimento vescicolare si riflettono sulla sua regolazione

I peptidi di gliadina (per esempio: A-gliadina P57-68) inducono una risposta pro-infiammatoria Th1 adattativa. Altri peptidi di gliadina (per esempio: A-gliadina) inducono una risposta immunitaria innata che coinvolge IL-15 e IFN alfa.

P31-43 è in grado di indurre un ritardo del traffico vescicolare in una linea cellulare epiteliale.

Scopo di questo lavoro è quello di capire se nei pazienti celiaci e in quelli potenziali celiaci ci sono delle differenze nel trafficking cellulare, in particolare analizzando la localizzazione dell'EGFR che è responsabile della proliferazione degli enterociti e dell'attivazione del signalling EGFR-ERK

Metodologia Biopsie ottenute da soggetti di controllo, CD nella fase acuta della malattia, pazienti CD a dieta senza glutine, pazienti definiti potenziali suddivisi in: quelli rimasti tali perché istologicamente normali almeno 4 anni dopo le prime biopsie e quelli che diventano CD in due o tre anni (CD pot/atr) a dieta contenente glutine.

Risultati Nei pazienti celiaci e in quelli potenziali celiaci ci sono alterazioni del traffico vescicolare. Analisi di colocalizzazione tra EGFR e le varie proteine dei diversi compartimenti vescicolari mostrano una differenza dei livelli dell'EGFR.

Nei pazienti in fase attiva di malattia e in quelli potenziali i livelli di EGFR risultano essere aumentati in maniera significativa negli endosomi precoci, pertanto la proteina viene degradata più lentamente e vi è un aumento dell'attività del signalling dell'EGFR nel tempo, mentre nei pazienti controllo e nei pazienti che restano potenziali nel tempo i livelli di EGFR risultano aumentati nel compartimento lisosomiale, pertanto la proteina viene degradata mantenendo il suo fisiologico turnover e attenuando il signalling dell'EGFR-ERK. Le alterazioni del sistema endocitico, presenti nella mucosa dei pazienti celiaci a vari stadi della malattia (fase acuta, in remissione e potenziale), sono costitutive e ca-

ratterizzate da un ritardo nel traffico di endosomi da precoci a tardivi. Queste alterazioni precedono il danno alla mucosa.

I pazienti celiaci e quelli potenziali che diventeranno atrofici mostrano un'alterazione della localizzazione delle vescicole lisosomiali presenti all'apice delle cellule epiteliali nelle cripte che risulta essere importante e specifica dello sviluppo della malattia celiaca. Pertanto, la presenza di alterazioni del sistema vescicolare potrebbe essere usata come un biomarcatore predittivo dello sviluppo dell'atrofia dei villi nei bambini potenziali celiaci.

Pubblicazioni derivanti dal Grant

Constitutive alterations of vesicular trafficking predispose to innate immune response to gliadin in Celiac Disease. *Communications Biology, In press*

Progress Report Fellowship Grant triennale FC 007/2016 – Relazione Orale e Poster

F. Ricci, Università degli Studi di Firenze

Celiachia – Area: Immunologia

Caratterizzazione funzionale del microbiota intestinale e della risposta immune associata, in pazienti affetti da "Celiachia Potenziale"

Introduzione Più dati indicano coinvolto il microbiota intestinale nello sviluppo della malattia celiaca (CD) ma non è chiaro se un'alterata flora batterica possa essere causa o conseguenza della patologia e, inoltre, la composizione del microbiota e la risposta immune associata nello stato preclinico, definito celiachia potenziale (PCD), rimangono inesplorate.

Lo studio propone di far luce sulle relazioni mutualistiche tra microbiota intestinale e risposta immune associata nella CD e PCD e sul loro ruolo nello sviluppo dello stato patologico.

Metodologia Le analisi hanno riguardato la risposta immunitaria T intra-tissutale in pazienti con CD e PCD e sono state condotte su campioni bioptici endoscopici. Le biopsie sono state dissociate con gentle MACS Dissociator e tramite CD3 microbeads, sono stati isolati i linfociti T intraepiteliali, clonati in seguito con tecnica della diluizione limite. I cloni T ottenuti (Tcc) sono stati funzionalmente caratterizzati tramite citofluorimetria (anticorpi

anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8) e il dosaggio, attraverso tecnologia Luminex, di IFN- γ , IL-4, IL-17, IL-22 e IL-10.

