

Circulating MicroRNA signatures for the identification of new potential diagnostic biomarkers of Celiac Disease and the response to gluten-free diet

TITOLARE DEL GRANT: Dr. Andrea Masotti

ISTITUTO: Ospedale Pediatrico Bambino Gesù – IRCCS, Roma

**DURATA DEL PROGETTO: 1 Dicembre 2013 - 30 Novembre 2016
(Prorogato fino al 2 Settembre 2017)**

Background

Malattia Celiaca (CD)

Enteropatia sistemica immuno-mediata scatenata dal glutine contenuto negli alimenti ingeriti.

Trattamento

Una rigida dieta senza glutine (GFD) che porta progressivamente ad una remissione sintomatica, sierologica e istologica in molti pazienti. Se la dieta fallisce, possono intervenire altre complicazioni gravi quali il linfoma.

Diagnosi di casi dubbi

L'attuale *gold standard* per la diagnosi di celiachia nei casi borderline è una piccola biopsia intestinale (dove questa sia praticabile) che confermi la positività dei saggi sierologici. Solo un piccolo numero di casi di CD sono clinicamente individuabili.

Dieta Gluten-free

Nessuna linea guida per valutare l'esito della CD o l'aderenza alla dieta.



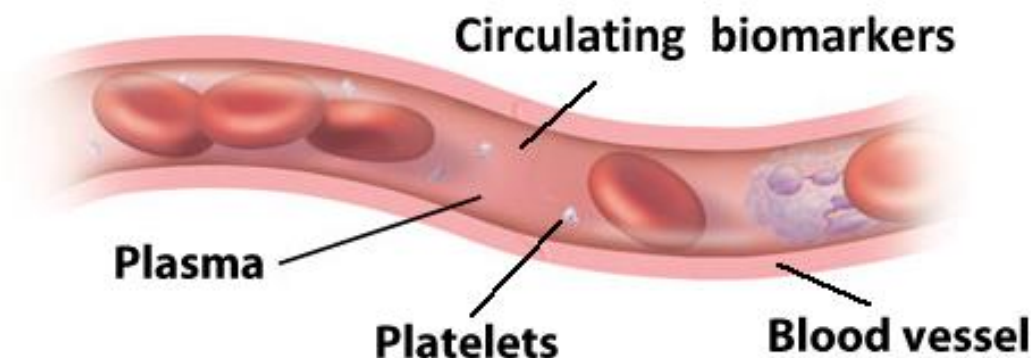
La scoperta di nuovi biomarcatori per:

- la **diagnosi di CD** e
- La valutazione della **risposta alla dieta**.

Dati Preliminari

Un **biomarcatore** (o marcatore biologico) è un indicatore **misurabile**, **stabile** e **riproducibile** di qualche stato o condizione biologica.

Il biomarcatore può essere generalmente saggiato/quantificato da **siero/plasma**, **fluido cerebrospinale**, **urina**, **saliva** e **altri fluidi biologici**.

