

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E CHIRURGIA

Dipartimento di scienze Chirurgiche, Oncologiche e Gastroenterologiche

U.O.C. Gastroenterologia

Direttore: Chiar.mo Prof. Fabio Farinati

TESI DI LAUREA

CROSSTALK TRA MICRORNA E STRESS

OSSIDATIVO NELLA MALATTIA CELIACA: UNO

STUDIO PILOTA

Relatore: Prof.ssa Fabiana Zingone

Correlatore: Dott.ssa Romilda Cardin

Laureanda: Giulia Sarasini

Matricola: 1176497

Anno accademico 2022/2023

Indice

RIASSUNTO	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUZIONE	5
CAPITOLO 1: LA MALATTIA CELIACA.....	5
1.1 STORIA.....	6
1.2 EPIDEMIOLOGIA	7
1.2.1 Differenze epidemiologiche nel mondo.....	8
1.2.2 Differenze epidemiologiche in base a sesso ed età.....	11
1.3 PATOGENESI.....	12
1.3.1 Predisposizione genetica.....	12
1.3.2 Ruolo del glutine.....	13
1.3.3 Ruolo del microbiota intestinale e dei fattori ambientali.....	15
1.4 PRESENTAZIONE CLINICA.....	17
1.4.1 Forma classica.....	18
1.4.2 Forma non-classica	19
1.4.3 Forma subclinica.....	22
1.4.4 Forma potenziale.....	22
1.4.5 Celiachia refrattaria (RCD).....	23
1.4.6 Patologie associate alla celiachia.....	24
1.5 DIAGNOSI.....	25
1.5.1 Screening per la celiachia	25
1.5.2 Sierologia	26
1.5.3 Celiachia sieronegativa.....	28
1.5.4 EGDS e biopsia duodenale	29
1.5.5 Tipizzazione genetica	33
1.6 TERAPIA	34
1.6.1 Dieta priva di glutine	34
1.6.2 Altri approcci terapeutici	37
CAPITOLO 2: MICRORNA E STRESS OSSIDATIVO	39
2.1 MICRORNA.....	39

2.2 RUOLO DEI miRNA NELLA PATOGENESI, DIAGNOSI E FOLLOW-UP DELLA MALATTIA CELIACA.....	40
2.2.1 miRNA nelle biopsie duodenali.....	40
2.2.2 miRNA circolanti.....	41
2.3 STRESS OSSIDATIVO	42
2.3.1 8-OHdG come biomarker di stress ossidativo	43
2.4 LO STRESS OSSIDATIVO NELLA MALATTIA CELIACA	45
2.4.1 Rapporto tra dieta aglutinata e stress ossidativo.....	45
2.5 STRESS OSSIDATIVO E miRNA A CONFRONTO	46
SCOPO DELLO STUDIO.....	50
MATERIALI E METODI.....	51
PAZIENTI	51
RACCOLTA DATI.....	51
ESTRAZIONE DEL DNA E QUANTIFICAZIONE DELL'ADDOTTO 8-OHdG DAI CAMPIONI BIOPTICI	52
ESTRAZIONE E QUANTIFICAZIONE DELL'ADDOTTO 8-OHdG E miRNA DAI PRELIEVI EMATICI	54
ANALISI STATISTICA	55
RISULTATI.....	56
Caratteristiche della popolazione studiata	56
Determinazione dei miRNA circolanti	57
Determinazione dell'addotto 8-OHdG.....	60
Confronto miRNA e 8-OHdG.....	62
DISCUSSIONE.....	64
CONCLUSIONI.....	69
BIBLIOGRAFIA.....	70

RIASSUNTO

Introduzione: Molti studi, condotti prevalentemente sulla popolazione pediatrica, suggeriscono che sia lo stress ossidativo sia differenti micro-RNA (miRNA) potrebbero giocare un importante ruolo nella patogenesi della malattia celiaca (MC). Tuttavia, la relazione tra lo stress ossidativo e le funzioni regolatorie dei miRNA nella MC rimangono ancora da chiarire.

Scopo dello studio: Questo studio pilota è stato condotto con lo scopo di valutare il ruolo dei miRNA e dello stress ossidativo in pazienti adulti con MC e di analizzarne le potenziali interazioni.

Materiali e metodi: Un totale di 51 soggetti è stato arruolato prospettivamente nello studio: n = 12 pazienti con malattia celiaca al momento della diagnosi (CD-dia); n = 18 pazienti celiaci a dieta senza glutine da almeno un anno (CD-fu); n = 5 pazienti con malattia celiaca complicata (CD-compl); n = 10 pazienti controlli, sottoposti ad EGDS per altre patologie diverse dalla MC (PC); n = 6 controlli sani (HC).

In questi soggetti sono stati raccolti prelievi ematici (tutti i gruppi) e biopsie duodenali (in tutti i gruppi tranne gli HC).

Basandosi sulla letteratura, sono stati quantificati attraverso q-RT-PCR nel plasma diversi miRNA coinvolti nella patogenesi della MC e aventi una nota relazione con lo stress ossidativo (miR-155, miR-200, miR-125, miR-192, miR-21, miR-451, miR-146 e miR-1226). Lo stress ossidativo è stato valutato attraverso la misurazione dei livelli dell'addotto 8-OHdG nel DNA estratto dal tessuto duodenale e dal sangue periferico, utilizzando il metodo HPLC-EC (*High Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection*).

Risultati: Tra i miRNA valutati, miR-451, miR-146, miR-155 e miR-1226 sono risultati essere espressi diversamente tra diversi gruppi. In particolare, i gruppi CeD-dia e CeD-fu hanno livelli significativamente inferiori di miR-451 ($p = 0.01$ e $p = 0.006$, rispettivamente) rispetto al gruppo HC. L'espressione di miR-146 nel gruppo CeD-dia e CeD-fu è risultata significativamente maggiore ($p = 0.03$ e $p = 0.01$, rispettivamente) rispetto al gruppo HC, inoltre è stato osservato un livello

maggiore dello stesso miRNA nel gruppo CeD-dia rispetto al gruppo CeD-fu ($p = 0.03$). L'espressione di miR-155 nei gruppi CeD-dia e CeD-fu è risultata maggiore rispetto al gruppo HC ($p = 0.05$ e $p = 0.06$, rispettivamente) L'espressione di miR-1226 è risultata maggiore nel gruppo CeD-compl rispetto ai gruppi CeD-dia, CeD-fu e HC, tuttavia non è stata raggiunta una significatività statistica.

I valori ematici di 8-OHdG sono risultati significativamente maggiori nei gruppi CeD-dia e CeD-fu rispetto al gruppo CP ($p = 0.03$ e $p = 0.002$, rispettivamente). Inoltre, è stato registrato un trend di livelli di 8-OHdG tissutale maggiori nel gruppo CeD-dia rispetto al gruppo PC ($p = 0.07$).

Nessuna correlazione è stata dimostrata tra i valori di 8-OHdG tissutale e quelli dei differenti miRNA analizzati. Al contrario, i valori di 8-OHdG ematico hanno dimostrato di correlare positivamente con miR-155 nel gruppo CeD-compl ($r = 0.9$, $p = 0.04$). Infine, valori di 8-OHdG ematico correlano negativamente con miR-125 nel gruppo CeD-dia, senza tuttavia raggiungere una significatività statistica ($r = 0.5$ e $p = 0.06$).

Conclusioni: I miRNA e lo stress ossidativo hanno un ruolo nella patogenesi della MC. In questo studio pilota, abbiamo dimostrato che una correlazione tra i due elementi potrebbe esistere, in particolare nei casi di celiachia complicata. Per definire se lo stress ossidativo sia capace di up o down-regolare alcuni miRNA o, al contrario, se l'espressione di determinati miRNA sia in grado di modulare la risposta allo stress ossidativo nei pazienti con MC, saranno necessari studi futuri e con casistica più ampia.

ABSTRACT

Introduction: Many studies, mostly conducted on pediatric patients, suggested that oxidative stress as well as several micro-RNAs (miRNAs) may play an important role in celiac disease (CD) pathogenesis. However, the interplay between oxidative stress and miRNAs regulatory functions in CD remains to be clarified.

Aims of the study: This pilot study was conducted to evaluate the role of miRNAs and oxidative stress in adult CD patients and to analyze their potential interactions.

Methods and materials: A total of 51 subjects were prospectively included in the study: n = 12 CD patients at the time of diagnostic upper GI endoscopy (CD-dia); n = 18 CD patients after at least one year on a gluten-free diet (CD-fu); n = 5 patients with complicated CD (CD compl); n = 10 control patients undergoing upper GI endoscopy for other diseases (PC); n = 6 healthy controls (HC).

