

Workshop **AiC** Ricerca Scientifica



23 maggio 2025 Hilton Garden Inn Milan North **Milano**
e in **Modalità Streaming**

Abstract
Relazioni orali e Poster

Prefazione

Il Workshop AIC Ricerca Scientifica è l'evento AIC dedicato alla presentazione dei progetti scientifici finanziati, mediante i Bandi nazionali AIC per la Ricerca, con il 5 per mille dei contribuenti che AIC destina ogni anno alla ricerca scientifica.

L'evento scientifico, che si aggiunge alle altre iniziative scientifiche organizzate da AIC (il Convegno Scientifico annuale e la Tavola Rotonda dei Referenti Scientifici) torna dopo il periodo di sospensione, dal 2020 a causa dalla pandemia.

Il Workshop AIC Ricerca Scientifica ha l'obiettivo di:

- riunire sotto l'egida di AIC la comunità scientifica che in Italia porta avanti una ricerca scientifica di livello internazionale e di elevata qualità, valutata dai Revisori Internazionali con il sistema Peer Review
- aggiornare la rete medico-scientifica e sanitaria che si occupa quotidianamente di celiachia in Italia sulle novità e i risultati prodotti dagli studi.

Per approfondire:

il portale AIC sulle attività finanziate ogni anno con il 5 per mille:

<https://5x1000.celiachia.it/>

il sito AIC dei Bandi per il finanziamento della Ricerca e la presentazione di tutti i Progetti finanziati fino ad oggi:

<https://www.celiachia.it/ricerca/bandi-aic-di-ricerca/>

<https://www.celiachia.it/ricerca/aic-call/>

il portale AIC degli eventi scientifici con i Programmi e il Materiale scaricabile:

<https://convegnoscientificoaic.celiachia.it/>

10:00-11:00 Registrazione dei Partecipanti

11:00-11:10 Introduzione ai lavori
Rossella Valmarana

Sessione I

Moderatore: **Gino Roberto Corazza**

11:15-11:35 Introduzione del Moderatore
Investigator Grant 001/2020
Laura Pisapia

11:35-11:55 Investigator Grant 002/2020
Carmela Gianfrani

11:55-12:15 Investigator Grant 003/2020
Elena Spinelli

12:15-12:45 Discussione Plenaria Sessione I

12:45-13:00 Presentazione dei progetti presentati nella Sessione Poster

13:00 -15:00 Buffet lunch e Poster Session

Sessione II

Moderatore: **Gino Roberto Corazza**

15:00-15:20 Fellowship Grant 002/2019
Antonella Marano

15:20-15:40 Fellowship Grant 004/2019
Patrizia Restani

15:40-16:00 Fellowship Grant 006/2019
Giovanna Del Pozzo

16:00-16:20 Fellowship Grant 007/2016
Antonino Calabrò

16:20-16:50 Discussione Plenaria Sessione II

16:50-17:00 Conclusione e chiusura Lavori

Prefazione	2
programma scientifico	3

Abstract Relazioni Orali

Investigator Grant 001/2020 - Laura Pisapia CD84/ SLAMF5: emergente bio-marcatore di malattia celiaca	5
---	---

Investigator Grant 002/2020 - Carmela Gianfrani L'interleuchina-4 modula l'infiammazione indotta dal glutine nella mucosa intestinale dei pazienti con celiachia potenziale	7
---	---

Investigator Grant 003/2020 - Elena Spinelli (per il PI Luigina De Leo) Modifiche epigenetiche dell'epitelio intestinale alterano la via di processazione e presentazione dell'antigene nella celiachia	9
---	---

Fellowship Grant 002/2019 - Antonella Marano Caratterizzazione dei linfociti intraepiteliali TcR $\gamma\delta$ nella progressione della malattia celiaca	11
---	----

Fellowship Grant 004/2019 - Patrizia Restani (tutor del PI Francesca Colombo) Valutazione degli effetti salutistici di cereali pigmentati nella dieta senza glutine: modulazione dello stato infiammatorio associato alla patologia celiaca	13
---	----

Fellowship Grant 006/2019 - Giovanna Del Pozzo (Tutor del PI Maria Vittoria Laezza) Espressione dei geni HLA-DQ2.5 nei pazienti affetti da malattia celiaca	15
---	----

Fellowship Grant 007/2016 - Antonino Calabrò (Tutor del PI Federica Ricci) Caratterizzazione funzionale del microbiota intestinale e risposta immunitaria associata in pazienti con malattia celiaca atrofica e potenziale	17
--	----

Abstract dei Poster

Poster del Grant AIC Fellowship 005_2016 - Monia Porpora L'infiammazione negli organoidi CD è costitutiva ed è più sensibile agli stimoli pro-infiammatori	19
--	----

Poster del Grant AIC Fellowship 009_2016 - Serena Vitale Analisi della risposta immunitaria indotta dal glutine nelle differenti forme di celiachia	20
---	----

Poster del Grant AIC Fellowship 007_2017 - Donatella Cielo Effetto dei long non-coding RNA sullo sviluppo della malattia celiaca	22
--	----

Poster del Grant AIC Fellowship 014_2017 - Vera Rotondi Aufiero Funzione immunomodulatoria dei linfociti intraepiteliali $\gamma\delta$ nella malattia celiaca	24
--	----

Poster del Grant AIC Fellowship 006_2018 - Lucia Treppiccione Inibizione delle proprietà immunogeniche e citotossiche della gliadina mediante transamidazione enzimatica	27
--	----

Poster del Grant AIC Fellowship 008/2018 - Giorgia Renga Candida albicans in celiachia: colpevole o innocente?	29
--	----

Poster del Grant AIC Fellowship 011_2018 - Viviana Izzo Aderenza alla dieta senza glutine, sviluppo di una nuova metodica di laboratorio per il monitoraggio delle urine	30
--	----

Investigator Grant 001/2020 - **Laura Pisapia**

CD84/ SLAMF5: emergente bio-marcatore di malattia celiaca

Giovanna Del Pozzo¹, Sossio Federico Capone¹, Ilaria Mottola², Alessia Gaeta¹, Carmenà Gianfrani², Antonio Rispo³, Laura Pisapia¹.

1. Istituto di Genetica e Biofisica- Adriano Buzzati Traverso, CNR, Napoli

2. Istituto di Istuto di Biochimica e Biologia Cellulare, CNR, Napoli

3. Dipartimento di Gastroenterologia, Università degli Studi di Napoli-Federico II

Introduzione e scenario

Sebbene il glutine e la predisposizione genetica siano elementi chiave nella malattia celiaca, molte domande restano insolte riguardo i meccanismi che portano all'insorgenza della patologia e riguardo la valutazione clinica del rischio di ammalarsi. Studi di associazione genica continuano ad identificare nuovi biomarcatori associati alla celiaca ed in tale contesto si inserisce il nostro studio (1,2).

Abbiamo investigato il ruolo della proteina CD84/SLAMF5 quale biomarcatore nella patogenesi della celiachia. CD84 è un membro della famiglia SLAM/CD2, recettori trans-membrana coinvolti in numerosi processi immunologici, come lo sviluppo, attivazione e acquisizione di funzioni effettrici da parte delle cellule coinvolte nella tolleranza immunitaria agli antigeni (3,4,5). Il nostro obiettivo è stato produrre evidenze sperimentali che associno l'espressione di CD84 all'instaurarsi dello stato patologico, alla classificazione del rischio di ammalarsi e alla valutazione della progressione della malattia.

Risultati

Abbiamo arruolato 74 soggetti suddivisi in tre coorti: 26 pazienti con celiachia attiva (CD), 35 in remissione a dieta aglutinata (GFD), tutti con genotipo HLA DQ2/DQ8, e 13 soggetti sani (CTRL).

Per dimostrare il coinvolgimento della molecola CD84 nella malattia celiaca, abbiamo perseguito due obiettivi principali:

- valutazione dell'espressione di CD84/SLAMF5 in PBMC
 - analisi della funzione di CD84/SLAMF5 nel processo di presentazione dell'antigene.
- L'analisi fenotipica, condotta mediante citometria a flusso, ha evidenziato un'espressione più elevata del CD84 nelle PBMC di pazienti con malattia attiva (4515 ± 343 MFI) rispetto a quelli in GFD (2916 ± 174 MFI) e ai soggetti sani (583 ± 150 MFI). L'

espressione del CD84 è risultata elevata nei monociti, cellule dendritiche e linfociti B. In un sottogruppo di pazienti è stata eseguita un'analisi longitudinale dell'espressione di CD84, confrontando la fase attiva della patologia con la fase di remissione. I dati hanno mostrato una riduzione del CD84 nella fase di remissione (3584 ± 944 MFI in fase attiva vs 2164 ± 637 MFI in remissione), confermando la correlazione tra CD84 e lo stato di attività clinica della malattia.

Infine, esperimenti funzionali di presentazione dell'antigene sono stati condotti valutando l'attivazione delle cellule T CD4⁺ specifiche per la gliadina, in presenza e assenza di un anticorpo neutralizzante il CD84. La neutralizzazione della molecola ha comportato una riduzione significativa dell'attivazione delle cellule T, misurata sia tramite la produzione di IFN- γ sia mediante l'espressione del marcatore di attivazione CD25, con una riduzione superiore al 50% per entrambi i parametri, evidenziando il ruolo diretto e funzionale del CD84 nei meccanismi di presentazione dell'antigene.