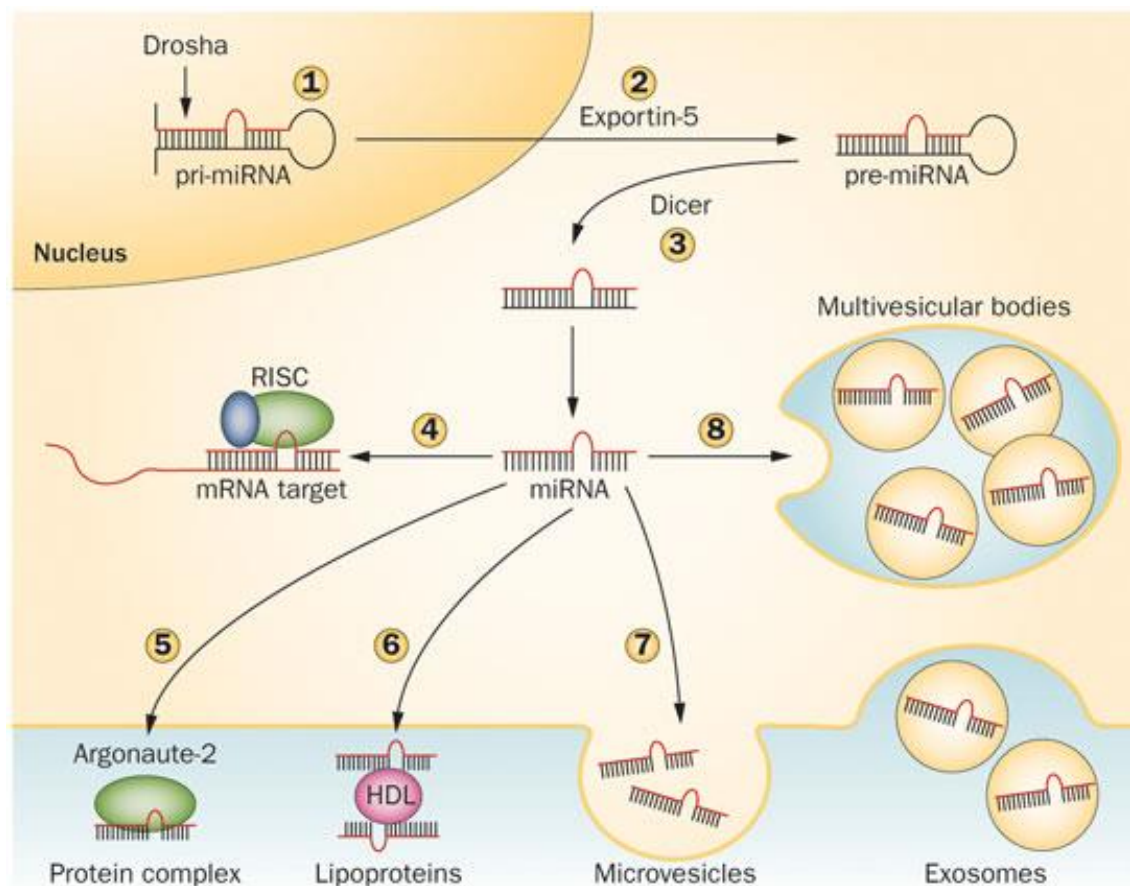


microRNA circolanti nel siero

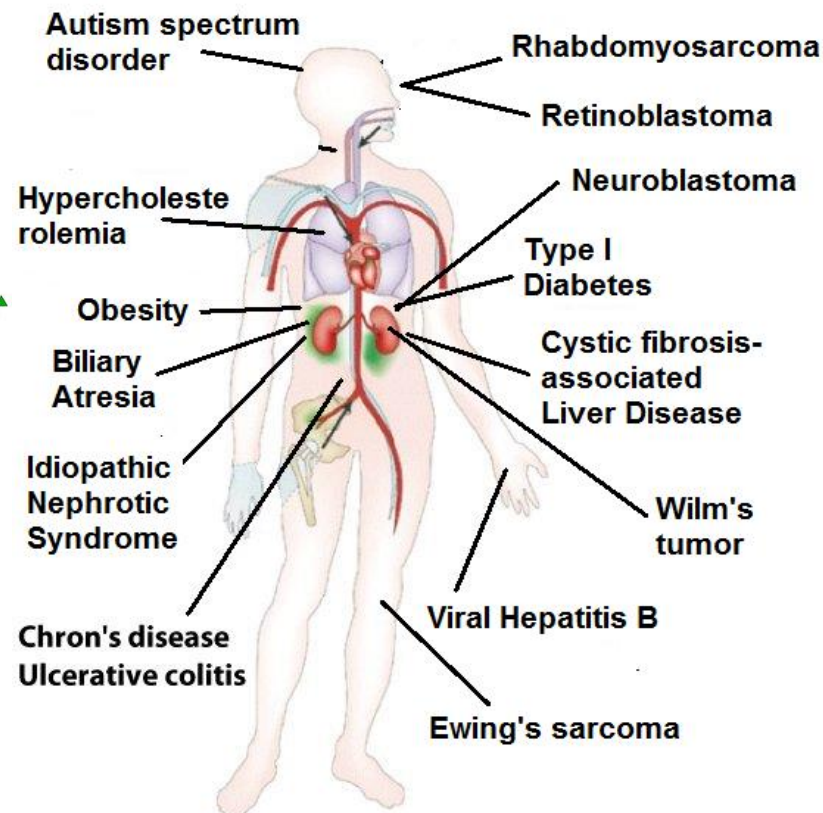
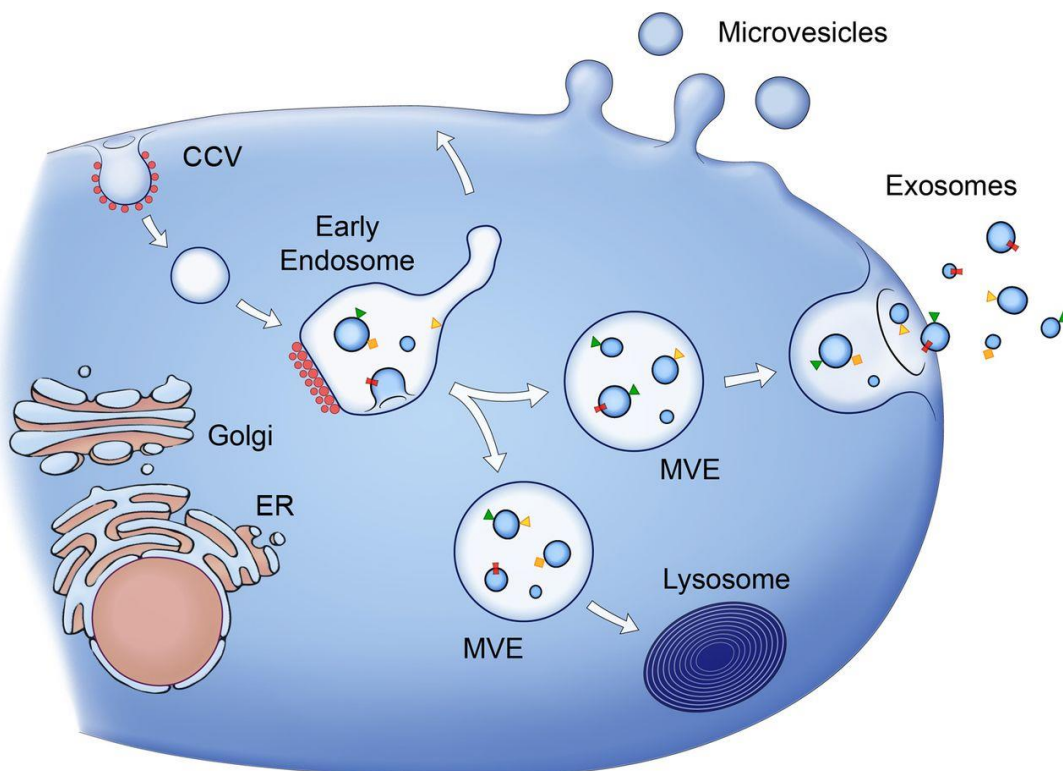
Stabili nel circolo
sanguigno

Stabili a condizioni
sperimentali drastiche
(alti valori di pH e
temperatura, presenza di
RNAsi, ripetuti cicli di
congelamento-
scongelo)