In these subjects, a blood sample and duodenal biopsies were collected. Based on a literature search, several miRNAs involved in the pathogenesis of CD and with a known relationship with oxidative stress (miR-155, miR-200, miR-125, miR-192, miR-21, miR-451, miR-146 and miR-1226) were quantified with qRT-PCR in plasma. Oxidative stress was valuated through the measurement of the levels of 8-OHdG adduct in the DNA extracted from the duodenal tissue and from peripheral blood using High Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection (HPLC-EC).

Results: Among the evaluated miRNAs, miR-451, miR-146 and miR-155 were differentially expressed between groups. In particular, compared to HC, CD-dia and CD-fu groups have significantly lower levels of miR-451 (p=0.01 and p=0.006, respectively). The expression of miR-146 in CD-dia was significantly higher compared to CD-fu patients (p = 0.03), while HC demonstrated lower levels compared to both CD-dia and CD-fu (p=0.03 and p=0.01, respectively). A trend toward lower levels of miR-155 was shown in HC compared to CD-dia (p = 0.05) and CD-fu (p = 0.06). Levels of miR-1226 were higher in CeD-comp compared to the other groups, but p wasn't significant. In 6 patients with available samples both

at CD diagnosis and during follow-up, no differences in miRNAs levels were detected.

The blood level of 8-OHdG were significantly higher in CD-dia and CD-fu patients compared to PC ($p = 0.03$ and $p = 0.002$, respectively). Moreover, a trend to a higher duodenal tissue level of 8-OHdG in CD-dia compared to PC was shown ($p = 0.07$). Blood 8-OHdG levels were positively correlated with miR-155 in CD compl ($r = 0.9$, $p = 0.04$). Moreover, a trend to a lower level of miR-125 compared to circulating 8-OHdG was shown in CeD-dia ($p = 0.06$).

Conclusion: miRNAs and the oxidative stress have a role in the pathogenesis of CD. In this pilot study, we showed that an interplay between these two may exist, in particular in complicated CD. Whether oxidative stress is able to up- or downregulate some miRNAs or, conversely, whether miRNAs expression is capable to modulate the response to oxidative stress in CD patients should be evaluated in future larger studies.

INTRODUZIONE

CAPITOLO 1: LA MALATTIA CELIACA

La malattia celiaca è una enteropatia autoimmune scatenata dall'interazione tra fattori ambientali e genetici (1,2). In seguito all'assunzione di glutine, negli individui geneticamente suscettibili, si sviluppa un processo infiammatorio cronico a carico della mucosa del piccolo intestino (1,2). Il glutine è la frazione proteica di stoccaggio presente nei cereali come frumento, segale e orzo, e comprende due principali tipologie di proteine, gliadine e glutenine (ordeine e secaline in orzo e segale, rispettivamente). Gliadine e glutenine hanno un elevato contenuto di prolina e glutammina, amminoacidi resistenti alla proteolisi enzimatica a livello del tratto gastrointestinale a causa della mancanza della prolil-endopeptidasi nell'intestino umano, dove la presenza di tali amminoacidi può innescare reazioni immunitarie in pazienti predisposti (1,3). In aggiunta ai fattori ambientali, la suscettibilità alla malattia celiaca dipende anche dal background genetico. Infatti, la patologia risulta essere associata a specifici HLA (*human leukocyte antigen*), in particolare HLA-DQ2, presente nel 90-95% dei pazienti con malattia celiaca, e HLA-DQ8, riscontrato nel restante 5-10% dei casi. Possiamo dunque affermare che l'eziopatogenesi della malattia celiaca è multifattoriale (1,4). La presentazione clinica della MC è estremamente variabile e include sintomi gastrointestinali classici e non, manifestazioni extraintestinali e casi subclinici. La malattia si associa al rischio di sviluppare complicanze, come osteoporosi e linfomi intestinali. La diagnosi della MC richiede la presenza di sierologia positiva e di atrofia dei villi a livello della biopsia del piccolo intestino (5). La terapia per i pazienti con malattia celiaca è una dieta priva di glutine da mantenere per tutta la vita. L'assunzione continuativa di glutine nonostante la presenza della malattia può esacerbare i sintomi clinici, promuovere il danno intestinale e aumentare il rischio futuro di cancro, in particolare per quanto riguarda l'adenocarcinoma del piccolo intestino, il cancro dell'esofago, il melanoma e il linfoma non-Hodgkin (6). Nonostante ciò, esistono diversi problemi che potrebbero ostacolare l'aderenza del paziente alla dieta, come scarsa disponibilità degli alimenti, costi elevati, contaminazioni e/o la natura restrittiva della dieta stessa. Per questo motivo è fondamentale intraprendere un follow-up per verificare l'aderenza dei pazienti alla dieta priva di glutine (7).

1.1 STORIA

La prima descrizione della malattia celiaca è stata attribuita ad Areteo di Cappadocia (II secolo d. C.) (8), successivamente nel 1887 Samuel Gee, medico pediatra britannico, riprese le informazioni ricavate da Areteo e le riassunse in una singola pubblicazione. Nel suo studio Gee si riferiva in particolare all'aspetto delle feci, alla debolezza muscolare, al gonfiore addominale e al decorso cronico della malattia, suggerendo inoltre che cibi come riso, frutta e verdura portassero ad una regressione della sintomatologia (8,9).

Agli inizi del 1900 Osborne studiò il contenuto proteico dei cereali, definendo per la prima volta le prolamine come gliadina, ordeina e secalina. Negli anni '50 poi queste ultime vennero identificate come possibili driver della malattia celiaca anche grazie agli studi di Willem Dicke, pediatra olandese che ideò una serie di test alimentari che evidenziavano l'insorgenza di steatorrea in seguito all'ingestione di grano e segale, sospettando quindi la presenza di un "fattore" all'interno del grano responsabile dell'insorgenza della sintomatologia gastrointestinale (10, 11). Agli stessi anni risale la prima descrizione delle caratteristiche istologiche dell'enteropatia da glutine, grazie alla quale vennero stabiliti dei criteri diagnostici per la malattia celiaca. Contemporaneamente fu inoltre riportata la reversibilità del danno intestinale in corso di dieta aglutinata stretta.

Negli anni '70 venne studiata la suscettibilità genetica alla MC ed in particolare HLA-DQ2 fu identificato come il principale responsabile di tale predisposizione. Si scoprì inoltre la correlazione con altre patologie autoimmuni come il diabete mellito di tipo I. Successivamente, grazie a studi degli anni '80 e '90, venne individuato il ruolo degli anticorpi anti-transglutaminasi e i meccanismi coinvolti nella determinazione dell'atrofia dei villi.

Infine, negli ultimi 20 anni le ricerche si sono concentrate sul ruolo della risposta immunitaria extra intestinale, in particolare sui linfociti CD4+ e CD8+, ma anche sulle citochine come IL-2. Sono ad oggi in corso numerosi studi che hanno lo scopo di identificare target terapeutici utili per la MC, ma ad oggi l'unica terapia approvata rimane la dieta aglutinata stretta. Analogamente, diversi studi hanno recentemente provato ad identificare dei metodi per ridurre il rischio di sviluppare la malattia celiaca nei bambini predisposti. Oggi sappiamo che gli elementi che sono in grado di influenzare l'esordio della patologia sono la quantità di glutine assunto, le infezioni e/o cambiamenti del microbioma (10).

1.2 EPIDEMIOLOGIA

Sia la prevalenza sia l'incidenza della malattia celiaca sono aumentate nelle ultime tre decadi e ciò può essere dovuto non solo ad un aumento del tasso di rilevamento della patologia (grazie al miglioramento dei test diagnostici, semplificazione dei criteri di diagnosi e aumento della consapevolezza della malattia stessa), ma anche alla modernizzazione e alla globalizzazione. Queste ultime infatti hanno contribuito ad apportare modifiche alle abitudini alimentari, come un incremento della consumazione di cibi pronti e contenenti glutine (12). Attualmente, grazie a screening sierologici rivolti ai pazienti a rischio o con sospetto clinico, è noto che la malattia celiaca nei paesi occidentali ha una prevalenza dell'1% circa e che può colpire tutte le classi di età con un rapporto maschi/femmine variabile tra 1:3 e 1:1,5 (13).