Conclusioni e prospettive

I nostri risultati indicano che il CD84 può essere incluso tra i marcatori con potenziale valore predittivo per la progressione e le fasi cliniche della malattia celiaca. L'espressione della molecola correla con lo stato clinico del paziente, e il suo coinvolgimento funzionale nella presentazione dell'antigene fornisce nuove prospettive per comprenderne il ruolo nella patogenesi. Una maggiore comprensione del suo coinvolgimento potrebbe migliorare il monitoraggio terapeutico, supportare la gestione clinica dei pazienti e guidare l'identificazione di transizioni verso fasi diverse della patologia, in modo non invasivo. Infine, CD84 rappresenta un potenziale bersaglio per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche.

Bibliografia

1. Trynka G, Hunt KA, Bockett NA, et al. Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease. *Nat Genet* 2011;43:1193–201.
2. Dubois PCA, Trynka G, Franke L, et al. Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nat Genet* 2010;42:295–302.
3. Dragovich MA, Mor A. The SLAM family receptors: Potential therapeutic targets for inflammatory and autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.* 2018;17:674–82.
4. Cuenca M, Sintès J, Lányi Á, Engel P. CD84 cell surface signaling molecule: An emerging biomarker and target for cancer and autoimmune disorders. *Clin. Immunol.* 2019;204:43–9.
5. Cannons JL, Qi H, Lu KT, et al. Optimal Germinal Center Responses Require a Multistage T Cell:B Cell Adhesion Process Involving Integrins, SLAM-Associated Protein, and CD84. *Immunity* 2010;32:253–65.

L'interleuchina-4 modula l'infiammazione indotta dal glutine nella mucosa intestinale dei pazienti con celiachia potenziale

Ilaria Mottola¹, Serena Vitale¹, Roberta Esposito¹, Mariantonia Maglio², Riccardo Troncone^{1,2}, Renata Auricchio², Carmen Gianfrani¹

¹Institute of Biochemistry and Cell Biology, CNR, Via Pietro Castellino, 111, Naples, 80131, Italy.

²Department of Translational Medical Science, Section of Pediatrics, University Federico II, and European Laboratory for the Investigation of Food Induced Diseases (ELFID), University Federico II, via S. Pansini 5, 80131 Naples, Italy.

Molte sono le manifestazioni cliniche della celiaca, e tra le forme più frequenti, soprattutto in età pediatrica, ritroviamo la celiachia acuta e quella potenziale. Mentre la celiachia acuta si manifesta con una marcata positività ai marcatori sierologici (autoanticorpi anti-transglutaminasi e anti-endomisio) e danno alla mucosa intestinale (con atrofia dei villi), quella potenziale è caratterizzata dalla presenza di autoanticorpi sierici ma una mucosa intestinale morfologicamente normale (1). Sebbene nella malattia celiaca acuta siano stati studiati ampiamente sia i linfociti T reattivi al glutine che i mediatori molecolari dell'infiammazione, restano ancora da chiarire i meccanismi coinvolti nella progressione dalla fase potenziale a quella acuta. Si ipotizza che, nella mucosa intestinale dei soggetti con celiachia potenziale, vi sia un equilibrio tra i meccanismi infiammatori e quelli anti-infiammatori che mediano la tolleranza verso le proteine del glutine nei soggetti sani. La rottura di tale equilibrio potrebbe essere responsabile dell'evoluzione del danno intestinale e del passaggio dalla fase potenziale a quella acuta. Risultati recenti del nostro gruppo di ricerca hanno evidenziato un'elevata infiltrazione dei linfociti T, che esprimono il recettore TCR $\gamma\delta$, nella mucosa intestinale dei pazienti con celiachia acuta. Invece, un'elevata presenza di linfociti T che rilasciano l'interleuchina-4 (IL4) è stata osservata nella mucosa intestinale dei pazienti potenziali, suggerendo un coinvolgimento di queste due popolazioni linfocitarie nella progressione verso l'atrofia della mucosa intestinale (2,3). Poiché questi risultati suggeriscono un effetto protettivo dell'IL-4 nell'evoluzione del danno mucosale, nel presente progetto finanziato da AIC (Grant IG 002_2020) abbiamo approfondito il ruolo anti-infiammatorio dell'IL4 nei soggetti pediatrici con celiachia.

A tale scopo, sono state generate da campioni di biopsie intestinali di soggetti pediatrici (10 celiaci acuti e 10 potenziali) le linee cellulari di linfociti in grado di riconoscere la gliadina e i suoi peptidi più attivi, utilizzando l'IL4 come fattore di cre-

scita. Attraverso varie tecnologie sperimentali, quali i dosaggi immunoenzimatici delle citochine e la citofluorimetria a flusso multiparametrica, abbiamo valutato se l'utilizzo dell'IL4 riuscisse a modulare i marcatori infiammatori con un ruolo chiave nella malattia celiaca, quali l'interferone- γ e l'espansione dei linfociti $\gamma\delta$.

Abbiamo osservato che l'IL4 aggiunta come fattore di crescita riduce in maniera significativa la produzione dell'interferone- γ nei terreni di coltura dei linfociti intestinali. La riduzione si è osservata sia nei pazienti con celiachia acuta che potenziale. Al contrario, i livelli dell'interleuchina-10, principale citochina con azione antinfiammatoria, sono risultati aumentati nei terreni di coltura trattati con IL4 rispetto alle colture cellulari non trattate.

Quando invece abbiamo osservato la produzione dell'interferone- γ in risposta alla gliadina e ai suoi peptidi più tossici, solo le linee cellulari generate da soggetti con celiachia potenziale e coltivate in presenza di IL4 hanno mostrato una significativa diminuzione della produzione di tale citochina infiammatoria. Inoltre, è stato anche osservato una diminuzione dei linfociti citotossici e dei linfociti $\gamma\delta$ intraepiteliali.

Sulla base dei risultati ottenuti possiamo affermare che l'IL4 mostra una funzione regolatoria sull'infiammazione intestinale scatenata dall'ingestione di glutine. Ulteriori studi sono necessari per capire il ruolo protettivo dell'IL4 nella prevenzione dell'atrofia dei villi intestinali negli individui con celiaca potenziale, o in coloro geneticamente predisposti alla celiachia.

Bibliografia

Auricchio R, Mandile R, Del Vecchio MR, Scapaticci S, Galatola M, Maglio M, Discepolo V, Miele E, Cielo D, Troncone R, Greco L. Progression of Celiac Disease in Children With Antibodies Against Tissue Transglutaminase and Normal Duodenal Architecture. *Gastroenterology*. 2019 Aug;157(2):413-420.e3. doi: 10.1053/j.gastro.2019.04.004. Epub 2019 Apr 9. PMID: 30978358.

Vitale S, Maglio M, Picascia S, Mottola I, Miele E, Troncone R, Auricchio R, Gianfrani C. Intestinal Cellular Biomarkers of Mucosal Lesion Progression in Pediatric Celiac Disease. *Pharmaceutics*. 2021, Nov 20;13(11):1971. doi: 10.3390/pharmaceutics13111971.

Vitale S, Santarasci V, Camarca A, Picascia S, Di Pasquale A, Maglio M, Maggi E, Cosmi L, Annunziato F, Troncone R, Auricchio R, Gianfrani C. The intestinal expansion of TCR $\gamma\delta$ + and disappearance of IL4+ T cells suggest their involvement in the evolution from potential to overt celiac disease. *Eur J Immunol*. 2019 Sep 25. doi: 10.1002/eji.201948098.

Modifiche epigenetiche dell'epitelio intestinale alterano la via di processazione e presentazione dell'antigene nella celiachia

Elena Spinelli¹, Fabiana Ziberna¹, Giorgia Fontana¹, Giuseppe Molinaro¹, Matteo Bramuzzo¹, Grazia Di Leo¹, Sara Lega¹, Vincenzo Villanacci², Adamo Pio D'Adamo¹, Tarcisio Not¹, Luigina De Leo¹
I.R.C.C.S Materno-Infantile Burlo Garofolo, Trieste
Istituto di Patologia Spedali Civili, Brescia

Obiettivi e Studio

Predisposizione genetica, glutine e fattori ambientali contribuiscono alla patogenesi della celiachia (Lancet 2018;391:70–81). I fattori ambientali non sono ancora ben definiti. Le cellule epiteliali intestinali costituiscono una barriera fondamentale tra l'organismo e l'ambiente e rappresentano il tipo cellulare rilevante in cui identificare i cambiamenti epigenetici coinvolti nella patogenesi della celiachia. Gli obiettivi sono:

1. Identificazione di vie di segnalazione alterate a livello epigenetico e trascrizionale nelle cellule epiteliali intestinali di pazienti con celiachia classica e potenziale, prima e dopo il trattamento;
2. Generazione di organoidi epiteliali intestinali da pazienti con celiachia classica e da controlli e valutazione della loro interazione con il peptide tossico di gliadina p31-43.