Dati Preliminari



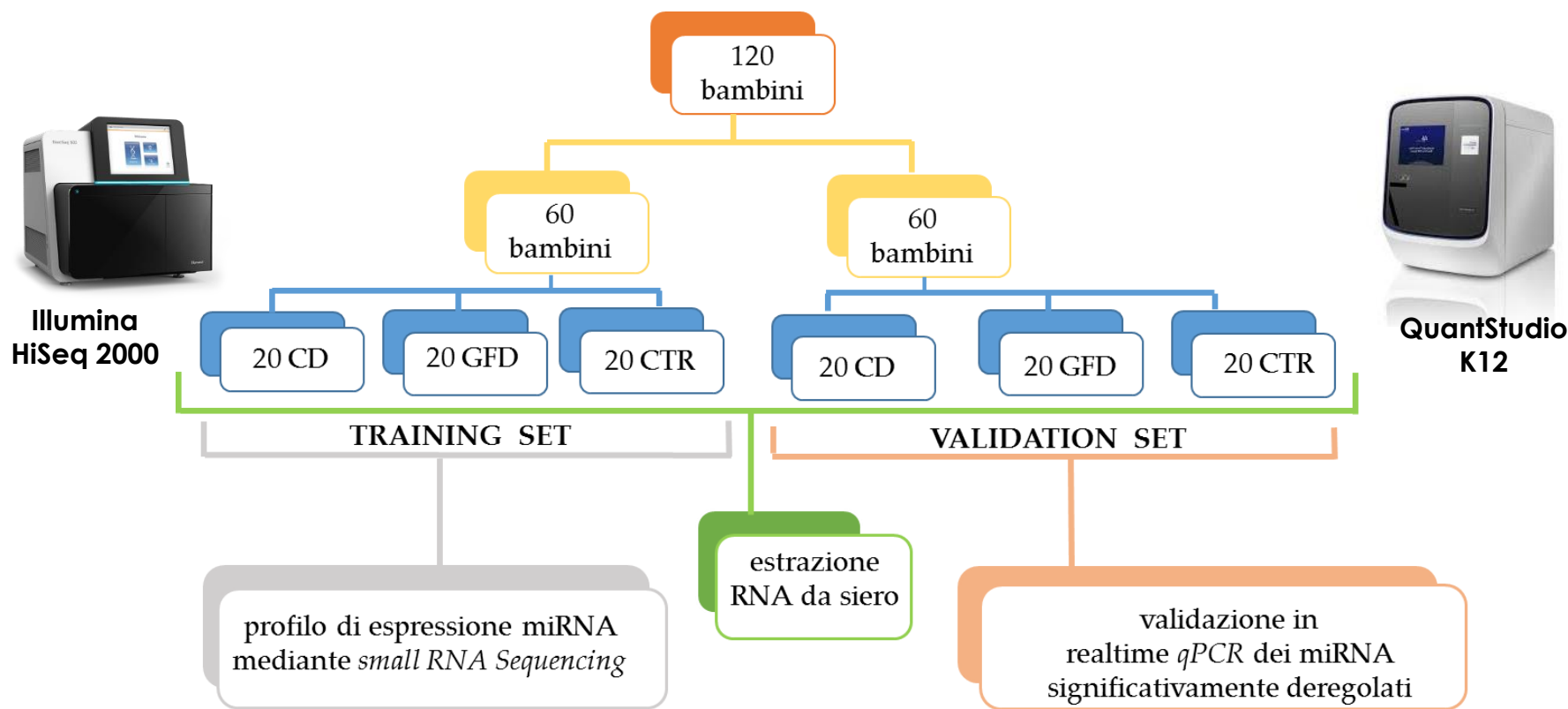
Dati Preliminari



Nostra ipotesi: I microRNA circolanti possono essere usati in combinazione con altri test sierologici come biomarcatori meno invasivi rispetto alla biopsia, per la diagnosi del CD e il monitoraggio dell'aderenza alla dieta priva di glutine?

Metodologia

Per l'identificazione dei microRNA circolanti nel siero dei controlli (n=20), dei pazienti celiaci (n=20) e a dieta priva di glutine (n=20), è stato utilizzato il sequenziamento di nuova generazione (NGS) seguito da una validazione mediante real-time qPCR.



Metodologia

Per confermare che l'espressione dei microRNA circolanti trovati significativamente disregolati nei pazienti celiaci e in quelli a dieta priva di glutine fossero effettivamente specifici della patologia e non dovuti alla semplice risposta infiammatoria, abbiamo confrontato i risultati con quelli ottenuti da una piccola coorte costituita da:

- **n=6 pazienti affetti da morbo di Crohn (MC)** e
- **n=6 pazienti affetti da rettocolite ulcerosa (RCU).**

(Casistica proveniente dall'Unità di Ancona – Prof. Catassi, Dr.ssa Gatti)

Inoltre su un subset di n=15 sieri (3 CTRL, 3 CD, 3 GFD, 3 MC e 3 RCU) abbiamo usato la nuova **tecnologia FirePlex**, che permette l'identificazione e la quantificazione di microRNA circolanti senza la necessità di estrazioni o eccessive manipolazioni del campione di partenza e con il semplice utilizzo di un citofluorimetro.

Metodologia

Preparazione del campione

- Controllo qualità per l'emolisi del campione.
- Estrazione di RNA mediante Norgen Slurry kit (500 μ l per NGS) e Exiqon Biofluids (250 μ l per qPCR).

Next Generation Sequencing

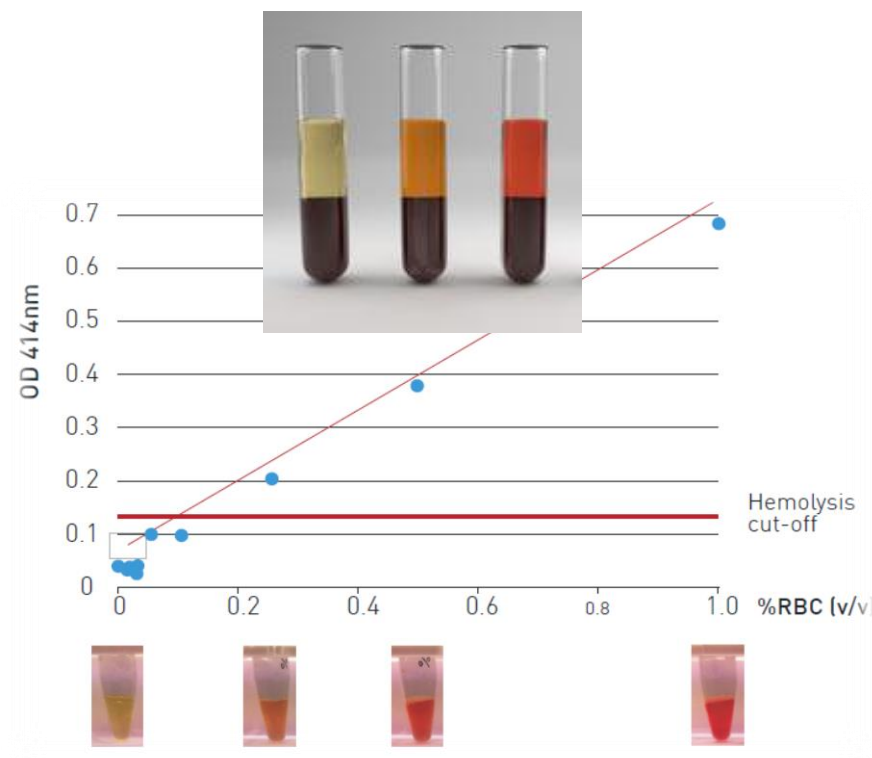
Illumina HiSeq 2000, >10M reads. Pipeline bioinformatica su piattaforma Galaxy, librerie DeSeq, miRDeep e isoMirSEA per analisi differenziale, di miRNA e di iso-miR.

qPCR

Quantstudio 12K su piastre Serum/Plasma
Exiqon da 180 miRNAs. GenEx software per analisi del dato e R Bioconductor per l'analisi di clustering.