L'epidemiologia della malattia celiaca può essere esaustivamente concettualizzata dal cosiddetto modello iceberg (14). (Figura 1)

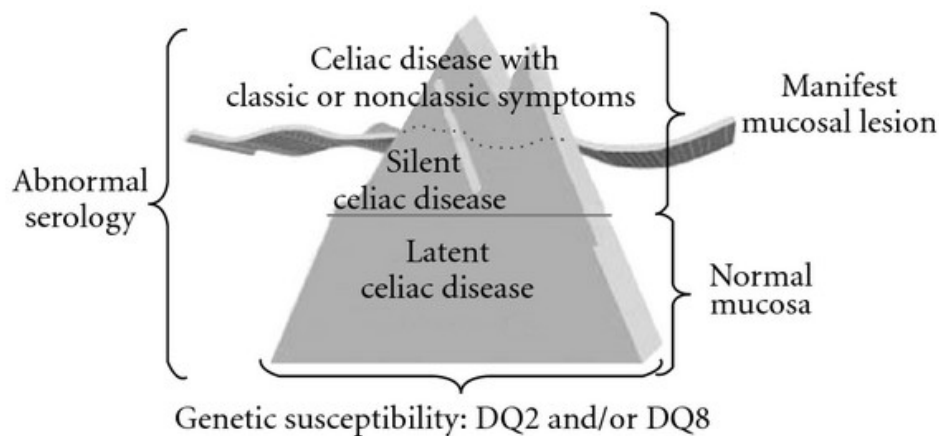


Figura 1: modello "iceberg" della malattia celiaca. Modificato da Lionetti et al (18).

Secondo questo modello la MC, analogamente ad altri disordini sotto-diagnosticati, può essere descritta come un iceberg nel quale la "punta" rappresenta i casi diagnosticati di celiachia manifesta (pazienti con predisposizione genetica, sierologia positiva, istologia compatibile e sintomatologia presente), mentre la porzione di dimensioni maggiori che rimane sommersa è costituita dai casi di celiachia subclinica e di celiachia

potenziale. In ambedue le casistiche si tratta di pazienti predisposti geneticamente, tuttavia il primo gruppo, quello dei "celiaci subclinici", include pazienti con

alterazioni della mucosa duodenale attribuibili al danno da glutine ma che rimangono asintomatici; i “celiaci potenziali”, invece, non presentano lesioni istologiche. Si stima che per ogni caso diagnosticato di celiachia, mediamente altri cinque-dieci casi rimangano misconosciuti (15, 16). Ciò conduce al mancato trattamento della condizione, esponendo i pazienti a tutta una serie di rischi e complicanze a lungo termine. Dunque, sebbene nelle ultime decadi la diagnosi della MC sia notevolmente migliorata, numerosi casi rimangono ancora oggi misconosciuti (15, 16, 17,18).

1.2.1 Differenze epidemiologiche nel mondo

La celiachia è stata a lungo considerata una patologia rara, diffusa soprattutto in pazienti pediatrici di origine europea e di quelle regioni del pianeta colonizzate da europei, quali Nord America e Australia (2,19). Nel corso degli anni, grazie al crescente impiego di metodiche diagnostiche sierologiche ad alta sensibilità e specificità, è stato possibile valutare l’effettiva prevalenza a livello mondiale della celiachia (18,19,20).

Oggi è noto che la malattia celiaca è diffusa in tutto il mondo. Una review sulla prevalenza globale della MC ha identificato una sieroprevalenza media dell’1,4%, con una variabilità tra i diversi continenti che va dall’1,1% dell’Africa e 1,3% del Sud America fino all’1,8% dell’Asia, mentre l’Europa si colloca in una posizione intermedia. (Figura 2)

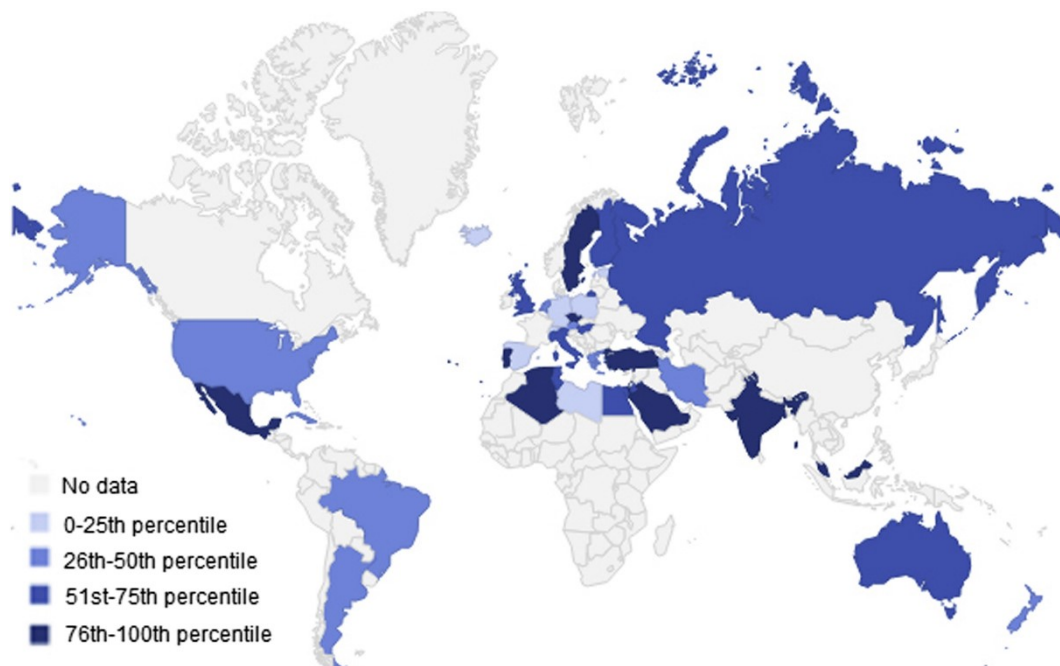


Figura 2: Siero-prevalenza a livello mondiale della malattia celiaca. I valori sono stati stratificati in 4 gruppi di percentili. Il primo gruppo (0-25° percentile) include quei paesi con una prevalenza dello 0,2-0,8%, mentre l'ultimo (76-100° percentile) corrisponde ad una prevalenza del 2,1-8,5%, Singh et al (20).

Questi dati potrebbero sovrastimare la vera prevalenza della MC a causa della non eccellente specificità della sierologia utilizzata nella diagnosi della celiachia. Infatti, se andiamo a considerare la prevalenza della patologia a livello mondiale basandoci sui casi diagnosticati attraverso la biopsia, questa scende a 0,7%. Se la prevalenza basata sulla sierologia può condurre ad una sovrastima, al contrario considerando esclusivamente la diagnosi con biopsia si rischia di sottostimare la condizione, perché non tutti gli individui testati attraverso la sierologia accettano di sottoporsi ad una valutazione endoscopica completa (20, 21). La stessa review citata per la sieroprevalenza della malattia celiaca afferma che la prevalenza basata sull'esecuzione di biopsie risulta maggiore in Europa (0,8%) e Oceania (0,8%) e minore in Sud America (0,4%) (20). (Figura 3)

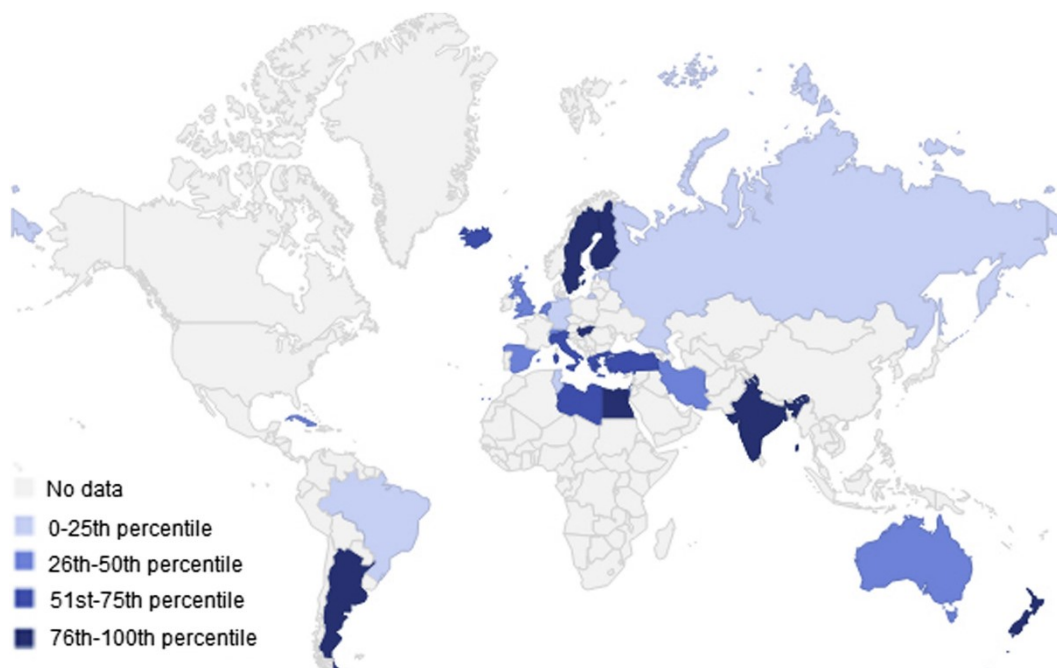


Figura 3: Prevalenza a livello mondiale della malattia celiaca (basata su biopsie). I valori sono stati stratificati in 4 gruppi di percentili. Il primo gruppo (0-25° percentile) include quei paesi con una prevalenza dello 0,2-0,4%, mentre l'ultimo (76-100° percentile) corrisponde ad una prevalenza del 0,9-2,4%, Singh et al (20).