Metodi

In questo studio sono stati arruolati 181 pazienti: 96 celiaci alla diagnosi (77 celiaci classici, 19 celiaci potenziali), 20 celiaci in dieta senza glutine e 65 controlli. Le cellule epiteliali intestinali, purificate da campioni biotici (PLoS One 2013;8:e55636) di pazienti celiaci (alla diagnosi e in trattamento) e di soggetti di controllo affetti da altre patologie infiammatorie gastrointestinali, sono state utilizzate per eseguire analisi di metilazione del DNA e di trascrittomiche. Gli organoidi epiteliali intestinali (Gastroenterology 2011;141:1762–1772) ottenuti dai pazienti celiaci (n=5) e dai soggetti di controllo (n=5) sono stati incubati con il peptide tossico della gliadina p31-43 fluorescente (LGQQQPFPPQQPY) o con una forma scramble del p31-43 fluorescente (YQPLFQPQGPQPQ). L'interazione è stata valutata con la microscopia confocale.

Risultati

1. Confrontando i pazienti con celiachia classica, potenziale e in dieta priva di glutine rispetto ai controlli:
 - i geni differenzialmente metilati sono stati ordinati in base al p-value (dal più significativo al meno significativo) e i primi 9 (HLA-DMA, HLA-E, PSMB8, PSMB9, TAP1, TAP2, HLA-DOA, HLA-DPB1, TAPB) sono risultati gli stessi in ciascun confronto;
 - i 9 geni condivisi sono coinvolti nella via di processazione e presentazione dell'antigene e risultano ipometilati/sovraespressi in tutti i pazienti celiaci rispetto ai controlli.
2. Lo studio dell'interazione del peptide p31-43 con gli organoidi epiteliali intestinali derivati da pazienti celiaci e soggetti di controllo ha mostrato:
 - presenza di segnale fluorescente solo negli organoidi incubati con p31-43 e non con la sua versione scramble;
 - il segnale fluorescente del peptide p31-43 sembra più intenso negli organoidi di soggetti con celiachia.

Conclusioni

La via di processazione e presentazione dell'antigene è attivata in modo costitutivo nell'epitelio intestinale di tutti i pazienti celiaci rispetto ai controlli, suggerendo che nella celiachia grandi quantità di peptidi vengano trasportati nel reticolo endoplasmatico, caricati sulle molecole MHC di classe I e trasportati sulla superficie cellulare per attivare le cellule T. L'interazione del peptide p31-43 con gli organoidi epiteliali intestinali è sequenza-specifica suggerendo la presenza di un recettore che media l'interazione. Gli organoidi derivati da pazienti con celiachia sembrano mostrare una maggior affinità con il peptide p31-43.

Fellowship Grant 002/2019 - **Antonella Marano**

Caratterizzazione dei linfociti intraepiteliali TcRγδ nella progressione della malattia celiaca

Antonella Marano¹, Mariantonia Maglio², Roberta Mandile¹, Renata Auricchio^{1,2}, Luigi Greco^{1,2}, Valentina Discepolo^{1,2}, Riccardo Troncone^{1,2}

1. Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali (DISMET), Sezione Pediatria, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli, Italia
2. Laboratorio Europeo per lo Studio delle Malattie Indotte da Alimenti (ELFID), Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli, Italia

Introduzione e scenario

La celiachia (CD) è una malattia autoimmune tipicamente associata ad una enteropatia del piccolo intestino caratterizzata dall'atrofia dei villi intestinali (VA) e da un aumento di linfociti intraepiteliali (IELs), sia TcRaβ+CD8+ che TcRγδ+Vd1+. I pazienti con celiachia potenziale (PCD) presentano una sierologia positiva ma una mucosa normale (Marsh0) o caratterizzata dal solo incremento dei IELs (Marsh1). I PCD possono sviluppare o meno nel tempo VA, ma quali eventi patogenetici ne guidino la progressione non è noto.

In questo studio, ci siamo proposti di indagare:

1. le caratteristiche immunologiche della mucosa duodenale di PCD, con particolare attenzione alle differenze tra Marsh0 e Marsh1, allo scopo di identificare marcatori predittivi di sviluppo di VA nei PCD e di meglio comprendere la storia naturale della CD;
2. il fenotipo natural-killer (NK) e la funzione dei IELs TcRaβ+CD8+ e TcRγδ+Vd1+ nelle varie fasi della malattia, per comprendere il ruolo di queste cellule nella patogenesi della CD.

Risultati

In tutti i PCD, sia Marsh0 che Marsh1, abbiamo riscontrato un incremento della profondità e della proliferazione delle cripte; inoltre abbiamo osservato un aumento rispetto ai CTR del numero di IELs TcRγδ+ già nei Marsh0-PCD, sebbene ad un livello inferiore rispetto ai Marsh1-PCD. Al contrario, solo i Marsh1-PCD mostravano un incremento di CD3+ e Perforina+ IELs. Non abbiamo invece osservato un incremento dei IELs NKG2D+ nei PCD, in linea con l'assenza di VA in questi pazienti. Nella lamina propria tutti i PCD alla diagnosi mostravano la presenza di depositi mucosali di anticorpi anti-TG2, un incremento di cellule CD25+, IL-15+, ma non di IL-21+, mediante immunoistochimica.

Lo studio longitudinale dei PCD in follow-up ha rivelato che i PCD che evolvono verso VA mostravano alla diagnosi un aumento di IELs CD3+, TcRγδ+ e Perforina+ rispetto a quelli che rimanevano PCD, che invece mostravano una riduzione dell'espressione epiteliale di IL-15 nel tempo.

La caratterizzazione citofluorimetrica dei IELs TcRaβ+CD8+ ha rivelato che non tutti gli ACD mostravano una downregolazione di NKG2A, ma solo quelli con atrofia severa della mucosa. L'analisi di Nkp46 sui IELs TcRγδ+ mostrava una espressione ridotta nei PCD rispetto ai CTR ed ulteriormente ridotta negli ACD rispetto ai PCD, suggerendo una graduale downregolazione di Nkp46 associata ad un cambiamento funzionale dei IELs TcRγδ+ nella progressione della malattia.

Conclusioni e prospettive

Abbiamo evidenziato come i PCD siano un gruppo eterogeneo di pazienti con segni di infiammazione e rimodellamento tissutale, in parte già evidenti nei Mar-

sh0-PCD, in parte solo in quelli Marsh1. Segni predittivi di progressione verso la VA sono evidenti già alla diagnosi di PCD. Il miglior predittore di sviluppo di VA è l'aumento combinato di IELs TcRγδ+ e Perforina+ alla diagnosi. La caratterizzazione citofluorimetrica ha rivelato che esiste una eterogeneità tra i pazienti ACD in merito al fenotipo immunologico dei IELs che dipende almeno in parte dalla severità del danno tissutale. I risultati di questo studio contribuiscono non soltanto alla comprensione dei meccanismi di malattia, ma anche alla implementazione di strategie di stratificazione dei pazienti e definizione del rischio di progressione da PCD a ACD, che potranno essere utili nella pratica clinica.

Bibliografia

Paparo F, Petrone E, Tosco A, Maglio M, Borrelli M, Salvati VM, Miele E, Greco L, Auricchio S, Troncone R. Clinical, HLA, and small bowel immunohistochemical features of children with positive serum antiendomysium antibodies and architecturally normal small intestinal mucosa. *Am J Gastroenterol*. 2005 Oct;100(10):2294-8. doi: 10.1111/j.1572-0241.2005.41134.x. PMID: 16181383.

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.e10. doi: 10.1053/j.gastro.2015.05.013.

Auricchio R, Mandile R, Del Vecchio MR, Scapaticci S, Galatola M, Maglio M, Discepolo V, Miele E, Cielo D, Troncone R, Greco L. Progression of Celiac Disease in Children With Antibodies Against Tissue Transglutaminase and Normal Duodenal Architecture. *Gastroenterology*. 2019 Aug;157(2):413-420.e3. doi: 10.1053/j.gastro.2019.04.004. Epub 2019 Apr 9. PMID: 30978358.

Mayassi T, Ladell K, Gudjonson H, McLaren JE, Shaw DG, Tran MT, Rokicka JJ, Lawrence I, Grenier JC, van Unen V, Ciszewski C, Dimaano M, Sayegh HE, Kumar V, Wijmenga C, Green PHR, Gokhale R, Jericho H, Semrad CE, Guandalini S, Dinner AR, Kupfer SS, Reid HH, Barreiro LB, Rossjohn J, Price DA, Jabri B. Chronic Inflammation Permanently Reshapes Tissue-Resident Immunity in Celiac Disease. *Cell*. 2019; 176: 967-981.e19. doi: 10.1016/j.cell.2018.12.039.