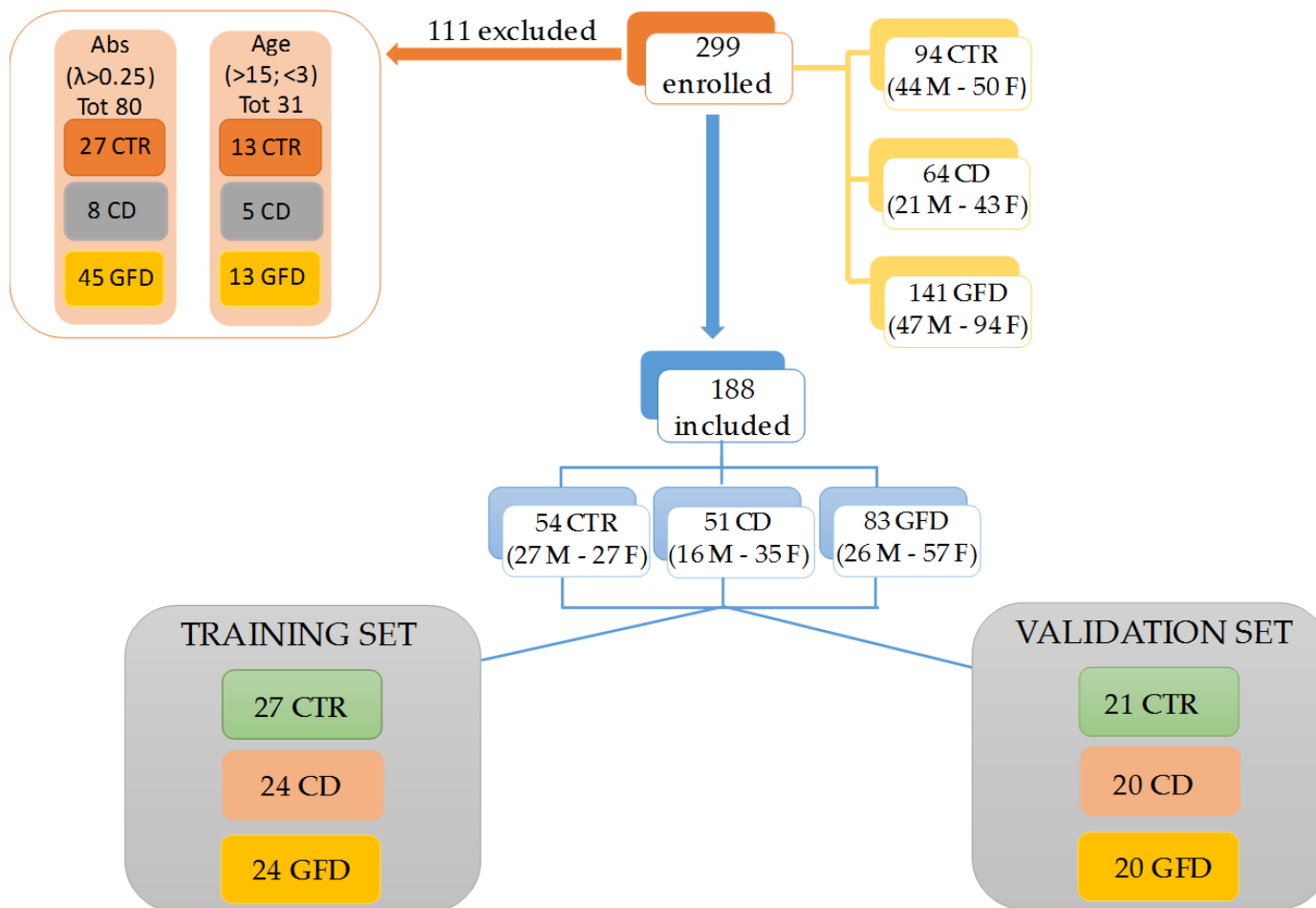
Statistica

SPSS ver 20 per analisi statistiche (ANOVA con correzioni post-hoc LSD e/o Bonferroni) e di correlazione con dati clinici.