I fattori responsabili di queste differenze tra continenti sono genetici, inclusi sia geni HLA sia non-HLA, e ambientali, come il consumo di grano ed età alla quale viene introdotto nella dieta, pratiche di alimentazione infantile, infezioni gastrointestinali, utilizzo di antibiotici ed inibitori di pompa protonica e tasso di utilizzo del taglio cesareo (20).

È doveroso sottolineare che le differenze nella prevalenza della malattia celiaca non esistono solamente a livello intercontinentale, ma anche tra i diversi stati all'interno di uno stesso continente (20,22). Infatti, per esempio, in Africa la prevalenza dell'aplotipo HLA-DQ2 e il consumo di grano sono significativamente inferiori nell'Africa sub-Sahariana rispetto al Nord del continente. Di conseguenza, è molto probabile che la maggior parte della popolazione del sub-Sahara sia meno suscettibile alla malattia celiaca rispetto al resto dell'Africa (20).

Per quanto riguarda l'Europa, sono state riscontrate importanti differenze tra i diversi paesi: la prevalenza più elevata si ha in Finlandia, con il 2,4%, mentre la Germania si colloca all'ultimo posto con lo 0,3%, in Italia è invece dello 0,7% (23). Considerando i bambini con meno di 10 anni, in Europa l'incidenza maggiore è in Svezia (3%): i bambini svedesi hanno un rischio di sviluppare la patologia 1.4 e 1.8 volte maggiore in confronto ai coetanei finlandesi e tedeschi, rispettivamente; le ragioni di tali differenze sono ambientali, genetiche ed epigenetiche (24).

Negli Stati Uniti la prevalenza è di circa lo 0,8%, con un gradiente registrato all'interno della popolazione stessa che vede la percentuale aumentare nel sottogruppo etnico di origine europea, dunque la popolazione bianca americana di origine non ispanica, rispetto a quella afroamericana, nella quale la prevalenza è inferiore (25,26). Per quanto riguarda il Centro e il Sud America la situazione è particolare, perché solamente in alcuni stati, come Messico e Brasile, sono stati effettuati studi con screening sierologici volti ad identificare i casi positivi. Tuttavia, esclusivamente in Brasile le persone con sierologia compatibile con malattia celiaca sono state invitate ad un approfondimento endoscopico e istologico (27). La prevalenza più alta in Sud America si registra in quelle regioni in cui, oltre ad uno studio più approfondito della patologia, c'è stata una maggior immigrazione di persone di origine caucasica, come il Brasile e l'Argentina (28).

Per quanto riguarda invece il continente asiatico è da sottolineare che in Cina e in Giappone la prevalenza è molto bassa, mentre risulta più elevata in Israele e in India (29). In riferimento a quest'ultima, è stato registrato un evidente gradiente di

prevalenza Nord-Sud; nel dettaglio la percentuale decresce partendo dalle regioni settentrionali (1,2%), passando per le nord-orientali (0,8%) fino al sud dell'India (0,1%). La ragione di tali differenze risiede nelle diverse abitudini alimentari all'interno della stessa nazione, ed in particolare nel maggior consumo di glutine da parte della popolazione dell'India settentrionale, se comparato a quello dei connazionali residenti più a sud (30).

1.2.2 Differenze epidemiologiche in base a sesso ed età

Numerosi studi, nel corso degli anni, hanno approfondito le differenze epidemiologiche della malattia celiaca tra i due sessi. Una recente metanalisi dichiara che la prevalenza della patologia è 1.5 volte maggiore nelle donne rispetto agli uomini (20). Altri studi di popolazione, invece, affermano che la maggior prevalenza nel sesso femminile può essere considerata reale solamente nella popolazione adulta, mentre nei giovani e negli anziani la prevalenza tra uomini e donne è paragonabile (31,32).

Nel tentativo di dare una spiegazione alle differenze riscontrate tra i due sessi in termini di prevalenza, negli ultimi anni sono state approfondite le possibili motivazioni. Diversi studi confermano che gli uomini sono meno propensi a sottoporsi ad esami endoscopici quali la EGDS (esofagogastroduodenoscopia) per indicazioni come la diarrea e la perdita di peso, fattore che, già in partenza, può contribuire alla sotto-diagnosi della condizione nel sesso maschile (20, 33). È inoltre noto che esistono importanti differenze in termini di sintomatologia alla diagnosi tra i due sessi (34). Infatti, nelle donne risultano essere più frequenti i sintomi gastrointestinali come gonfiore addominale, nausea e vomito rispetto agli uomini, nei quali l'unico sintomo intestinale più frequente è la steatorrea. Anche sintomi psichici come ansia e depressione, e segni clinici, laboratoristici e radiologici quali anemia, bassa statura, perdita di peso (35) e osteoporosi (36) sono stati riscontrati più frequentemente nel sesso femminile. Proprio a causa della maggior frequenza di tali segni e sintomi, le donne tendono a sottoporsi più frequentemente ad indagini ed approfondimenti medici (35,36,37) e, infatti, vengono in media diagnosticate 4 anni prima rispetto ai pazienti di sesso maschile (36).

Bisogna inoltre sottolineare che la malattia celiaca è una patologia autoimmune ed è assodato che il sesso può influenzare la prevalenza, la severità e l'espressione

delle malattie su base autoimmunitaria. Le ragioni principali di tali differenze sono genetiche ed ormonali, ma anche il microbiota intestinale gioca un ruolo importante (38). Secondo recenti studi, le differenze tra maschi e femmine che vengono riscontrate alla diagnosi si riducono poi durante il follow-up (FU), dimostrando che non vi è una significativa discrepanza nell'aderenza alla dieta aglutinata e al FU stesso (38,39).

Per quanto riguarda le differenze epidemiologiche in base all'età, la malattia celiaca è stata a lungo considerata un disturbo prevalentemente diagnosticato in pazienti pediatrici (2,19). Attualmente i dati sono controversi: una recente metanalisi sostiene che la celiachia viene diagnosticata due volte più frequentemente nei bambini rispetto agli adulti (20), mentre altri studi dichiarano che la patologia oggi si riscontra soprattutto nella fascia di età adulta (22,40). È inoltre importante considerare che spesso la MC rimane misconosciuta a lungo e quindi la diagnosi può avvenire in età molto più avanzata rispetto all'esordio della malattia, aumentando dunque il rischio di complicanze a lungo termine (14,20,40).

1.3 PATOGENESI

1.3.1 Predisposizione genetica

È ormai assodato che la predisposizione genetica è fondamentale per l'instaurarsi della malattia celiaca (1,4,20), e ciò è dimostrato dalla presenza di evidenti cluster familiari (41). Infatti, sussiste un tasso di concordanza tra gemelli monozigoti del 50-80% (41), del 10% tra gemelli dizigoti (42), del 7,5% tra i parenti di primo grado e del 2,3% in quelli di secondo grado (43). Esistono inoltre delle piccole differenze in base alla tipologia di legame familiare: la prevalenza della malattia è del 9% nei fratelli dei pazienti affetti, dell'8% nella prole e del 3% nei genitori (43).