Valutazione degli effetti salutistici di cereali pigmentati nella dieta senza glutine: modulazione dello stato infiammatorio associato alla patologia celiaca

F. Colombo^a, C. Di Lorenzo^a, F. Mercogliano^a, C. Bani^a, K. Petroni^b, R. Pilu^c, S. Piazza^a, M. Dell'Agli^a, P. Restani^a

^a Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano, via Balzaretti 9, 20133 Milano

^b Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano, via Celoria 26, 20133 Milano

^c Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali-Produzione, Territorio, Agroenergia, via Celoria 2, 20133 Milano

Introduzione e scenario

La sequenza primaria della gliadina contiene regioni che svolgono un ruolo importante nella patogenesi della celiachia, esercitando attività citotossica o immunomodulatoria; ne sono state però riconosciute altre responsabili dell'induzione dello stress ossidativo e del rilascio di citochine proinfiammatorie. I radicali liberi sono molecole altamente instabili, prodotte durante il metabolismo cellulare, normalmente contrastati dai meccanismi antiossidanti endogeni. Purtroppo, quando la produzione di radicali liberi supera la capacità dell'organismo di eliminarli, si induce una condizione definita stress ossidativo a cui possono associarsi danni alle cellule e ai tessuti. Nei soggetti celiaci, lo stress ossidativo non sempre viene risolto con l'introduzione della dieta priva di glutine.

Si è ritenuto importante valutare "nuovi" ingredienti senza glutine che possano contribuire a un miglioramento delle condizioni di salute dei soggetti affetti da celiachia. Tra questi, alcuni cereali pigmentati, utilizzati per lo più per diversificare la dieta della popolazione generale, possono rappresentare alternative interessanti per il settore del gluten-free, dal momento che sono ricchi di molecole ad elevata attività antiossidante.

Risultati

La ricerca si è avvalsa di diversi approcci sperimentali per: (1) caratterizzare il profilo fenolico e le relative proprietà antiossidanti di campioni di mais e riso con diversa pigmentazione, utilizzando tecniche spettrofotometriche e cromatografiche, (2) valutare la stabilità degli antociani durante la digestione gastrointestinale e (3) verificare il potenziale antinfiammatorio dei polifenoli tipici dei cereali pigmentati studiati. Su 19 cereali pigmentati a disposizione, lo studio è stato approfondito su 3 di essi in

quanto più promettenti: riso Nerone (N), mais Scagliolo Rosso (SR) e Rosso Rostratto di Rovetta (RR). Gli estratti di cereali pigmentati hanno mostrato un contenuto di antociani diversificato in senso quali-quantitativo e la digestione *in vitro* ha determinato una significativa riduzione del contenuto totale degli stessi, rispettivamente del -23% e del -73% per N e SR.

Al contrario, non sono state osservate differenze significative ($p > 0,05$) nel contenuto fenolico totale prima e dopo la digestione, mentre si è verificato un aumento significativo dell'attività antiossidante. Il fenomeno potrebbe dipendere dalla trasformazione delle antocianine in altri composti bioattivi (quale l'acido protocatecuico), che medierebbero l'aumento della capacità antiossidante.

Le proprietà antiinfiammatorie degli estratti di cereali sono state valutate misurando l'effetto diretto della gliadina da sola o in combinazione con citochine tipiche delle malattie autoimmuni (IFN- γ e IL-1 β) sui livelli di CXCL10, una chemioquina sovraespressa nella mucosa intestinale di pazienti con celiachia e coinvolta nell'attivazione e nel reclutamento dei leucociti. La gliadina, in combinazione con IFN- γ e IL-1 β , ha aumentato il rilascio di CXCL10, che è risultato però inibito da tutti gli estratti saggiati, sia prima che dopo la digestione. CXCL10 è controllato dalla via di segnalazione NF- κ B, che è stata parzialmente inibita da tutti gli estratti, alla massima concentrazione utilizzata (200 μ g/mL).

Conclusioni e prospettive

Questo studio conferma l'attività antiossidante e antinfiammatoria dei cereali pigmentati a livello intestinale, con potenziale ricaduta sul benessere dei soggetti celiaci. I risultati ottenuti indicano che l'uso dei cereali pigmentati, oggi per lo più ingredienti di alimenti comuni, potrebbero trovare un'applicazione anche nei prodotti destinati ai soggetti celiaci.

Bibliografia

- F. Colombo, et al. *Pigmented corn varieties as functional ingredients for gluten-free products*. Foods **10**, 1770, 2021. doi: 10.3390/foods10081770
- S. Piazza et al. *Evaluation of the potential anti-inflammatory activity of black rice in the framework of celiac disease*. Foods **12**, 7805, 2022 - doi.org: 10.3390/foods12010063
- C. Bani et al. *Phenolic profile and in vitro antioxidant activity of different corn and rice varieties*. Plants **12**, 448, 2023. <https://doi.org/10.3390/plants12030448>
- F. Colombo et al. *Characterization of color, phenolic profile, and antioxidant activity of Italian pigmented rice varieties after different technological treatments*. Food Bioscience **53**, 102674, 2023 - <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102674>
- S. Piazza et al. *Pigmented corn as a gluten-free source of polyphenols with anti-inflammatory and antioxidant properties in CaCo-2 cells*. Food Research International **191**, 114640, 2024 - <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114640>

Espressione dei geni HLA-DQ2.5 nei pazienti affetti da malattia celiaca

Laura Pisapia*, Federica Farina*, Mariavittoria Laezza*, Antonio Rispo#, Carmen Gianfrani° e Giovanna Del Pozzo*

*Istituto di Genetica e Biofisica “Adriano Buzzati Traverso”, CNR, Napoli

° Istituto di Biochimica e Biologia cellulare, CNR Napoli

#Dipartimento di Gastroenterologia, Università Federico II di Napoli

Introduzione e scenario

La malattia celiaca è una patologia associata ai geni HLA-DQ2 e HLA-DQ8. Tali geni codificano le molecole HLA espresse sulla superficie cellulare delle cellule presentanti l'antigene (APC) che espongono i peptidi immunogenici della gliadina ai linfociti T CD4. Lavori precedenti hanno dimostrato un'espressione differenziale degli alleli di rischio della celiachia in linee di cellule B e cellule dendritiche differenziate *in vitro*, rispetto agli alleli non associati alla patologia. Ciò significa che le APC di un paziente eterozigote esprimono una concentrazione di eterodimero HLA-DQ2.5 comparabile a quello di un individuo omozigote e quindi presentano all'incirca lo stesso numero di peptidi immunogenici della gliadina (Pisapia 2016; 1). Test funzionali hanno inoltre dimostrato una diretta relazione tra l'espressione delle molecole HLA e attivazione/ proliferazione dei linfociti CD4 patogenici, gliadina-specifici. Un ulteriore interesse è consistito nella valutazione dell'espressione del gene TRAFD1 (TRAF-type zinc finger domain 1) che uno studio GWAS ha associato alla celiachia con la funzione di regolatore del fenotipo infiammatorio (2).

Risultati

Il presente progetto ha avuto quale obiettivo lo studio dell'espressione dei geni HLA-DQ2.5, in particolare degli alleli DQA1*05 e DQB1*02, da parte delle cellule mononucleate del sangue (PBMC) che includono diversi tipi di APC tra cui le cellule B, i monociti, i macrofagi e le cellule dendritiche, oltre ai linfociti T CD4 effettori. Anche in questo caso abbiamo dimostrato una maggiore espressione degli alleli di rischio DQA1*05 e DQB1*02 rispetto agli alleli HLA non associati alla celiachia (80% versus 20%), mediante real time PCR. Le PBMC di pazienti a dieta di glutine con un genotipo eterozigote hanno evidenziato un'elevata espressione degli alleli HLA di rischio rispetto agli alleli non associati alla patologia (Farina, 2021). Riguardo il gene TRAFD1 abbiamo dimostrato una maggiore espressione nelle PBMC di pazienti a dieta di

glutine rispetto a quelli con celiachia attiva (Laezza, 2024).

Conclusioni e prospettive

Le conclusioni del progetto indicano che gli alleli DQA1*05 e DQB1*02 predisponenti la celiachia sono regolati in maniera diversa rispetto ad altri alleli HLA non associati alla patologia, probabilmente in conseguenza della presenza di SNP (single nucleotide polymorphism) nelle regioni regolatorie che influenzano la trascrizione (Del Pozzo, 2021). Anche i pazienti in remissione, dopo una dieta priva di glutine, mantengono un'espressione differenziale confermando che possono mostrare nuovamente i sintomi se l'organismo viene a contatto con l'antigene. L'espressione differenziale dei geni HLA di rischio non è un fenomeno specifico della malattia celiaca ma è stata dimostrata anche in altre patologie autoimmuni e il meccanismo che lo determina è quasi sempre riconducibile ai polimorfismi delle regioni regolative sia prossimali che distali al gene (3). Di conseguenza è nostro interesse prioritario capire il meccanismo molecolare dell'espressione differenziale degli alleli e degli aplotipi di rischio. Infine, la più alta espressione del gene TRAFD1 nei pazienti a dieta senza glutine indica un suo ruolo nell'inibire il pathway dell'IFN γ e presentazione dell'antigene. Ci proponiamo di approfondire la funzione di TRAFD1 per valutare se possa essere considerato un mediatore del processo infiammatorio e un utile biomarcatore della remissione della celiachia e dell'aderenza a un regime alimentare senza glutine nei pazienti trattati.