Risultati

Casistica



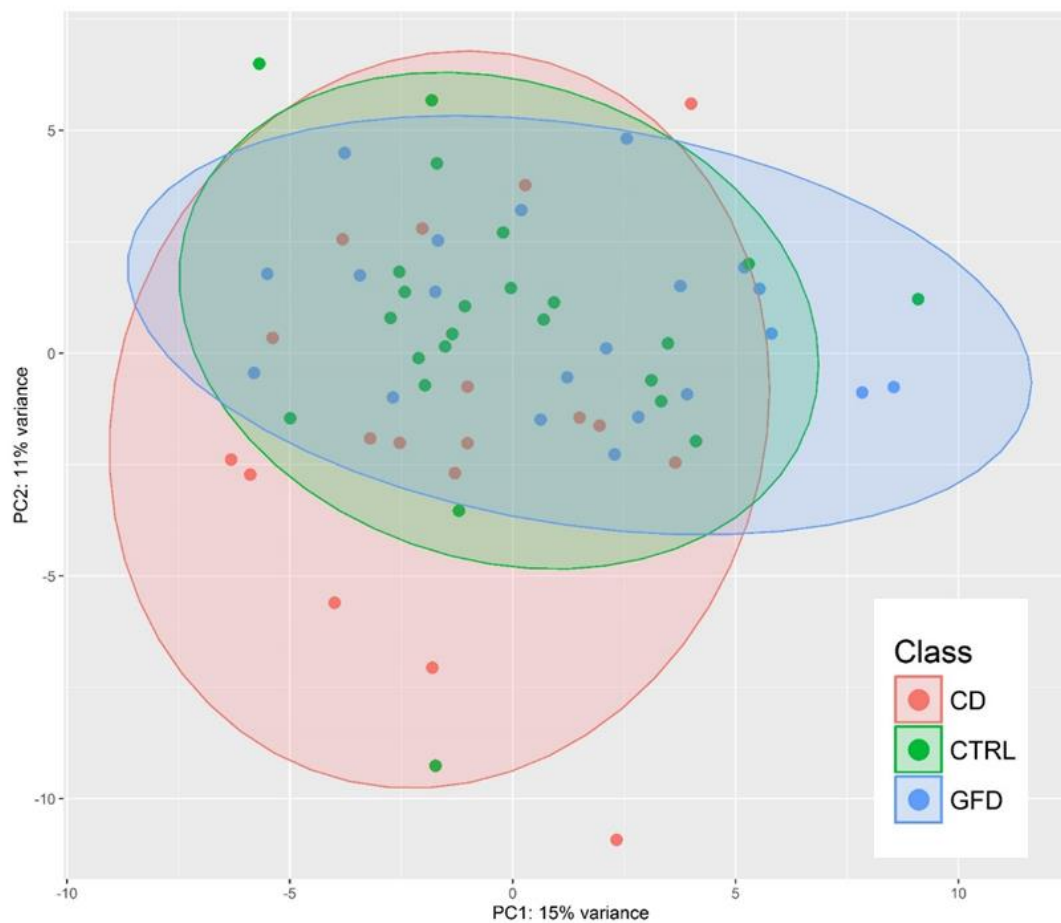
Casistica

Risultati

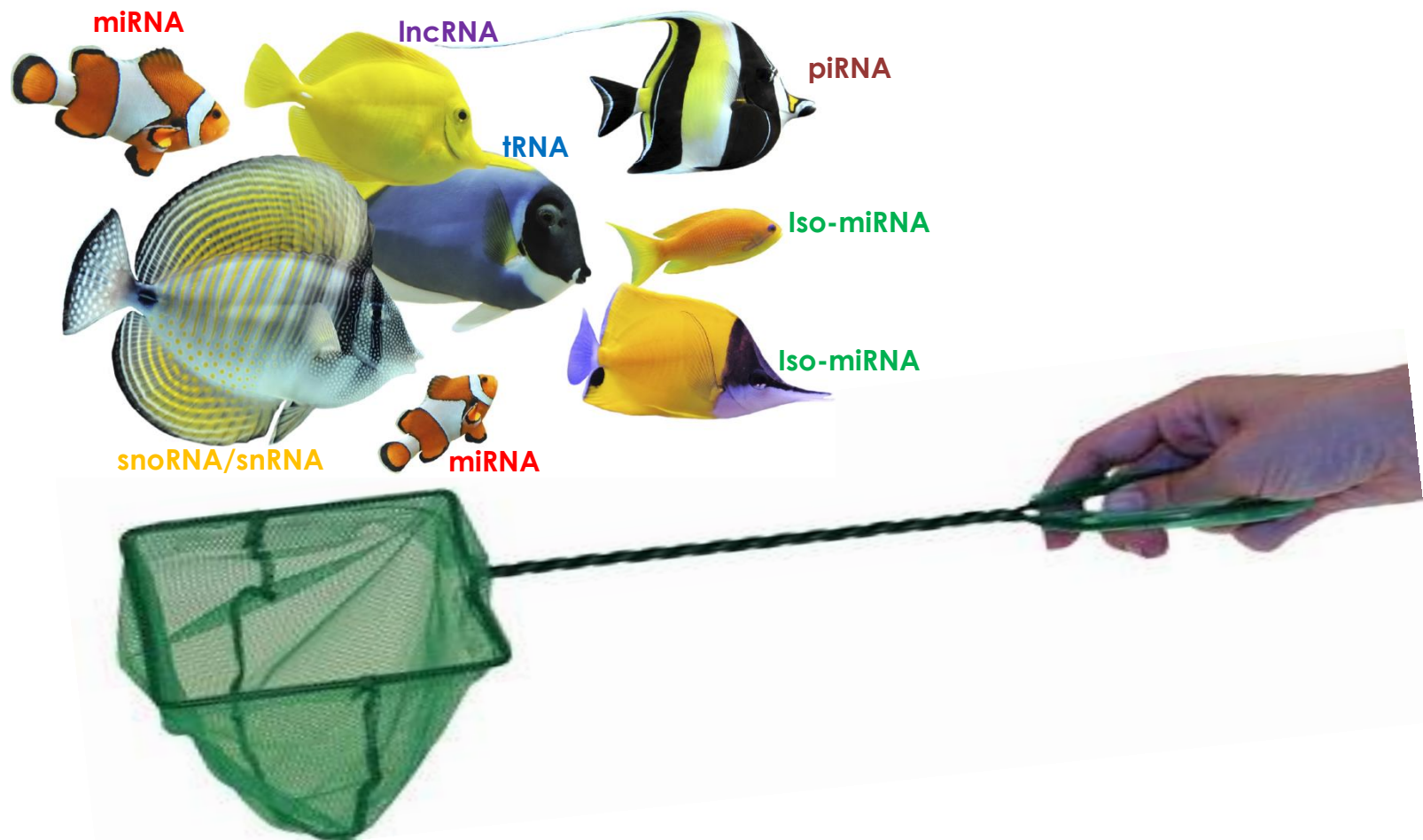
Characteristics	Active CD (n=40)	GFD (n=40)	CTRL (n=40)	MC (n=6)	RCU (n=6)
Sex Female (%)	56	52	55	66	66
Median Age (Years)	6 ± 3.5	6 ± 3.7	10±4	14±2.4	12±3.1
Clinical Presentation:					
Gluten-free diet (years)	NA	3.5 ±1.9	NA	NA	NA
Biopsy-confirmed % (n)	25 (10)	67 (27)	NA	NA	NA
Positive EMA (IgA)	100 (40)	NA	NA	NA	NA
Total serum IgA (mg/dL)	113 (<5 - 208)	126 (<5-328)	138.93 (37-221)	NA	NA
Total serum tTGA (U/mL)	1997.61(0.2 - 16757.4)	3.77(0.08 - 58.7)	<1.9 (<1.9 - 4.6)	NA	NA
HLA DQ2/DQ8 % (n)	90 (27)	25 (10)	10 (4)	NA	NA
Localization	Duodenal	Duodenal	NA	jejunum-stomach-ileum-colon-anus	pancolitis- colon-rectum
State of Disease	NA	in remission	NA	remission-minor-moderate	remission-minor-moderate
Therapy	NA	GFD	NA	AZA-5-ASA os e rectal-adalimumab-anti-TNF- exclusive polimeric diet	AZA-5-ASA os e rectal-VSL-3-prednisone