I geni che predispongono alla malattia celiaca sono quelli codificanti per il sistema HLA (*Human Leukocyte Antigen*) di classe II, un eterodimero costituito da due catene peptidiche espresso sulla superficie delle cellule presentanti l'antigene (APC). Tali catene sono codificate da geni denominati rispettivamente HLA-DQA1 e HLA-DQB1, localizzati sul braccio corto del cromosoma 6, ciascuno dei quali può presentare alleli differenti, dalla combinazione dei quali derivano poi diversi aplotipi (41,43,44). Gli aplotipi che sono stati associati alla malattia celiaca sono HLA-DQ2.5 (codificato da DQA1*05 e DQB1*02), HLA-DQ2.2 (codificato da DQA1*02:01 e DQB1*02) oppure HLA-DQ8 (codificato da DQA1*03 e

DQB1*03:02) (41). La maggior parte dei pazienti celiaci (90%) esprime l'aplotipo HLA-DQ2, mentre solo il 5% esprime HLA-DQ8 e il restante 5% dei pazienti con MC è portatore di almeno uno dei due geni (DQA1 o DQB1) (45). È inoltre fondamentale sottolineare che il 30-40% della popolazione caucasica è portatore di almeno uno degli alleli a rischio, a fronte di una prevalenza della malattia celiaca dell'1% (46), infatti, la presenza di tale predisposizione genetica è un fattore necessario ma non sufficiente allo sviluppo della malattia celiaca (41,43,45). Di conseguenza, il test genetico per la diagnosi di celiachia ha un basso valore predittivo positivo, mentre il valore predittivo negativo è molto alto (>99%) (46), tanto che la negatività della genetica porta all'esclusione della diagnosi di MC (45). L'impiego del test genetico HLA per la malattia celiaca appare particolarmente utile in determinati scenari, come nei familiari di primo grado di pazienti celiaci per determinare l'eventuale sussistenza del rischio di sviluppo di malattia celiaca (45,46,47), ma anche nei pazienti con patologie che frequentemente si associano alla MC, come il diabete mellito di tipo I (48), e nei pazienti con sintomatologia compatibile con celiachia ma sieronegativi (45, 46).

Oltre ai geni HLA, sono stati recentemente studiati più di 40 geni non-HLA implicati nella patogenesi della malattia celiaca, molti dei quali codificano per molecole coinvolte nel funzionamento dei linfociti T e B (45). Si è inoltre riscontrato che la differente combinazione dei polimorfismi identificati poteva associarsi a diversi fenotipi di malattia, per esempio il *locus* TLR7/TLR8 si associa ad un esordio di patologia prima dei 7 anni, mentre i *loci* SH2B3/ATXN2, ITGA4/UBE2E3 e IL2/IL21 correlano con un esordio più tardivo e con un maggior danno a livello della mucosa del piccolo intestino (49).

1.3.2 Ruolo del glutine

Il glutine è un complesso di proteine solubili in alcol denominate gliadine, che si suddividono nei sottotipi α , γ e ω ; e proteine alcol-insolubili chiamate glutenine, suddivise a loro volta in sottotipi ad alto e basso peso molecolare (41). Entrambe le proteine risultano essere ricche in amminoacidi come la prolina (15% della composizione amminoacidica) e la glutammina (35% della composizione amminoacidica), i quali conferiscono al glutine un'alta resistenza all'azione delle proteasi umane che si localizzano nel lume intestinale. Di conseguenza, in seguito all'ingestione di prodotti contenenti glutine, si formano dei peptidi della lunghezza

di 30-40 amminoacidi che, in soggetti predisposti, risultano altamente immunogeni (50). In particolare il residuo peptidico “33MER”, derivante dalla gliadina e composto da 33 amminoacidi, è stato identificato come il principale trigger della patologia (51,52). Affinché tale residuo peptidico generi una risposta immunitaria è tuttavia necessaria la sua traslocazione attraverso la barriera epiteliale intestinale e il successivo raggiungimento della lamina propria, dove verrà presentato al sistema immunitario dalle cellule presentanti l'antigene (APC) (50). È stato dimostrato che la traslocazione di 33MER avviene attraverso transitosi, processo che viene regolato dall'interferone gamma e che si verifica maggiormente nei pazienti con malattia celiaca non trattati, rispetto ai controlli e ai pazienti celiaci in dieta aglutinata (51). Il trasporto di 33MER è facilitato dalla presenza di condizioni di aumentata permeabilità dell'epitelio intestinale (53) mentre invece, in condizioni fisiologiche, le giunzioni strette (*tight junctions*) dell'epitelio intestinale formano una barriera che ostacola il passaggio alla lamina propria delle macromolecole (54). Secondo alcuni studi la gliadina è in grado di provocare un temporaneo incremento della permeabilità delle *tight junctions* intercellulari (55) grazie al rilascio di una proteina denominata zonulina (56).

Una volta che i residui peptidici del glutine raggiungono la lamina propria, essi vengono sottoposti a deamidazione da parte dell'enzima transglutaminasi tissutale 2 (TG-2), che converte i residui di glutammina in acido glutammico (50). Questo è uno step critico per quanto riguarda l'immunogenicità del glutine perché va a determinare l'instaurarsi di interazioni specifiche tra i segmenti deamidati, che possiedono cariche negative (57), e alcuni siti del complesso maggiore di istocompatibilità HLA-DQ2 o DQ8, espresso sulle cellule APC dei pazienti geneticamente predisposti alla malattia celiaca (50,58). TG-2 porta inoltre ad un incremento della permeabilità intestinale trans-cellulare al glutine, aumentandone la traslocazione (50,57). Le cellule APC, successivamente, presentano gli antigeni derivanti dal glutine ai linfociti CD4+, conducendo all'attivazione di una risposta infiammatoria con fenotipo Th1/Th17 con produzione di citochine infiammatorie come TNF- α , INF- γ , interleuchina (IL)-18, IL-2, e IL-21 (55,57). (Figura 4)

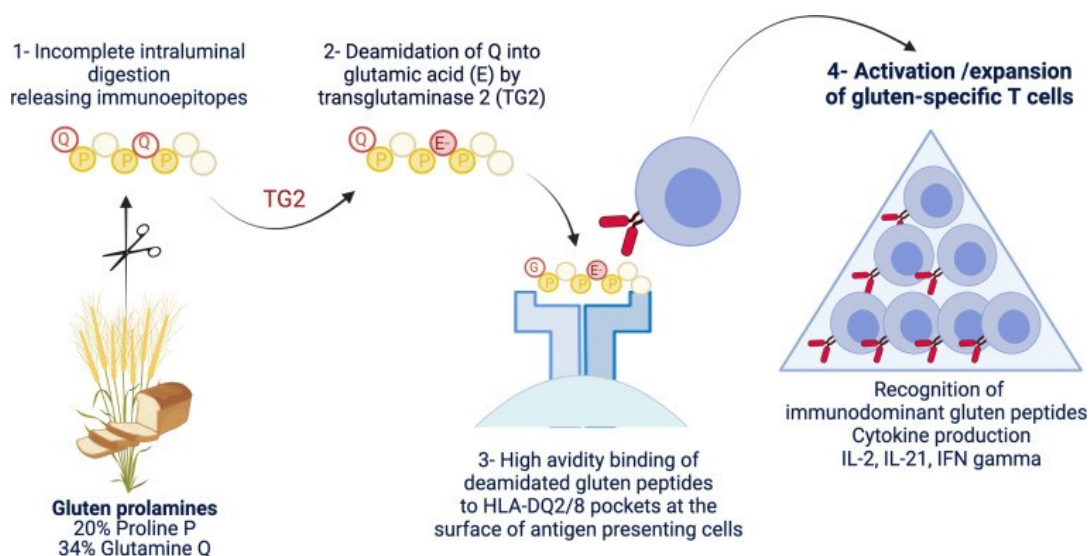


Figura 4: Rappresentazione schematica delle conseguenze dell'assunzione di glutine in pazienti con malattia celiaca, Levescot A et al (57).

Oltre all'attivazione della componente acquisita del sistema immunitario appena descritta, secondo recenti studi alcuni peptidi di gliadina non immunogeni possono andare ad innescare anche la risposta immunitaria innata ed esercitare effetti tossici diretti a carico degli enterociti. I meccanismi citati conducono a modificazioni istologiche della mucosa duodenale, come un aumento dei linfociti CD3+ intraepiteliali, iperplasia delle cripte e alterazioni dell'architettura dei villi intestinali con atrofia degli stessi (58). Inoltre, i linfociti T CD4+ helper, dopo aver riconosciuto l'antigene, innescano la maturazione e la proliferazione dei linfociti B, con formazione di plasmacellule secernenti anticorpi IgG (immunoglobuline G) e IgA (immunoglobuline A) diretti contro la transglutaminasi tissutale 2 (15, 59). Gli anticorpi anti TG-2 sono presenti esclusivamente nei pazienti esposti al glutine e, per questo motivo, possono essere utilizzati come biomarker per il follow-up dei pazienti con MC (57).