Risultati I Tcc ottenuti sono stati: 160 (77% CD4⁺, 21% CD8⁺, 2% CD4⁻ CD8⁻) dai pazienti CD, 83 (77% CD4⁺, 22% CD8⁺, 1% CD4⁻ CD8⁻) dai pazienti PCD. Per 64 Tcc (31 cloni CD, 33 cloni PCD) sono state dosate le citochine.

Per quanto riguarda la popolazione CD4⁺: nei pazienti con CD, l'80% dei Tcc produceva IFN- γ in combinazione con IL-17 (8%, Th1/Th17), IL-22 (8%, Th1/Th22), IL-4 (28%, Th0), IL-4 + IL-17 (16%, Th0/Th17), IL-4 + IL-22 (20%, Th0/Th22). Inoltre l'8% dei CD4⁺ Tcc produceva soltanto IL-4 (Th2), il 4% soltanto IL-22 (Th22) e l'8% dei cloni mostrava fenotipo Treg (IL-10). Nei pazienti con PCD, una percentuale simile (78%) dei Tcc produceva IFN- γ , da solo (17%, Th1), o con: IL-4 (22% Th0), IL-4 + IL-17 (9%, Th0/Th17), IL-4 + IL-22 (4%, Th0/Th22), IL-17 (17%, Th1/Th17), IL-22 (9% Th1/Th22). Nei pazienti con PCD non sono stati isolati cloni Th2 e Th22 mentre è stata isolata una percentuale cospicua di Treg (22%).

Altresì, nei pazienti con CD, il 67% dei CD8⁺ Tcc produceva IFN- γ da solo (50%, Tc1) o in combinazione con IL-22 (17%, Tc1/Tc22). Inoltre, il 17% dei cloni mostrava fenotipo Tc2 e il 17% produceva IL-22 da sola (Tc22); nessun clone CD8⁺ produceva IL-17. Nei pazienti con PCD, l'80% dei CD8⁺ Tcc produceva IFN- γ da solo (70%, Tc1) o in combinazione con IL-17 (10%, Tc1/Tc17); il 10% dei Tcc produceva IL-17 (Th17) ed il 10% IL-22 (Th22).

Tali risultati evidenziano nei gruppi una simile prevalenza della componente cellulare produttrice IFN- γ e IL-17 ma differenze importanti a riguardo di IL-4 ed IL-10. I linfociti T produttori IL-4, coinvolta nell'assottigliamento della mucosa intestinale e nell'atrofia dei villi, si riscontrano in percentuale molto minore nei pazienti con PCD mentre linfociti produttori IL-10 si osservano in percentuale elevata. Rilevare poca produzione di IL-4 nella PCD potrebbe essere la chiave del perché in questi pazienti, nonostante la predisposizione genetica e gli auto-anticorpi, non si ha danno tissutale. Inoltre, l'elevata percentuale dei Treg potrebbe essere coinvolta nella attenuazione della risposta immunitaria, compresa la componente produttrice IL-4.

Celiachia – Area: Immunologia

Analisi della risposta immunitaria al glutine, mediata dai linfociti T, nelle differenti fasi della malattia celiaca

Background e dati preliminari La celiachia è una patologia immuno-mediata caratterizzata da un'enteropatia dell'intestino tenue che, in soggetti geneticamente predisposti (HLA DQ2/DQ8), comporta una intolleranza permanente al glutine. La presentazione clinica della celiaca può variare notevolmente e tra le forme più frequenti ritroviamo la forma acuta e quella potenziale. La prima si manifesta con positività ai marcatori sierologici (autoanticorpi anti-transglutaminasi) e mucosa intestinale danneggiata (atrofia dei villi). La condizione potenziale è invece caratterizzata dalla presenza di autoanticorpi nel siero e, al contrario, da una mucosa intestinale normale dal punto di vista morfologico. Mentre nell'intestino dei celiaci conclamati è ben nota la cascata di eventi infiammatori innescata dal glutine che culminano nella tipica lesione intestinale, in quello dei celiaci potenziali è ancora da chiarire in che modo coesistano meccanismi di infiammazione (attivazione linfociti Th1) e di regolazione (alta espressione di IL-10 ed aumentata densità di cellule T regolatorie). Inoltre pochi e controversi studi sono stati condotti sul ruolo dei linfociti Th2 e Th17 nella malattia celiaca.