Risultati

Next-generation Sequencing

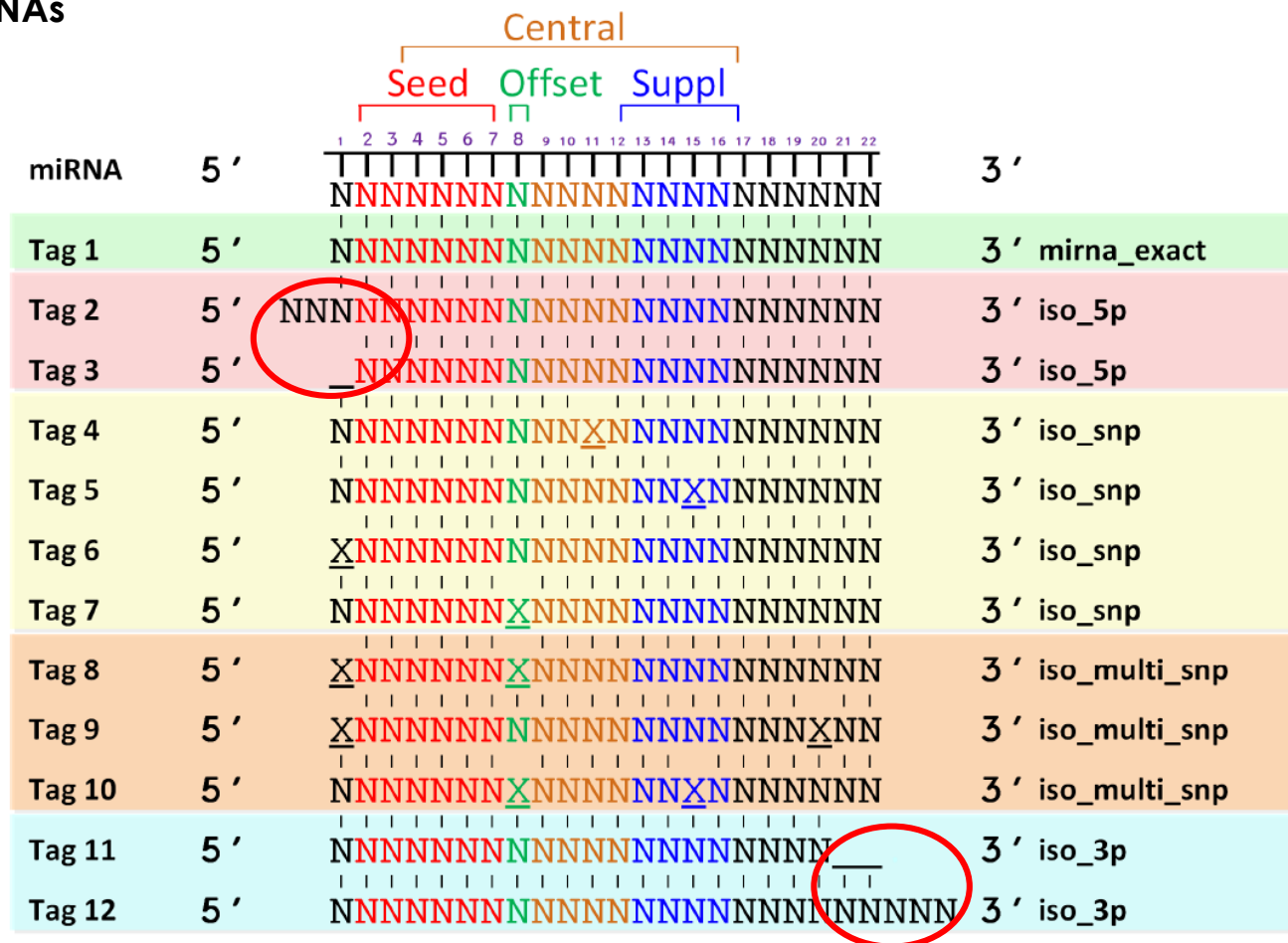


Risultati



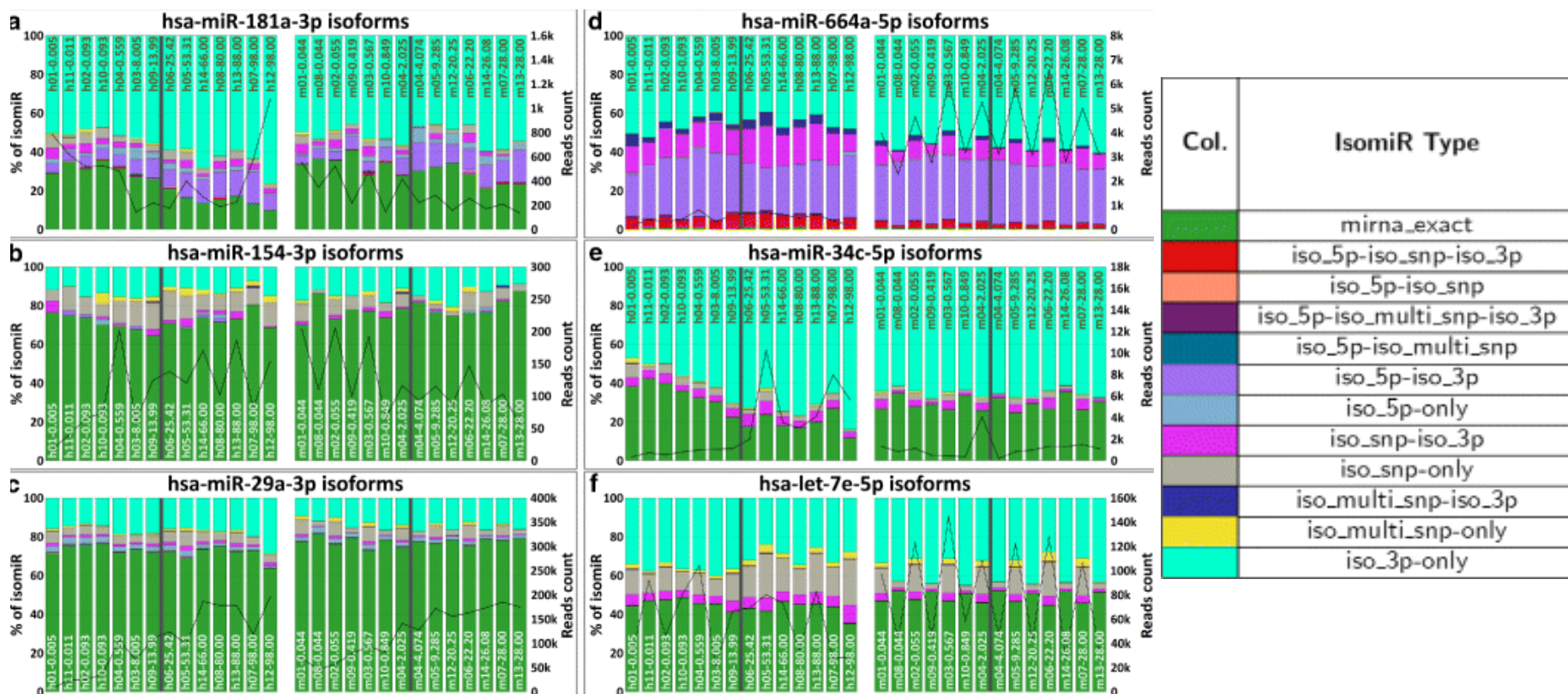
Risultati

Iso-miRNAs



Risultati

Iso-miRNAs



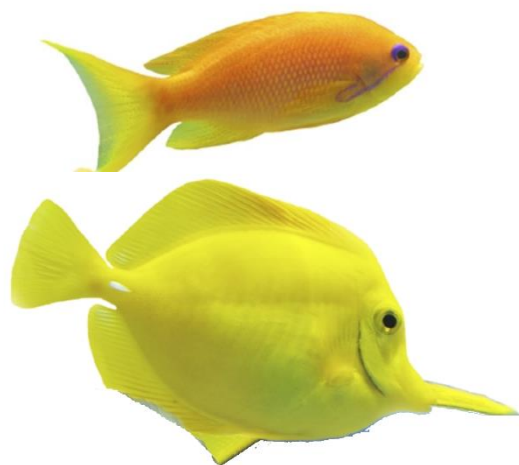
Urgese G, Paciello G, Acquaviva A, Ficarra E. **isomiR-SEA: an RNA-Seq analysis tool for miRNAs/isomiRs expression level profiling and miRNA-mRNA interaction sites evaluation.** *BMC Bioinformatics*. 2016 Mar 31;17:148.