1.3.3 Ruolo del microbiota intestinale e dei fattori ambientali

Il microbiota intestinale gioca un ruolo fondamentale nella digestione, nella modulazione della risposta infiammatoria, nel metabolismo del glutine e nei cambiamenti della permeabilità intestinale. Nelle ultime decadi è stata ampiamente dimostrata la presenza di anomalie nel microbiota dei pazienti affetti da malattia celiaca, con la peculiarità che alcune alterazioni sono riscontrabili anche prima

dell'esordio della patologia, se si vanno a testare i bambini con predisposizione genetica (60,61,62). Nello specifico, diversi studi hanno osservato nei pazienti celiaci una significativa riduzione di alcune specie batteriche anti-infiammatorie, come *B. uniformis*, *B. stercoris* (63), *Streptococcus thermophilus*, *F. prausnitzii* e *Clostridium clostridioforme* (64), se confrontati con individui sani; mentre specie pro-infiammatorie, come *Dialister invisus*, *Parabacteroides* e *Lachnospiraceae* risultavano incrementate (64). Inoltre, alcuni batteri appartenenti al genere *Bifidobacterium* sono stati riscontrati con maggior frequenza nel gruppo di controllo. Questi ultimi sono in grado di stimolare la produzione di IgA a livello intestinale e promuovono la regolazione della risposta immunitaria attraverso l'attivazione delle cellule dendritiche e i linfociti T regolatori. Questi risultati suggeriscono che il genere *Bifidobacterium* potrebbe avere una funzione immunoregolatrice negli individui sani che viene persa nei pazienti che sviluppano la malattia celiaca (63). Un recente trial ha dimostrato che un intervento farmacologico che preveda la somministrazione di probiotici dei generi *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* può attenuare la progressione di molteplici patologie autoimmuni, tra cui anche la malattia celiaca. Nel dettaglio, la somministrazione di probiotici conduce ad una riduzione della produzione della citochina pro-infiammatoria TNF- α (*tumor necrosis factor alpha*) in bambini con MC in dieta aglutinata (65). I dati che riguardano la possibilità di utilizzare questa profilassi con *Bifidobacterium* appaiono però contrastanti: altri studi affermano che, in seguito a terapia con probiotici, non si rilevano differenze significative nei livelli di citochine e di zonulina rispetto al placebo (66).

Nel corso degli anni sono stati studiati gli effetti che numerosi fattori ambientali hanno sull'esordio e lo sviluppo della malattia celiaca. In particolare, per quanto riguarda i pazienti pediatrici, è stata attribuita una grande importanza all'allattamento al seno e all'età di introduzione del glutine nella dieta (64,67). L'attenzione rivolta all'allattamento al seno dipende dal fatto che il latte materno contiene molecole che risultano essere attive dal punto di vista immunitario e che vanno a modulare la risposta immunitaria a livello della mucosa intestinale del neonato (68). In realtà, recenti meta-analisi affermano che né l'allattamento al seno né il momento in cui viene introdotto il glutine influenzano in modo significativo lo sviluppo di MC nei bambini a rischio (57). Contrariamente, altri studi osservazionali dichiarano che la quantità cumulativa di glutine che viene assunta

tra 1 e 5 anni nei bambini geneticamente predisposti assume un'enorme importanza (67).

Anche le infezioni gastrointestinali sono state a lungo indagate per la loro possibile influenza sull'esordio e decorso della malattia celiaca. Nello specifico, alcuni studi sottolineano il ruolo delle infezioni recidivanti da *Rotavirus* nello sviluppo della MC nei bambini predisposti (57). Una recente review ha identificato numerosi virus che potrebbero aumentare il rischio di sviluppare la malattia celiaca, come *Cytomegalovirus*, il già citato *Rotavirus*, *Enterovirus*, *Pneumococcus*, *Bacteroides species*, *Campylobacter Jejuni*, *Helicobacter Pylori*, *Mycobacterium tuberculosis*, *hepatitis B virus*. Contrariamente, altri studi affermano che alcuni virus, tra cui *Cytomegalovirus* e *H. Pylori*, potrebbero addirittura avere un ruolo protettivo (68). Ulteriori fattori ambientali che sono risultati importanti secondo diverse pubblicazioni sono l'attività fisica, che è in grado di aumentare i livelli di Th17 e di ridurre il rischio di sviluppare malattie autoimmuni, l'esposizione ad inquinanti ambientali, in particolare al *p,p'-dichlorodiphenyldichloroethylene* (DDE), ed infine l'adesione ad una dieta occidentale, ricca di cibi calorici, carboidrati semplici e proteine animali, che vanno ad impattare sulla qualità del microbiota e sull'infiammazione a livello intestinale (68,69).

1.4 PRESENTAZIONE CLINICA

Prima degli anni '90 la maggior parte dei pazienti con malattia celiaca presentava alla diagnosi una sintomatologia tipicamente gastrointestinale con diarrea. Nel 1993 furono introdotti i test sierologici per la diagnosi di MC e, da quel momento, vennero presi in considerazione anche tutti gli altri possibili sintomi che conosciamo oggi, portando la percentuale di pazienti che si presentano alla diagnosi con il sintomo diarrea dal 73% dei casi, nel 1993, al 43%, in seguito all'introduzione dei test sierologici (21). Oggi è dunque assodato che la malattia celiaca possiede presentazioni cliniche estremamente eterogenee (70).

Per quanto riguarda le manifestazioni cliniche della malattia celiaca, oggi ci basiamo sulla classificazione di Oslo del 2013, che le ha suddivise in 5 forme: classica, non-classica, subclinica, potenziale e refrattaria (21,71).

1.4.1 Forma classica

La forma classica racchiude una costellazione di sintomi e segni che si accompagnano al tipico quadro di malassorbimento, tra cui diarrea cronica, gonfiore addominale e mancato raggiungimento da parte di pazienti pediatrici degli standard di incremento ponderale e staturale per l'età anagrafica. Nonostante la terminologia più corretta per riferirsi a questi ultimi sintomi sia per l'appunto "forma classica", altri termini utilizzati possono essere "forma tipica" (impiegato prima della classificazione di Oslo), "forma diarroica", ma anche "forma intestinale" (70). Le manifestazioni classiche della malattia celiaca variano in base alla classe di età che si va a considerare: diarrea, mancanza di appetito e distensione addominale sono i sintomi gastrointestinali più frequenti nei bambini, in particolare in pazienti con età inferiore a 3 anni. Se si prendono invece in considerazione gli adolescenti e gli adulti, i sintomi più frequenti sono diarrea, *bloating*, costipazione, dolore addominale e calo ponderale (72). È inoltre doveroso sottolineare che la forma classica è tipica in particolare dei pazienti pediatrici, che quindi tendono a manifestare sintomi e segni da malassorbimento più frequentemente rispetto agli adulti, nei quali invece prevale la forma non-classica (73). Dunque, il quadro di malassorbimento perdura nel tempo, possono manifestarsi segni extra-intestinali di severa malnutrizione nel soggetto, soprattutto se pediatrico: il paziente presenterà grave deficit di folati e/o vitamina B12 con conseguenti anemia e neuropatia periferica, ma anche osteopenia, osteoporosi e ipostenia muscolare (74,75). La sindrome da malassorbimento può condurre, in una piccola percentuale di casi, ad una condizione molto severa conosciuta con il nome di "crisi celiaca", considerata la versione fulminante della forma classica della malattia celiaca. Si tratta di una sindrome rara ma con una mortalità del 9%, descritta per la prima volta nel 1953 (76). Clinicamente presenta un brusco esordio con diarrea profusa, severa disidratazione, instabilità emodinamica con alterazioni elettrolitiche e metaboliche, acidosi e ipotensione. Nella maggior parte dei casi richiede l'ospedalizzazione del paziente ed il trattamento consiste nell'adesione ad una dieta aglutinata in aggiunta ad un supporto emodinamico e nutrizionale. La crisi celiaca può caratterizzare l'esordio della malattia in alcuni casi isolati, ma perlopiù coinvolge individui con una bassa aderenza alla dieta aglutinata (76,77).