Bibliografia

- (1) Pisapia et al. Scientific Reports (2020) 10:17227 | <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73907-2>
- (2) A. van der Graaf, et al. Front. Genet. 11 (2021) 1–16, <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.562434>.
- (3) Sartoris S. and Del Pozzo G. Clin Immunol (2024) 265:110266. doi: 10.1016/j.clim.2024.110266

Caratterizzazione funzionale del microbiota intestinale e risposta immune associata in pazienti con malattia celiaca atrofica e potenziale

Ricci¹, Russo E², Renzi D¹, Baldi S², Nannini G¹, Lami G¹, Menicatti M³, Pallecchi M³, Bartolucci G³, Niccolai E², Cerboneschi M², Smeazzetto S², Ramazzotti M⁴, Amedei A² and Calabrò AS¹

¹Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali e Cliniche "Mario Serio" Università di Firenze, Centro di Riferimento Regionale Toscano per la Celiachia dell'Adulto, Firenze, ²Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Università di Firenze, ³Dipartimento di Neuroscienze, Area del Farmaco e Salute del Bambino (NEUROFARBA), Università di Firenze, ⁴Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali e Cliniche "Mario Serio" Università di Firenze

Introduzione

Numerose evidenze indicano che l'incidenza della malattia celiachia è in progressivo incremento ma le ragioni di questo fenomeno sono solo parzialmente note. In aggiunta al glutine ed ai geni di predisposizione HLA (DQ2/DQ8), è plausibile che altri fattori ambientali contribuiscano alla patogenesi della malattia. Tra questi, un ruolo rilevante sembra svolgere il microbiota intestinale. Al fine di approfondire i meccanismi di base coinvolti nello sviluppo dell'atrofia dei villi intestinali, obiettivo del presente progetto di ricerca è stato quello di caratterizzare il microbiota duodenale, i metaboliti lipidici di origine microbica (acidi grassi liberi) e la risposta immune associata in soggetti con celiachia atrofica e potenziale.

Pazienti e metodi

Sono stati inclusi nello studio 27 pazienti celiaci a dieta libera (17 con celiachia atrofica e 10 con celiachia potenziale) e 12 soggetti di controllo. Campioni di sangue sono stati prelevati a digiuno in tutti i soggetti per la misurazione mediante spettrometria di massa¹ degli acidi grassi liberi sierici, e biopsie multiple della mucosa duodenale sono state effettuate per l'analisi istologica, l'identificazione delle comunità batteriche (mediante sequenziamento del 16S rRNA) e la valutazione della risposta immune (caratterizzazione fenotipica e funzionale di cloni cellulari T isolati dalla mucosa).

Risultati

Per quanto concerne l'analisi del microbiota associato alla mucosa, non sono

emerse significative differenze tra pazienti con celiachia atrofica e potenziale. Al contrario, importanti differenze sono state riscontrate a carico degli acidi grassi liberi sierici. In particolare, pazienti con celiachia potenziale presentavano livelli significativamente aumentati di acido propionico, butirrico e valerico in confronto ai soggetti di controllo e di acido isobutirrico e octadecanoico rispetto ai pazienti con celiachia atrofica. Infine, l'analisi immunologica di biopsie duodenali ha documentato una minor percentuale di linfociti T CD4⁺ nei pazienti con celiachia potenziale mentre la caratterizzazione funzionale dei linfociti T ha permesso di rilevare un significativo incremento dei linfociti Th0/Th17 (secernenti IL-4⁺, IFN- γ e IL-17) e una parallela riduzione dei linfociti Th1/Th17 (producenti IFN- γ e IL-17) rispetto ai celiaci atrofici.

Conclusioni e prospettive future

Irisultati dello studio, pur non documentando significative differenze nel microbiota duodenale, mostrano distinti profili, per quanto riguarda gli acidi grassi liberi circolanti e la risposta immunitaria mucosale, tra pazienti con celiachia potenziale, atrofica e soggetti sani di controllo. Ulteriori studi sono appaiono necessari al fine di confrontare, in una coorte di pazienti molto più ampia, i complessi rapporti tra microbiota fecale, acidi grassi liberi e risposta immunitaria.

Bibliografia: 1) Baldi S et al (2021). Free fatty acids signature in human intestinal disorders: significant association between butyric acid and celiac disease. *Nutrients* 13:742. doi: 10.3390/nu130307422)

Poster del Grant AIC Fellowship 005_2016 - **Monia Porpora**

L'infiammazione negli organoidi CD è costitutiva ed è più sensibile agli stimoli pro-infiammatori

Monia Porpora, Merlin Nanayakkara, Claudia Bellomo, Francesca Furone, Renata Auricchio, Genoveffa D'Aniello, Maria Vittoria Barone
Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionale, Sezione Pediatria, ELFID (European Laboratory for the Investigation of Food Induced Diseases) Università Federico II Napoli

Obiettivo: La celiachia (CD) è una malattia autoimmune infiammatoria. La principale manifestazione è un'enteropatia causata da una risposta immunitaria abnorme ai peptidi del glutine. La patogenesi dipende sia da fattori predisponenti genetici (geni HLA DQ2/8-gen non HLA) che da fattori esterni. Di fatti, diversi fattori ambientali pro-infiammatori possono influenzare e amplificare la risposta immunitaria al glutine mediata dalle cellule T. Il danno epiteliale e l'atrofia dei villi sono segni caratteristici della malattia celiaca. Nel presente studio si descrive l'infiammazione nell'epitelio intestinale celiaco utilizzando come modello gli organoidi intestinali derivati da biopsie duodenali di pazienti celiaci (CD) e controlli (CTR) e la loro rispettiva risposta a diversi fattori pro-infiammatori, come gliadina e virus.

Metodi: Sono stati prodotti organoidi intestinali derivati da pazienti CD e CTR, l'infiammazione è stata studiata mediante Western Blot (WB), ELISA e quantitative PCR con i seguenti markers: pNF- κ B, pERK, IL-6, IL-1 β . Il ligando del Toll-like-receptor, Loxoribine (Lox) e il peptide della gliadina (P31-43) sono stati utilizzati come stimoli pro-infiammatori

Risultati: I marcatori dell'infiammazione pNF- κ B, pERK, IL-1-B e IL-6 sono risultati aumentati e persistenti negli organoidi di CD e sono più sensibili agli stimoli di P31-43 e loxoribina (Lox) rispetto alle CTR.

Conclusioni: I fattori che creano un ambiente pro-infiammatorio nell'intestino possono essere esogeni, come il cibo e i virus, ma possono anche essere endogeni. In effetti, l'infiammazione di basso grado dell'epitelio CD, probabilmente costitutiva, è presente anche prima del danno intestinale. Gli organoidi intestinali hanno riprodotto questa infiammazione costitutiva e quindi rappresentano un buon modello per lo studio dell'infiammazione epiteliale nei pazienti celiaci.

Poster del Grant AIC Fellowship 009_2016 - **Serena Vitale**

Analisi della risposta immunitaria indotta dal glutine nelle differenti forme di celiachia

Serena Vitale¹, Ilaria Mottola¹, Mariantonia Maglio², Erasmo Miele², Riccardo Troncone², Renata Auricchio², Carmen Gianfrani¹

¹Institute of Biochemistry and Cell Biology, CNR, Via Pietro Castellino, 111, Naples, 80131, Italy.

²Department of Translational Medical Science, Section of Pediatrics, University Federico II, and European Laboratory for the Investigation of Food Induced Diseases (ELFID), University Federico II, via S. Pansini 5, 80131 Naples, Italy.

La celiaca può manifestarsi con un ampio spettro di forme cliniche e di danno alla mucosa del piccolo intestino. Tra le forme più frequenti troviamo la celiachia acuta, con sintomi prevalentemente gastrointestinali, presenza di autoanticorpi anti-transglutaminasi ed atrofia dei villi intestinali, e la celiachia potenziale, caratterizzata da positività degli autoanticorpi, presenza o meno di sintomatologia e assenza del danno alla mucosa. Mentre è ben nota la cascata infiammatoria scatenata dal glutine nella celiachia acuta, nella forma potenziale i meccanismi patogenetici e i peptidi del glutine tossici che li innescano, sono poco conosciuti. Inoltre, non è chiaro se nella mucosa intestinale dei celiaci potenziali, i linfociti infiammatori siano controllati da meccanismi mediati da cellule regolatorie, e se la rottura di tale "equilibrio immune" sia responsabile del danno alla mucosa intestinale, con conseguente insorgenza della forma acuta. L'obiettivo primario dello studio triennale finanziato da AIC (Fellowship Grant 009_FC_2016) è stata l'analisi della risposta immunitaria indotta dal glutine nelle differenti forme di celiachia, ed in particolare la caratterizzazione dei principali attori della reattività al glutine: i linfociti T intestinali, sia di tipo infiammatorio che regolatorio.

Nello studio sono stati valutati il fenotipo e il profilo di citochine rilasciate delle cellule T intestinali di tre gruppi di pazienti celiaci di età pediatrica, acuti, potenziali e controlli sani. L'analisi è stata eseguita mediante citofluorimetria a flusso utilizzando due differenti sistemi sperimentali: 1) sistema *in vitro*, costituito da linee cellulari molto responsive al glutine; 2) sistema *ex vivo*, costituito dalle cellule intestinali appena isolate dai campioni biopsici intestinali. L'analisi fenotipica è stata effettuata su cellule non stimolate, mentre le citochine sono state rilevate mediante colorazione intracitoplasmatica dopo stimolazione con PMA/ionomicina.