Risultati

Real-time qPCR



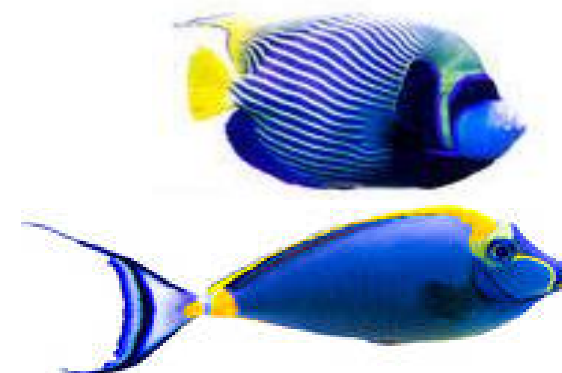
miR-100b-5p
miR-100b-3p



miR-133a
miR-133b



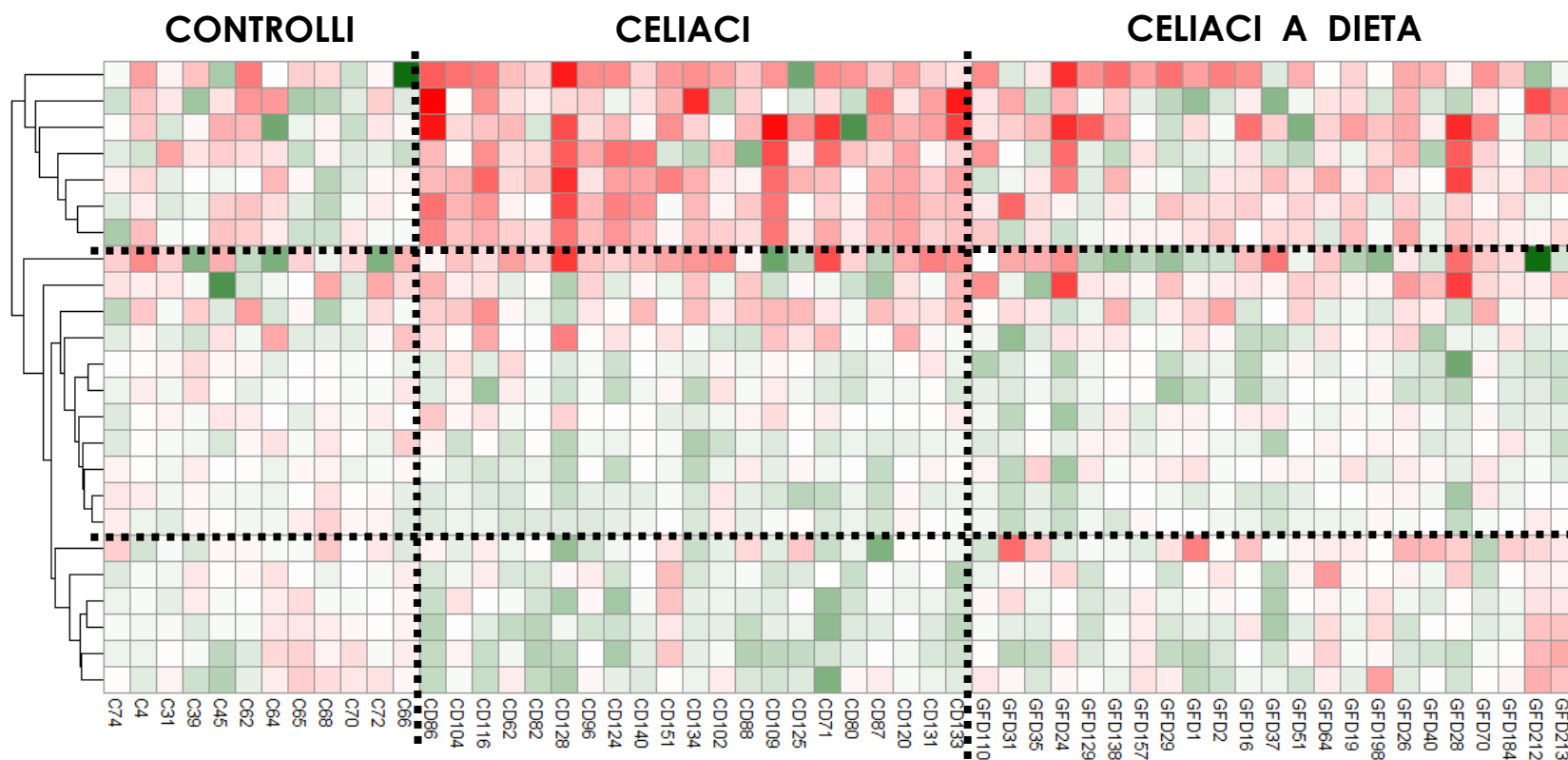
miR-155a
miR-146b



Risultati

Real-time qPCR

(24 miRNA significativi)

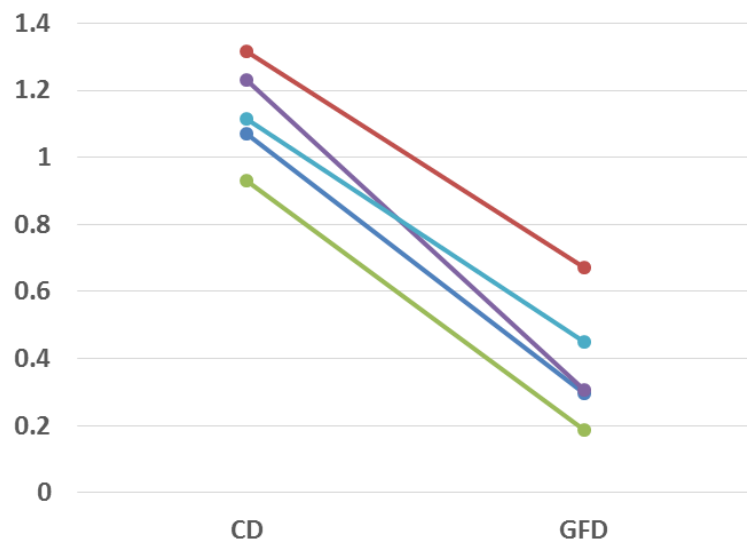


Risultati

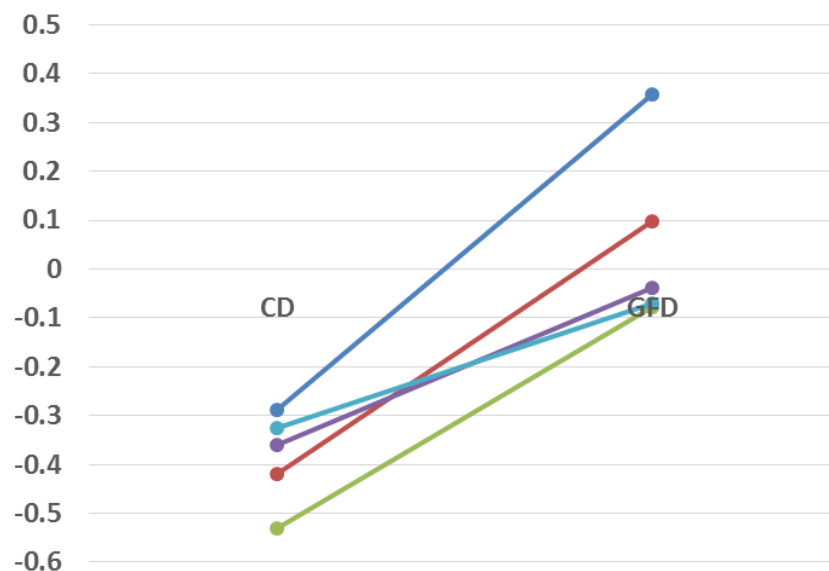
Correlazione di Spearman's con livelli di TG alla diagnosi e dopo la dieta

Dieci microRNA trovati significativamente modulati dopo analisi qPCR sono risultati significativamente correlati (o anti-correlati) all'andamento delle TG nei pazienti celiaci alla diagnosi e nei pazienti dopo dieta priva di glutine.