1.4.2 Forma non-classica

La seconda forma di malattia celiaca descritta nella classificazione di Oslo è quella denominata “non-classica”, conosciuta anche come forma “atipica”, “extra-intestinale” o “non-diarroica” (70). La manifestazione clinica non-classica più frequentemente riscontrata è l’anemia: una recente metanalisi afferma che la sua prevalenza varia tra i diversi studi tra il 12% e l’85%, rimanendo sempre più comune nel sesso femminile (78). L’anemia riscontrata nei pazienti con MC è considerata multifattoriale, infatti nei pazienti celiaci con anemia sia i livelli circolanti sia i depositi di ferro sono significativamente ridotti rispetto ai pazienti non anemici con MC. In aggiunta al deficit marziale, nei pazienti anemici con malattia celiaca viene riscontrata alla diagnosi una riduzione dei valori di vitamina B12 e/o acido folico, rispettivamente nel 8-41% e 20-30% dei casi. Un altro fattore da considerare è la natura infiammatoria della malattia celiaca che, come noto, può condurre all’instaurarsi di un’anemia da flogosi cronica. Secondo un recente studio, tuttavia, l’anemia nei pazienti con MC solo raramente è macrocitica, e ciò è dovuto al fatto che i valori di acido folico e vitamina B12 non sono significativamente ridotti rispetto al gruppo dei pazienti con MC non anemici, collocandosi solo leggermente al di sotto del fisiologico range di riferimento. La carenza marziale sembrerebbe essere dunque la causa preponderante di anemia nei pazienti celiaci, mentre gli altri fattori come il deficit di B12 e di acido folico o l’infiammazione cronica risultano essere elementi secondari che influenzano lo sviluppo della stessa (78, 79). Spesso i pazienti che si presentano alla diagnosi con tale quadro lamentano classici sintomi di anemia come debolezza, cefalee, ridotta tolleranza all’esercizio fisico, *fatigue*, irritabilità e depressione, ma anche altri sintomi dovuti alla carenza di ferro come alterazioni nella termoregolazione, ritardo nello sviluppo psicomotorio nei bambini, scarse concentrazione e performance scolastiche negli adolescenti, perdita di capelli e prurito (79). Sebbene l’anemia rimanga la manifestazione ematologica della malattia celiaca in assoluto più frequente, altri disturbi che coinvolgono questa branca medica sono trombocitosi, trombocitopenia, leucopenia, tromboembolismo, diatesi emorragica, iposplenismo, deficit di IgA e sviluppo di linfomi (80).

Un’altra manifestazione non-classica molto frequente è la ridotta densità minerale ossea (BMD), che conduce a manifestazioni come l’osteopenia e l’osteoporosi (70,81). Secondo una recente metanalisi il 30-60% dei pazienti giunge alla diagnosi

di malattia celiaca con ridotta densità minerale ossea, mentre il 18-35% dei soggetti presenta osteoporosi. Diversi studi affermano che la problematica coinvolge più frequentemente il sesso femminile, mentre altri concludono che l'osteoporosi affligge pazienti celiaci di entrambi i sessi in egual modo. Le donne celiache, tuttavia, risultano maggiormente a rischio di osteoporosi per altri motivi, quali menopausa precoce e amenorrea (81). Le cause di ridotta densità minerale ossea nei pazienti con MC risiedono primariamente nella sindrome da malassorbimento, la quale conduce, oltre ai deficit già citati, anche ad ipocalcemia e ipovitaminosi D, conseguentemente alle quali si sviluppa un quadro di iperparatiroidismo e riassorbimento osseo. Anche le citochine pro-infiammatorie che vengono secrete nel contesto della patologia flogistica cronica giocano un ruolo fondamentale nella patogenesi dell'osteoporosi da malattia celiaca, poiché vanno ad alterare la funzionalità dell'osteoprotegerina e di RANK-ligando (*Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*), favorendo l'azione degli osteoclasti. Altre cause di alterata densità minerale ossea risultano essere la malnutrizione e il ridotto peso corporeo di alcuni pazienti con malattia celiaca (81,82).

Tra le manifestazioni della forma non-classica di MC si riscontrano anche diversi disturbi di natura neurologica e psichiatrica tra cui atassia cerebellare, neuropatia periferica, convulsioni, cefalea, decadimento cognitivo, mioclono corticale, irritabilità e depressione (70,79,83). La patogenesi di tali disturbi risiede nella cross-reazione di alcuni anticorpi e nella deposizione di immunocomplessi, ma anche nella tossicità diretta e nella grave malnutrizione con deficit vitaminici estremi. La dieta priva di glutine è in grado di alleviare la quasi totalità dei sintomi della malattia celiaca incluse le manifestazioni neurologiche, ad eccezione del mioclono corticale e della demenza, le quali in certi casi richiedono una terapia immunosoppressiva (83).

Nelle ultime decadi è stata inoltre ampiamente studiata la prevalenza di problematiche nel concepimento e nel mantenimento della gravidanza tra le donne celiache, ed oggi è assodato che la MC ha diverse manifestazioni non-classiche che coinvolgono la sfera ginecologica. Molteplici studi hanno dimostrato che la malattia celiaca impatta sulla fertilità, infatti le donne con MC non diagnosticata o non trattata tendono ad avere una finestra temporale di fertilità ridotta durante la loro vita, a causa di un menarca mediamente più tardivo e ad una menopausa più precoce. È inoltre riportata una maggior frequenza di amenorrea secondaria rispetto

ai controlli sani. È noto che la riduzione del periodo fertile è direttamente correlata all'attività della malattia celiaca e, infatti, le donne che seguono una dieta priva di glutine a lungo termine hanno una durata della finestra fertile paragonabile a quella di soggetti sani (84). Altre possibili cause di infertilità nelle donne con MC sono imputabili al malassorbimento intestinale e alla successiva malnutrizione, ma anche ad alterazioni della coagulazione, al danno tissutale autoanticorpi-indotto e all'infiammazione a livello endometriale (85).

Altre manifestazioni non-classiche sono bassa statura, alterazioni della funzionalità epatica, aumentato rischio di nefrolitiasi e di vasculiti. Dal punto di vista oculare sono descritte anche la retinopatia associata a deficit di vitamina A, uveiti e cataratta, in ambito dermatologico eczema, orticaria, psoriasi e alopecia areata, mentre nel contesto muscolo-scheletrico, oltre alle già citate osteopenia ed osteoporosi, manifestazioni meno frequenti sono artralgie, artriti e mialgie. Considerando il sistema cardiovascolare sono riscontrabili anche versamenti pericardici, miocarditi e cardiomiopatie, mentre i polmoni sono molto raramente coinvolti dalla celiachia, attraverso un aumentato rischio di patologie croniche di tipo ostruttivo e di emosiderosi polmonare. I reni possono essere colpiti da manifestazioni non classiche della malattia celiaca soprattutto attraverso la nefropatia da IgA, ma anche altre nefropatie quali la membrano-proliferativa e la membranosa. È inoltre doveroso citare le complicazioni che si associano all'infiammazione sistemica associata alla malattia celiaca come aterosclerosi, trombosi arteriosa e tromboembolismo che possono esitare in ictus, infarto del miocardio e trombosi (70,86,87). Per quanto riguarda la prevalenza delle manifestazioni extra-intestinali, questa risulta essere simile nei bambini (60%) e negli adulti (62%), mentre le percentuali dei singoli disturbi extra-intestinali variano nelle due categorie. In particolare, la bassa statura è la manifestazione più comune nella popolazione pediatrica, mentre l'anemia sideropenica e i disordini psichiatrici sono più frequenti negli adulti (72,83). Considerando invece le differenze tra maschi e femmine, i sintomi non-classici risultano più frequenti nel sesso maschile, fattore che probabilmente incide sul ritardo diagnostico che spesso si verifica nei pazienti uomini, se confrontato al percorso delle pazienti donne che, spesso, si presentano con sintomi intestinali più evidenti e quindi più prontamente associati alla malattia celiaca (88).

Esiste una manifestazione extra-intestinale che merita una trattazione a parte, in quanto addirittura viene considerata una variante di celiachia che si manifesta a livello cutaneo: la dermatite erpetiforme, o dermatite erpetica di Duhring (71). Si tratta di un segno riscontrato più frequentemente nei casi di celiachia non trattata e, per questo, la sua prevalenza appare in netta riduzione negli ultimi anni. Si diagnostica prevalentemente nei pazienti di sesso maschile tra i 60 e i 69 anni e tra le pazienti di sesso femminile tra i 50 e i 59 anni, mentre prima dei 16 anni è estremamente rara. Clinicamente si caratterizza per la presenza di vescicole e papule estremamente pruriginose localizzate a livello di gomiti, collo, ginocchia e glutei, mentre il coinvolgimento della mucosa orale è raro. La dermatite di Duhring è contraddistinta da depositi di anticorpi anti-transglutaminasi tissutale 3 (TG3) a livello dello strato papillare del derma. La diagnosi si basa sulle caratteristiche cliniche e, eventualmente, sull'esecuzione di una biopsia cutanea che mostra il riscontro patognomonico tramite immunofluorescenza di depositi di IgA granulari a livello del derma papillare. Tipicamente le lesioni da dermatite erpetiforme regrediscono con l'adesione ad una dieta aglutinata senza lasciare esiti, tuttavia il processo può richiedere mesi o anni (87,88,89).

1.4.3 Forma subclinica

Tra le differenti forme cliniche di malattia celiaca esiste la cosiddetta forma subclinica, definita anche "silente" (90), la quale prevede una positività sierologica agli anticorpi tipici della MC associata a lesioni istologiche della mucosa intestinale tipiche della patologia, in pazienti privi di sintomatologia (71). I casi di celiachia subclinica risultano essere in aumento negli ultimi anni a causa di una maggior consapevolezza della malattia celiaca, la quale ha condotto un numero crescente di soggetti a sottoporsi ai test per la MC in presenza di familiarità e/o patologie che frequentemente si associano alla celiachia stessa. I pazienti con malattia celiaca subclinica, se indagati, spesso risultano lievemente anemici a causa di un moderato malassorbimento, oppure, se viene approfondita la loro anamnesi, spesso lamentano sintomi gastrointestinali trascurabili e di lieve intensità (90).