Sono stati identificati nuovi biomarcatori immuno-specifici, associati all'infiammazione del tessuto intestinale, nelle mucose duodenali delle due forme di MC. In particolare, è stato osservato che la mucosa danneggiata della forma acuta è

caratterizzata da un'espansione di una sottopopolazione dei linfociti T con recettore TCR $\gamma\delta$ (cellule TCR $\gamma\delta$ positive), con ruolo infiammatorio, e tale infiltrazione è accompagnata da una quasi totale scomparsa dei linfociti T con recettore CD4 (cellule CD4 positive) che producono IL4, con un probabile ruolo regolatorio. La mucosa morfologicamente normale dei soggetti con MC-potenziale presentava, invece, un andamento inverso, con un aumento significativo delle cellule CD4+ che producono IL4 e riduzione della densità delle cellule TCR $\gamma\delta$ +. Le due popolazioni cellulari osservate nelle biopsie di celiaci acuti e potenziali risultano essere inversamente correlate tra loro, inoltre la loro densità è fortemente correlata con il danno alla mucosa intestinale. In particolare, la densità delle cellule TCR $\gamma\delta$ + aumenta in maniera lineare con il grado di infiammazione nella mucosa (grado di lesione Marsh), al contrario, la densità delle cellule IL4+ si riduce significativamente con l'aumentare della lesione ai villi intestinali.

Questi risultati suggeriscono che l'analisi combinata di queste 2 popolazioni cellulari potrebbe avere un importante valore prognostico, e potrebbe rappresentare un approccio utile non solo per caratterizzare meglio le due condizioni di MC, ma anche per supportare la diagnosi differenziale e prevedere la progressione e/o la remissione della malattia.

Bibliografia

Auricchio R, Mandile R, Del Vecchio MR, Scapaticci S, Galatola M, Maglio M, Discepolo V, Miele E, Cielo D, Troncone R, Greco L. Progression of Celiac Disease in Children With Antibodies Against Tissue Transglutaminase and Normal Duodenal Architecture. *Gastroenterology*. 2019 Aug;157(2):413-420.e3. doi: 10.1053/j.gastro.2019.04.004. Epub 2019 Apr 9. PMID: 30978358.

Vitale S, Maglio M, Picascia S, Mottola I, Miele E, Troncone R, Auricchio R, Gianfrani C. Intestinal Cellular Biomarkers of Mucosal Lesion Progression in Pediatric Celiac Disease. *Pharmaceutics*. 2021, Nov 20;13(11):1971. doi: 10.3390/pharmaceutics13111971.

Vitale S, Santarasci V, Camarca A, Picascia S, Di Pasquale A, Maglio M, Maggi E, Cosmi L, Annunziato F, Troncone R, Auricchio R, Gianfrani C. The intestinal expansion of TCR $\gamma\delta$ + and disappearance of IL4+ T cells suggest their involvement in the evolution from potential to overt celiac disease. *Eur J Immunol*. 2019 Sep 25. doi: 10.1002/eji.201948098.

Poster del Grant AIC Fellowship 007_2017 - **Donatella Cielo**

Effetto dei long non-coding RNA sullo sviluppo della malattia celiaca

D. Cielo, M. Galatola, R. Auricchio, L. Greco

Dipartimento Scienze Mediche Traslazionali, Università degli Studi di Napoli Federico II

Introduzione

Gli studi di associazione genetica hanno identificato 112 polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) associati alla Malattia Celiaca (MC), dei quali circa il 90% è localizzato in regioni non codificanti, suggerendo un potenziale ruolo regolatorio (1). Negli ultimi anni, è stato scoperto che la maggior parte dei trascritti umani è costituito da RNA non codificanti (ncRNA), piccole molecole di RNA trascritte ma non tradotte in proteine. E' inoltre noto che questi RNA sono coinvolti nella regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica, che non dipende esclusivamente dai fattori di trascrizione. Tra gli RNA non codificanti che influenzano i processi epigenetici si distinguono in "short ncRNA" e "long ncRNA", oggetto del nostro lavoro. L'analisi dei meccanismi di regolazione epigenetica potrebbe contribuire a chiarire l'eredità mancante della Malattia Celiaca. Lo scopo di questo studio è quello di valutare l'espressione e la localizzazione di lncRNA potenzialmente associati alla Malattia Celiaca, su diversi tipi cellulari intestinali (cellule epiteliali e non epiteliali) e su sezioni fissate in formalina (FFPE) di biopsie intestinali di pazienti celiaci e controlli.

Metodi

Sono stati selezionati 7 SNP associati alla MC, identificati come cis-eQTL (2,3,4,5), ovvero varianti che influenzano l'espressione genica, localizzati all'interno di 7 lncRNA (AL139246, LINC01890, LINC02435, AC007220, LINC01882, AL080284.1, CCDC26). Sono state analizzate biopsie intestinali di 32 pazienti celiaci (CD) e 22 controlli (CTR), isolando cellule epiteliali e non epiteliali per studiare, tramite Real-Time PCR, l'espressione dei lncRNA e dei loro geni target (ZEB1, MAP2K4 e PTPN2). Tutti i campioni sono stati anche genotipizzati per lo SNP rs12971201 del gene PTPN2. Infine, su sezioni di tessuto conservate in paraffina, abbiamo analizzato la localizzazione cellulare dei lncRNA mediante ibridazione in situ (ISH).

Risultati

Tra i lncRNA analizzati, LINC01882 ha mostrato una differenza significativa nell'espressione tra pazienti celiaci e controlli. In particolare: A) LINC01882 è espresso principalmente nei celiaci, soprattutto nelle cellule della lamina propria, con un'intensità di segnale nettamente superiore rispetto ai controlli. B) I geni target di LINC01882, nello specifico PTPN2 e MAP2K4, presentano una ridotta espressione nei pazienti celiaci rispetto ai controlli, suggerendo un potenziale meccanismo di regolazione negativa mediato da questo lncRNA. Al contrario, ZEB1 non ha mostrato variazioni significative tra i gruppi. C) Gli altri lncRNA analizzati hanno mostrato espressione stabile o assente nei diversi compartimenti intestinali, senza differenze rilevanti tra pazienti celiaci e controlli.

Conclusioni e prospettive

I nostri risultati suggeriscono che il lncRNA LINC01882 potrebbe giocare un ruolo

chiave nella patogenesi della MC. L'espressione significativamente aumentata di LINC01882 nei pazienti celiaci rispetto ai controlli, in particolare nella lamina propria intestinale, associata a una concomitante riduzione dei geni immunoregolatori PTPN2 e MAP2K4, suggerisce un coinvolgimento diretto nella regolazione epigenetica della MC mediato da questo lncRNA.

Bibliografia

Dubois PC, Trynka G, Franke L, et al. Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nat Genet* 2010;42:295–302
Ricano-Ponce, C. Wijmenga. Mapping of immune-mediated disease genes. *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.* 2013 (14): 325–353
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 .
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.
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

Poster del Grant AIC Fellowship O14_2017 - **Vera Rotondi Aufiero**

Funzione immunomodulatoria dei linfociti intraepiteliali $\gamma\delta$ + nella malattia celiaca

Vera Rotondi Aufiero¹, Giuseppe Mazzarella¹, Giuseppe Iacomino¹, Gaetano Iaquinto², Nicola Giardullo³.

¹Istituto di Scienze dell'Alimentazione, ISA-CNR, Avellino

²Unità di Gastroenterologia, Casa di Cura Santa Rita, Gruppo Nefrocenter, Avellino

³Unità di Gastroenterologia ed Endoscopia digestiva, Ospedale San Giuseppe Moscati, Avellino

Introduzione e scenario

La malattia celiaca (MC) è un'enteropatia immunomediata che si manifesta in soggetti geneticamente predisposti a seguito dell'ingestione del glutine, caratterizzata da atrofia dei villi intestinali, iperplasia delle cripte e incremento dei linfociti T intraepiteliali (T IELs) che esprimono TCR $\alpha\beta$ + e $\gamma\delta$ +

Contrariamente ai IELs $\alpha\beta$ +, il cui numero si riduce con una dieta priva di glutine, i $\gamma\delta$ + restano aumentati anche nei pazienti celiaci a dieta senza glutine, oltre ad essere aumentati nei pazienti con MC latente e nei parenti di primo grado dei pazienti celiaci [Jabri et al, 2009].

Sebbene alcune evidenze scientifiche abbiano dimostrato il loro ipotetico ruolo regolatorio associato alla loro capacità di secernere TGF- β [Bhagat et al, 2008], i IELs $\gamma\delta$ + non riescono a controllare lo stato infiammatorio nella MC attiva, suggerendo un difetto nell'attivazione dei meccanismi regolatori. Ad oggi, il ruolo specifico degli IELs $\gamma\delta$ + nella MC non è del tutto chiaro.