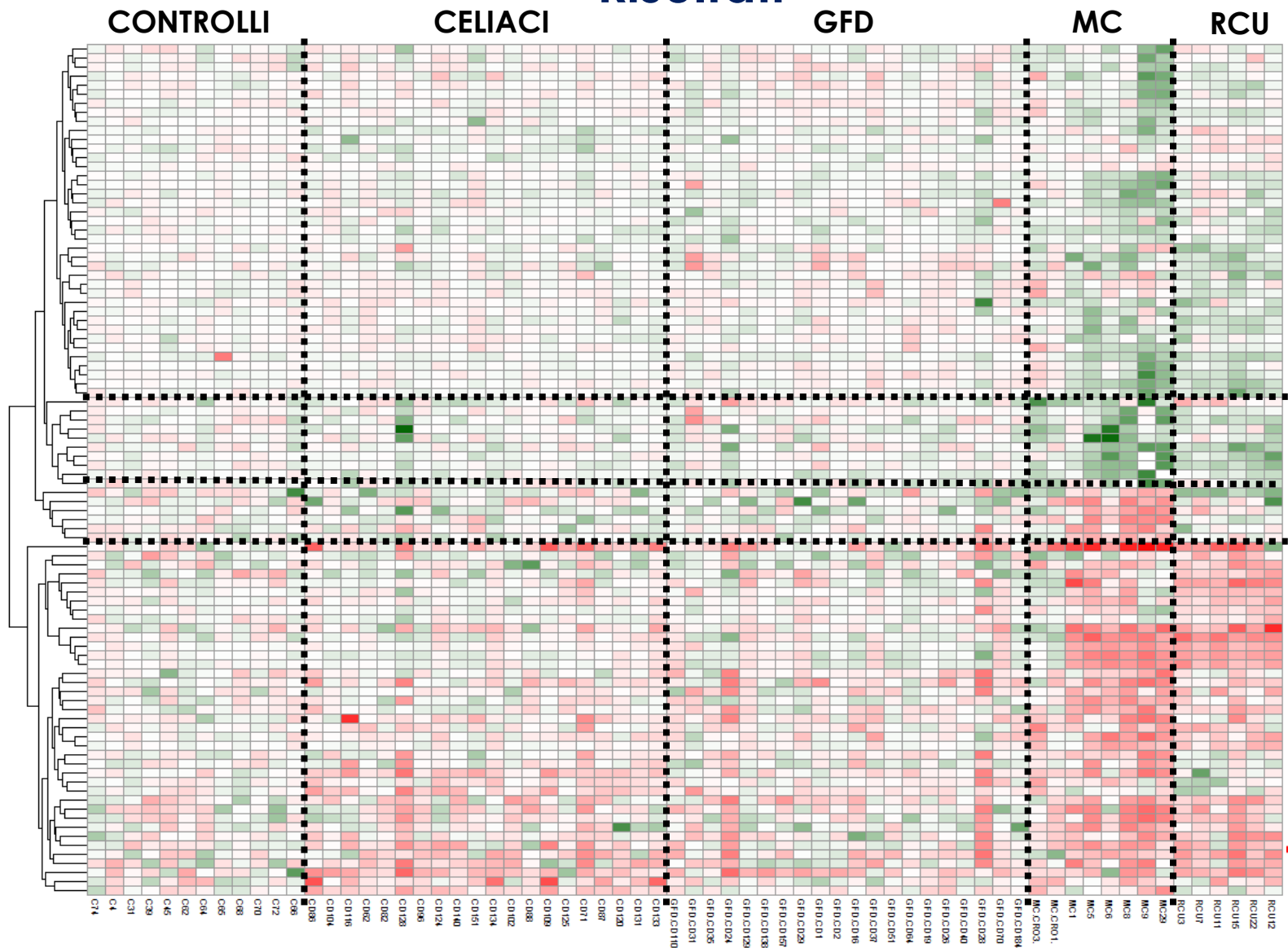
Livelli medi di espressione in LOG2
(positivamente correlati)



Livelli medi di espressione in LOG2
(negativamente correlati)



Risultati



Conclusioni

Il presente studio ha permesso di individuare un pannello di microRNA circolanti che possono essere utilizzati come possibili biomarcatori della malattia celiaca e della risposta ad una dieta priva di glutine.

Sono stati identificati microRNA circolanti in grado di predire la malattia celiaca nei casi 'borderline' (TG inferiore alle 10 volte il limite superiore) ed evitare così ulteriori indagini invasive (biopsia)

Il presente studio ha analizzato la performance di tre tecniche analitiche differenti, evidenziando i vantaggi e gli svantaggi di ciascun metodo.

Lo studio ha infine analizzato collateralmente i profili di espressione di altre malattie infiammatorie croniche intestinali, permettendo di ottenere utili dati preliminari per successivi studi.

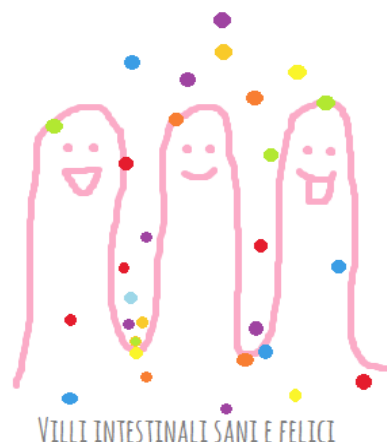
Prospettive

L'individuazione di microRNA circolanti quali possibili biomarcatori, ci consentirà di predisporre (ed eventualmente brevettare) **nuovi kit diagnostici** per monitorare la malattia celiaca, la risposta alla dieta, o la sua progressione.

Inoltre, ci proponiamo di mettere a punto **kit diagnostici portatili** come quelli già disponibili in commercio e realizzati attraverso l'utilizzo di strumenti trasportabili, portatili e palmari (ad esempio, il glucometro nel sangue) e kit test (ad esempio, PCR, HbA1c, omocisteina, test HIV salivare ed altri).

Pubblicazioni del Grant FC

- Felli C, Baldassarre A, Masotti A. **Intestinal and Circulating MicroRNAs in Coeliac Disease**. Int J Mol Sci. 2017 Sep 6;18(9). IF=3.226
- 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). IF=3.6



GRAZIE PER
L'ATTENZIONE