Il progetto di ricerca mira a identificare nuovi biomarcatori associati alle fasi precoci di danno alla mucosa e/o predittivi dello sviluppo della lesione intestinale, analizzando le varie sottopopolazioni di linfociti T (Th1, Th2, Th17, Tr1, Tr2 e Treg FoxP3⁺), a livello della mucosa intestinale di pazienti pediatrici affetti da celiachia conclamata e potenziale.

Dati preliminari del mio gruppo di ricerca, su linee T gliadina-specifiche, hanno riportato la presenza di un infiltrato nell'epitelio intestinale di linfociti TCR $\gamma\delta$ ed una ridotta percentuale di cellule T che producono IL-4, nella mucosa atrofica di soggetti celiaci conclamati.

Metodologia Allo scopo di identificare nuovi biomarcatori dei diversi stati di infiammazione della mucosa celiaca, le cellule intestinali sono state caratterizzate sia per il fenotipo di superficie (CD3, CD4, CD8, TCR $\gamma\delta$, TCR $\alpha\beta$, CD25, LAG3, CD49b, CD127, FoxP3) appena isolate dalla biopsia digiunale, che dopo stimolazione policlonale con PMA/Ionomicina per la produzione di citochine (IL-21, IL-17, IL-4, INF- γ). Le analisi del profilo fenotipico e della produzione di citochine intracellulari sono state eseguite mediante citofluorimetria a flusso multiparametrica (citofluorimetro BD LSR II).

Risultati Un aumento significativo dei linfociti T TCR $\gamma\delta+$ è stato osservato nella mucosa atrofica rispetto alla mucosa normale del gruppo dei celiaci potenziali e dei controlli (soggetti pediatrici non celiaci). Inoltre, una bassa frequenza di cellule T CD4+ che producono IL-4, e co-producono o meno INF- γ è stata riscontrata nella mucosa danneggiata dei celiaci conclamati. È stato anche possibile misurare una percentuale di linfociti CD4+ che producono IL-17 più alta nei pazienti potenziali rispetto ai celiaci acuti. La scarsa presenza dei linfociti T che producono IL-4 nella mucosa atrofica suggerisce che tali cellule possano avere un'azione protettiva verso lo sviluppo della lesione intestinale. Le cellule linfocitarie IL-4+ e TCR $\gamma\delta+$ potrebbero quindi essere nuovi biomarcatori utili alla caratterizzazione delle differenti fasi della malattia celiaca.

Le analisi citofluorimetriche relative allo studio delle cellule T regolatorie Tr1 (LAG3+ CD49b+) e Treg FoxP3+ (CD25+ CD127low FoxP3+), sui pazienti celiaci acuti e potenziali, sono ancora preliminari e per questo non riportate nei risultati.

Pubblicazioni derivanti dal Grant

Manoscritto in preparazione: "Densities of IL-4+ T cells and TCR $\gamma\delta+$ T cells in the intestinal mucosa are discriminant biomarkers between potential and overt celiac disease."

Referenze

1. C. Gianfrani et al. Gliadin-specific type 1 regulatory T cells from the intestinal mucosa of treated celiac patients inhibit pathogenic T cells. *J Immunol* 2006; 177(6): 4178-4186.
2. M. Borrelli et al. Immunoregulatory pathways are active in the small intestinal mucosa of patients with potential celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 2013; 108:1775-84.
3. Borrelli M, Gianfrani C, Lania G, et al. In the Intestinal Mucosa of Children With Potential Celiac Disease IL-21 and IL-17A are Less Expressed than in the Active Disease. *Am J Gastroenterol.* 2016; 111:134-44.
4. Hall RP, Smith AD, Streilein RD. et al. Increased production of IL-4 by gut T-cell lines from patients with dermatitis herpetiformis compared to patients with isolated gluten-sensitive enteropathy. *Dig Dis Sci.* 2000. 45(10):2036-43.
5. Steenholt JV, Nielsen C, Baudewijn L. The composition of T cell subtypes in duodenal biopsies are altered in coeliac disease patients. *PLoS One* 2017. 12(2):e0170270. doi: 10.1371/journal.pone.0170270.