È noto che l'interleuchina (IL)-15, aumentata nella mucosa intestinale dei pazienti celiaci in fase attiva di malattia, è sovraespressa a livello del compartimento epiteliale e che una sovraespressione di IL-15 in colture d'organo di pazienti MC a dieta senza glutine determina un'espansione degli IEL $\gamma\delta$ + [Maiuri et al, 2001]. Il gruppo Cerf-Bensussan ha dimostrato che l'IL-15 è coinvolta nella downregolazione locale del signaling del TGF- β [Benhamed et al, 2007]. Più recentemente, il nostro gruppo ha dimostrato che questa citochina compromette le funzioni delle cellule T regolatrici (Treg) nella MC [Zanzi et al, 2011]. Nel complesso, questi dati indicano che l'IL-15 gioca un ruolo importante nella patogenesi della MC, e che potrebbe influenzare il ruolo degli IEL $\gamma\delta$ +

L'obiettivo della Task 1 dello studio è stato quello di mettere in luce la funzione dei IELs $\gamma\delta$ +, attraverso l'analisi dell'espressione genica di citochine attivamente coinvolte nel pathway della MC prodotte dai IELs $\gamma\delta$ +, identificati e isolati mediante un protocollo modificato di microdissezione a cattura laser (LCM) associato a immunistochemical (IHC), in sezioni seriali speculari di mucosa intestinale di pazienti celiaci in fase attiva di malattia.

Nella Task 2, utilizzando il modello sperimentale della coltura d'organo intestinale, abbiamo studiato per la prima volta l'effetto di un anticorpo monoclonale neutralizzante l'IL-15 (aIL-15), nei confronti dei meccanismi che danneggiano la mucosa intestinale di pazienti con MC attiva.

Definire il meccanismo d'azione dei IELs $\gamma\delta$ + e il ruolo dell'IL15 nel pathway della malattia, fornirebbe un concreto aiuto nell'identificazione di strategie terapeutiche alternative per i pazienti celiaci.

Risultati

Come recentemente dimostrato dal nostro gruppo nel lavoro pubblicato su *Journal of Immunological Methods* [Mazzarella et al., *J Immunol Methods*. 2022], i $\gamma\delta$ +, isolati nel compartimento epiteliale della mucosa intestinale di pazienti con MC attiva mediante un protocollo ottimizzato di LCM accoppiato a IHC, mostrano un aumento dell'espressione di TGF- β rispetto agli enterociti, isolati nella restante parte di epitelio. Al contrario, l'IL-10 è maggiormente espressa dagli enterociti rispetto ai $\gamma\delta$ + IELs.

In un altro recente lavoro pubblicato su *Cells* [Rotondi Aufiero et al., *Cells*. 2025] abbiamo dimostrato, per la prima volta, che bloccando l'azione dell'IL15 nella

mucosa intestinale di pazienti con MC attiva, viene indotta una riduzione dell'espressione epiteliale di una serie di marcatori immunologici associati all'apoptosi e alla citotossicità (Fas, HLA-E, perforina, TUNEL) e la downregolazione dell'espressione genica dell'IFN- γ a livello epiteliale.

Conclusioni e prospettive

Nel complesso i dati ottenuti confermano che i $\gamma\delta$ + IELs nella MC attiva mantengono un'attività antinfiammatoria, suggerendo una tendenza della loro funzione a controbilanciare lo stato infiammatorio in corso.

Inoltre, la neutralizzazione degli effetti dell'IL-15 nella mucosa intestinale dei pazienti con MC attraverso la downregolazione dell'espressione di Fas e dell'HLA-E e il rilascio di proteine citotossiche, come la perforina, potrebbe bloccare l'apoptosi. Inoltre, la ridotta espressione dell'IFN- γ , potrebbe determinare una downregolazione della risposta immunitaria caratteristica della MC.

Indagini più approfondite sono necessarie per valutare la funzione dei $\gamma\delta$ + IELs e per meglio caratterizzare gli elementi che ne influenzano la funzionalità, tra cui l'effetto dell'IL-15.

I risultati pongono le basi per una ricerca prospettica mirata all'elaborazione di strategie immunoterapeutiche che potrebbero rappresentare possibili alternative terapeutiche alla dieta senza glutine.

Bibliografia

- Benahmed M, Meresse B, Arnulf B, Barbe U, Mention JJ, Verkarre V, Allez M, Cellier C, Hermine O, Cerf-Bensussan N. Inhibition of TGF-beta signaling by IL-15: a new role for IL-15 in the loss of immune homeostasis in celiac disease. *Gastroenterology*. 2007 Mar;132(3):994-1008. doi: 10.1053/j.gastro.2006.12.025. Epub 2006 Dec 16. PMID: 17324400.
- Bhagat G, Naiyer AJ, Shah JG, Harper J, Jabri B, Wang TC, Green PH, Manavalan JS. Small intestinal CD8+TCR $\gamma\delta$ +NKG2A+ intraepithelial lymphocytes have attributes of regulatory cells in patients with celiac disease. *J Clin Invest*. 2008 Jan;118(1):281-93. doi: 10.1172/JCI30989. PMID: 18064301; PMCID: PMC2117760.
- Jabri B, Sollid LM. Tissue-mediated control of immunopathology in celiac disease. *Nat Rev Immunol*. 2009 Dec;9(12):858-70. doi: 10.1038/nri2670. PMID: 19935805.
- Maiuri L, Ciacci C, Vacca L, Ricciardelli I, Auricchio S, Quarantino S, Londei M. IL-15 drives the specific migration of CD94+ and TCR $\gamma\delta$ + intraepithelial lymphocytes in organ cultures of treated celiac patients. *Am J Gastroenterol*. 2001 Jan;96(1):150-6. doi: 10.1111/j.1572-0241.2001.03437.x. PMID: 11197245.
- Zanzi D, Stefanile R, Santagata S, Iaffaldano L, Iaquinio G, Giardullo N, Lania G, Vigliano I, Vera AR, Ferrara K, Auricchio S, Troncone R, Mazzarella G. IL-15 interferes with suppressive activity of intestinal regulatory T cells expanded in celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2011 Jul;106(7):1308-17. doi: 10.1038/ajg.2011.80. Epub 2011 Apr 5. PMID: 21468011.

Poster del Grant AIC Fellowship 006_2018 - Lucia Treppiccione

Inibizione delle proprietà immunogeniche e citotossiche della gliadina mediante transamidazione enzimatica.

Lucia Treppiccione, Francesco Maurano, Diomira Luongo, Vincenzo De Sena, Mauro Rossi

Institute of Food Sciences, CNR, Avellino Italy

Introduzione e Scenario

La malattia celiaca (MC) è una malattia autoimmune, che si manifesta in soggetti geneticamente predisposti a seguito dell'ingestione del glutine presente nella maggior parte dei cereali (orzo, frumento, segale). La reazione immunitaria che si scatena, a livello del piccolo intestino (intestino tenue), genera un'infiammazione, che causa la tipica atrofia dei villi, riscontrabile nei soggetti celiaci, e di conseguenza un'incapacità di assorbire i nutrienti. Attualmente l'unico trattamento possibile è una dieta priva di glutine.

In studi precedenti è stato dimostrato che la transamidazione enzimatica è in grado di sopprimere la risposta infiammatoria del glutine mediata da queste cellule. In particolare, studi condotti su di un modello murino di sensibilità al glutine, hanno suggerito un ruolo della gliadina transamidata come immuno-modulatore.

Lo studio è stato rivolto alle analisi delle proprietà della gliadina transamidata nell'ottica di utilizzare la stessa per modulare la risposta pro-infiammatoria alla gliadina nell'intestino.

Nel dettaglio l'obiettivo dello studio è stato di utilizzare il potenziale immunomodulatorio della gliadina transamidata per individuare una strategia terapeutica potenzialmente utile per i pazienti celiaci.

Impiegando il modello murino di sensibilità al glutine, abbiamo analizzato protocolli di tollerizzazione prendendo in considerazione diverse finestre temporali di età e diverse condizioni fisiologiche come l'allattamento.

Sono stati studiati differenti protocolli sperimentali:

- Tollerizzazione Neonatale → Somministrazione intragastrica durante la fase di allattamento di gliadina nativa e transamidata e successiva sensibilizzazione della prole per via intranasale con pt-glia più tossina colerica.
- Co-Trattamento → Somministrazione intragastrica di gliadina nativa e transamidata e sensibilizzazione per via intranasale con gliadina nativa più tossina colerica.
- Pre-trattamento → Somministrazione intragastrica di gliadina nativa e transamidata seguita da sensibilizzazione per via intranasale con gliadina nativa più tossina colerica.

Risultati

I risultati ottenuti hanno confermato l'abilità della gliadina transamidata di abbattere la risposta infiammatoria della gliadina in vitro.

Abbiamo inoltre dimostrato che la gliadina transamidata è in grado di modificare la risposta adattativa della gliadina e allo stesso tempo di inibire la risposta innata nei topi sensibili al glutine.

Abbiamo inoltre riportato che la sensibilizzazione degli animali con gliadina e/o gliadina modificata non va ad alterare la via dell'Nrf2 e quindi non altera lo stress ossidativo come avevamo supposto inizialmente.

Alla luce dei primi risultati ottenuti abbiamo infine testato differenti protocolli di tollerizzazione evidenziando che il pre-trattamento con gliadina transamidata nel topo adulto ha mostrato i risultati più interessanti in quanto si è visto che si ottiene una tolleranza a livello sistemico.

Conclusioni e Prospettive

I risultati ottenuti in questo studio confermano la capacità della gliadina transamidata di abbattere la tipica risposta infiammatoria che avviene nella malattia celiaca, aprendo quindi una nuova prospettiva per l'utilizzo di questa molecola per indurre tolleranza al glutine e per prevenire gli effetti della malattia. Tuttavia, i meccanismi alla base della patogenesi della MC sono molto complessi e ad oggi ancora non ne abbiamo una totale conoscenza.

I nostri risultati evidenziano, però, importanti proprietà immunomodulatorie della gliadina modificata ma occorrono ulteriori sperimentazioni per riuscire ad ottenere un protocollo di profilassi che sia efficace anche a livello mucosale oltre che sistemico.

Bibliografia

Gianfrani C., et al, Gastroenterology, 2007, 780-789. Luongo D. et al., Cytokine, 2019, 117,23-29.

Treppiccione L. et al, Food Funct. 2022 Aug 30;13(17):8950

Sollid, L.M. Coeliac disease: Dissecting a complex inflammatory disorder, Nature Review Immunology vol. 2 647-655 2002

Pagliari D., et al. The Interaction among microbiota, immunity, and genetic and dietary factors is the conditio sine qua non may develop celiac disease. J Immunol Res, 2015;2015:123653

Poster del Grant AIC Fellowship 008/2018 - **Giorgia Renga**

Candida albicans in celiachia: colpevole o innocente?

Giorgia Renga¹, Marilena Pariano¹, Claudia Stincardini¹, Consuelo Fabi¹, Marina Maria Bellet¹, Claudio Costantini¹, Luigina Romani^{1,2}

¹ Department of Medicine and Surgery, University of Perugia, Italy-² San Raffaele Research Center, Sulmona, L'Aquila, Italy.

Nell'ambito del progetto AIC 008/2018 dal titolo: "Studio della interazione tra mastociti e *Candida albicans* nello sviluppo della celiachia", abbiamo cercato di decifrare il ruolo di *Candida albicans* in un modello murino di celiachia. Il fungo, come è noto, è un commensale di cute e mucose dell'uomo ed in quanto tale non dannoso. Tuttavia, può diventare pericoloso, aumentare cioè la propria virulenza, al variare del microambiente mucosale, come ad esempio in caso di infiammazione intestinale dove la capacità del fungo di cambiare morfologia si associa spesso al potenziamento dell'infiammazione stessa in un perverso circolo vizioso. Ed allora, capire se il fungo è causa o spia del microambiente infiammatorio locale in celiachia diventa essenziale per una terapia e nutrizione di precisione. I risultati del nostro studio si possono così sintetizzare:

Il glutine è in grado di modificare la morfologia del fungo ed influenzarne la virulenza.

L'aumentata virulenza del fungo si traduce in un aumentato danno mucosale con conseguente infiammazione e disbiosi microbica.

I mastociti intestinali hanno un ruolo chiave nell'interpretare le caratteristiche del fungo ed organizzare per contro la risposta immune locale sia in senso infiammatorio che non (favorire cioè un ambiente più o meno permissivo al fungo).

Istruendo opportunamente i mastociti con terapie anti-infiammatorie nuove, quali la inibizione della citochina IL-9 da questi prodotta, e/o con prodotti microbici, quali l'indolo-3-aldeide, capace di correggere la disbiosi infiammatoria, è stato possibile ripristinare un microambiente intestinale a ridotta infiammazione e capace di instaurare un rapporto di pacifica coesistenza con *C. albicans*.

Questi risultati suggeriscono che l'interruzione del circolo vizioso perverso si ottiene attraverso una terapia combinata che preveda non tanto e non solo un'azione sul fungo ma anche, e soprattutto, sul microambiente intestinale, dove il ripristino dell'eubiosi e della tolleranza immunologica sono le condizioni che garantiscono il corretto rapporto con *C. albicans*.

Aderenza alla dieta senza glutine, sviluppo di una nuova metodica di laboratorio per il monitoraggio delle urine

Albino Coglianesi^{1,2,3}, Bruno Charlier¹, Francesca Mensitieri^{1,3}, Fabrizio Dal Piaz^{1,2}, Viviana Izzo^{1,2}

Department of Medicine, Surgery and Dentistry, Università degli Studi Salerno, Baronissi (SA), Italy

University Hospital San Giovanni di Dio e Ruggi d'Aragona, Salerno, Italy

Graduate School in Clinical Pathology and Clinical Biochemistry, University of Salerno

Introduzione e scenario

La stretta aderenza alla dieta senza glutine (DSG) rappresenta l'unica terapia efficace per la Malattia Celiaca (MC), consentendo la remissione dei sintomi, la prevenzione delle complicanze ed il miglioramento della qualità di vita. Tuttavia, dati epidemiologici indicano che fino al 50% dei pazienti può trasgredire alla dieta, talvolta involontariamente, a causa della contaminazione crociata o della presenza non dichiarata di glutine nei prodotti alimentari. Inoltre, una quota minoritaria di soggetti può sviluppare una forma refrattaria (RCD), rendendo complessa la diagnosi differenziale tra non risposta ed esposizione non controllata. Attualmente, i metodi di monitoraggio dell'aderenza alla DSG si basano su questionari o su valutazioni indirette, spesso inaffidabili. In questo contesto, alcuni lipidi fenolici, nello specifico l'acido 3,5-diidrossibenzoico (DHBA) e l'acido 3-(3,5-diidrossifenil)-propanoico (DHPPA) principali metaboliti degli alchilresorcinoli (AR), sono stati proposti come potenziali biomarcatori molecolari dell'assunzione di glutine.

Risultati

È stato sviluppato e validato un metodo in spettrometria di massa accoppiata alla cromatografia liquida (LC-MS/MS) per la quantificazione simultanea di DHBA e DHPPA in campioni urinari, seguendo le linee guida più recenti per la validazione dei metodi bioanalitici. Una volta validato il metodo, per valutarne l'affidabilità nel monitoraggio dell'assunzione di glutine, abbiamo analizzato campioni urinari di soggetti sani. In un primo momento, sono stati esaminati i campioni di urina provenienti da 10 volontari sani sottoposti a dieta priva di glutine (GFU) e da 10 volontari sani con dieta contenente glutine (GRU). I risultati hanno confermato che la concentrazione di entrambi i biomarcatori era significativamente più bassa nei GFU rispetto ai GRU. In particolare, è stata osservata una buona correlazione tra i livelli di DHBA e l'assunzione di glutine in tutti i campioni. In fase preclinica, tre volontari sani sono stati sottoposti ad un protocollo dietetico controllato, alter-

nando giorni di DSG, assunzione controllata di glutine (100 g di pane) e successivo ritorno a una dieta contenente glutine. I campioni di urina del mattino sono stati analizzati quotidianamente, mostrando un andamento coerente con il tipo di dieta seguita. In particolare, si è osservato un aumento significativo dei biomarcatori già dal giorno successivo all'assunzione di glutine, con una maggiore sensibilità del DHBA nel rilevare anche modeste variazioni. I risultati ottenuti, seppur su un numero limitato di soggetti, hanno evidenziato una buona riproducibilità intra- e interindividuale, suggerendo la possibilità di definire valori soglia distinti per condizioni di DSG e dieta contenente glutine.

Conclusioni e prospettive

La quantificazione urinaria di DHBA e DHPPA si è dimostrata un approccio promettente per monitorare in modo oggettivo e non invasivo l'aderenza alla DSG. L'impiego di biomarcatori molecolari potrebbe aiutare i pazienti a mantenere un maggiore controllo sulla propria dieta e potrebbe consentire ai clinici di identificare rapidamente trasgressioni involontarie o errate diagnosi di celiachia refrattaria, evitando indagini invasive come la biopsia intestinale. I prossimi sviluppi del progetto prevedono l'estensione dello studio a una coorte più ampia di pazienti celiaci e controlli sani, per validare clinicamente il metodo, definirne sensibilità e specificità diagnostica e individuare soglie operative utili nella pratica clinica quotidiana.

Bibliografia

- M.L. Moreno, A. Rodríguez-Herrera, C. Sousa, I. Comino, Biomarkers to monitor gluten-free diet compliance in celiac patients, *Nutrients* 9 (1) (2017) 46.
- P. Rajpoot, A. Sharma, S. Harikrishnan, B.J. Baruah, V. Ahuja, G.K. Makharia, Adherence to gluten-free diet and barriers to adherence in patients with celiac disease, *Indian J. Gastroenterol.* 34 (5) (2015) 380–386.
- R. Wierzbicka, G. Zamaratskaia, A. Kamal-Eldin, R. Landberg, Novel urinary alkylresorcinol metabolites as biomarkers of whole grain intake in free-living Swedish adults, *Mol. Nutr. Food Res.* 61 (2017) 7.
- R. Thakare, Y.S. Chhonker, N. Gautam, J.A. Alamoudi, Y. Alnouti, Quantitative analysis of endogenous compounds, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 128 (2016) 426–437, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.06.017>.
- ICH. BIOANALYTICAL METHOD VALIDATION M10 (Draft Version, 2019). Available at: https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Multidisciplinary/M10/M10EWG_Step2_DraftGuideline_2019_0226.pdf.