1.4.4 Forma potenziale

Con il termine celiachia potenziale si intende forma di malattia celiaca caratterizzata da positività sierologica agli anticorpi anti-TTG associata a test

genetico positivo, in assenza però di lesioni istologiche della mucosa duodenale (71). Un recente studio riporta che i pazienti con celiachia potenziale beneficiano del trattamento con dieta priva di glutine poiché tali soggetti, anche se privi di lesioni istologiche duodenali, possono sviluppare manifestazioni extra-intestinali glutine-dipendenti come una ridotta densità minerale ossea causata da deficit di micronutrienti (91). Le nuove linee guida lasciano al paziente e al medico la decisione di intraprendere o meno la GFD. Il paziente, se asintomatico, può continuare la dieta libera monitorando la comparsa di atrofia nel tempo (92).

1.4.5 Celiachia refrattaria (RCD)

La diagnosi di celiachia refrattaria viene posta nel momento in cui un paziente celiaco, dopo almeno 12 mesi di dieta aglutinata stretta, lamenta ancora sintomi riconducibili alla MC e continua a presentare atrofia dei villi all'istologia. Per confermarne la diagnosi è fondamentale accertarsi dell'adesione da parte del paziente alla dieta aglutinata in aggiunta all'esclusione di neoplasie o di altre cause di mancata risposta alla dieta priva di glutine (93). La diagnosi di RCD avviene perlopiù dopo i 50 anni, con un'incidenza che varia tra lo 0,04% e l'1,5% (94). La caratterizzazione istologica della celiachia refrattaria ci permette di suddividerla in due categorie in base all'immunofenotipo dei linfociti intraepiteliali intestinali: RCD di tipo I, caratterizzata da un fenotipo normale, e RCD di tipo II, che all'istologia dimostra la presenza di un'espansione monoclonale di linfociti, condizione che porta la RCD di tipo II ad essere categorizzata come linfoma a basso grado (94,95). Mentre la maggior parte dei linfociti esprimono sulla loro superficie CD3, CD8 e TCR β , i linfociti T che caratterizzano la RCD di tipo II non esprimono CD3, CD4 o CD8 sulla loro superficie, bensì esprimono CD3 a livello intracellulare a causa di un riarrangiamento del TCR gamma. Nello specifico parliamo di RCD di tipo I quando questa popolazione di cellule è inferiore al 20%, mentre nella RCD di tipo II la percentuale è superiore al 20% alla citofluorimetria (94). La celiachia refrattaria di tipo II viene considerata una severa complicanza della malattia celiaca in quanto conduce, nel 50% dei casi entro 5 anni dalla diagnosi, allo sviluppo del linfoma non-Hodgkin a cellule T enteropatia-associated o EATL (*Enteropathy-associated T-cell lymphoma*) ad alto grado, il quale ha una sopravvivenza a 5 anni del 20% (95). Mentre la fisiopatologia della celiachia refrattaria di tipo I rimane poco chiara, per quanto riguarda la celiachia refrattaria di tipo II sono stati

identificati diversi fattori, tra cui IL-15 e mutazioni somatiche di JAK1 e STAT3, che sembrano avere un ruolo fondamentale nella proliferazione aberrante dei linfociti T (96). Il trattamento della RCD prevede l'adesione ad una dieta aglutinata stretta associata all'utilizzo di farmaci immunosoppressivi, anche se, ad oggi, con scarsi risultati (93).

1.4.6 **Patologie associate alla celiachia**

Grazie a molteplici studi genetici condotti a partire dal 2007, è noto che esiste un parziale *overlap* genetico tra i differenti disordini autoimmuni. La malattia celiaca, che fa parte di questa macrocategoria di patologie su base auto-immunitaria, risulta frequentemente associata ad altre patologie simili, in particolare il diabete mellito di tipo 1 (DM1) e le tireopatie come la tiroidite di Hashimoto e di Basedow-Graves (97). La prevalenza della malattia celiaca tra i pazienti affetti da patologie croniche autoimmuni a carico della tiroide oscilla tra il 2 e il 7,8% (98). Proprio a causa di questa evidente associazione tra la MC e le tireopatie autoimmuni, la Società Europea di Gastroenterologia, Epatologia e Nutrizione Pediatrica (ESPGHAN) raccomanda l'esecuzione dello screening per la malattia celiaca nei pazienti con patologie autoimmuni a carico della tiroide (99). Le due patologie hanno anche delle reciproche influenze, ed infatti è stato dimostrato a livello clinico che i pazienti ipotiroidei con concomitante MC necessitano di dosi maggiori di levotiroxina per raggiungere il target di TSH, se confrontati ai pazienti ipotiroidei ma senza celiachia (98). Considerando il diabete mellito, approssimativamente il rischio che un paziente con DM1 sviluppi la MC è del 5%, a fronte del già citato rischio per la popolazione generale dell'1% circa. Solitamente, nei casi in cui entrambe le patologie siano già presenti contemporaneamente, la diagnosi di DM1 avviene più precocemente rispetto a quella di MC. Gli esperti raccomandano, anche in questo caso, lo screening per malattia celiaca nei pazienti diabetici, a causa dell'importante associazione tra le patologie (100). Altre patologie su base immunitaria associate alla MC, sebbene più raramente, sono il morbo di Addison, l'ipopituitarismo autoimmune (101), la colangite sclerosante primitiva, le epatiti autoimmuni, l'alopecia areata, la vitiligine, l'artrite reumatoide, la sindrome di Sjogren, ma anche le coliti microscopiche e la porpora trombocitopenica immune (102). Al contrario, sembra che la malattia celiaca svolga un ruolo protettivo nei confronti dello sviluppo della gastrite atrofica autoimmune (103). Parlando di patologie

autoimmuni è fondamentale sottolineare che i pazienti con sindrome di Down presentano un aumentato rischio di auto-immunità e, dunque, di sviluppare la malattia celiaca. La causa di questa predisposizione risiede in una anomala regolazione delle citochine e dei linfociti B CD11c+, la quale condurrebbe ad un aumento delle IgG sieriche nei pazienti con sindrome di Down (104). Oltre alle patologie autoimmuni, la celiachia si associa a diverse patologie linfoproliferative come il già citato EATL ma anche altri linfomi non Hodgkin a cellule T o a cellule B. I pazienti con malattia celiaca hanno inoltre un aumentato rischio, rispetto alla popolazione generale, di sviluppare il carcinoma del piccolo intestino, entità neoplastica rara e con prognosi severa. Numerosi studi hanno investigato il rischio dei pazienti con MC di sviluppare anche altre neoplasie del tratto gastrointestinale, in particolare i tumori esofagei, del colon-retto, del fegato e del pancreas, ma i risultati appaiono contrastanti. Lo stesso vale per il tumore papillare della tiroide e per il melanoma, neoplasie che sono state studiate in associazione alla MC, tuttavia i risultati sembrano concludere che il rischio non sia significativo (105).

1.5 DIAGNOSI

In passato la diagnosi di celiachia si basava esclusivamente sulla presentazione clinica, prevalentemente classica, del paziente. Successivamente, con l'introduzione dei test sierologici, è stato possibile sottoporre a test rapidi e poco invasivi i soggetti con sospetto di MC o facenti parte di categorie a rischio (21). Oggi la diagnosi di celiachia negli adulti si basa sulla triade sintomatologia, sierologia e biopsia duodenale (21,87).

1.5.1 Screening per la celiachia

Nel contesto degli screening di massa, l'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) ha stipulato una serie di criteri che la patologia presa in esame deve soddisfare per poter essere sottoposta a screening. La malattia celiaca non soddisfa tutti i criteri, in particolare quelli che fanno riferimento allo sviluppo di severe complicanze se la patologia rimane priva di trattamento, soprattutto se andiamo a considerare i pazienti asintomatici; di conseguenza, la MC non rientra tra le patologie sottoposte a screening di massa (106). La Società Italiana di Gastroenterologia ed Endoscopia (SIGE) ha recentemente proposto delle linee guida che hanno lo scopo di chiarire in quali casi sia raccomandata l'esecuzione di

screening per la MC, realizzate con la collaborazione delle altre società italiane di gastroenterologia (AIGO e SIED) e una società pediatrica (SINGEP). In primis vanno testati quei pazienti che manifestano segni e sintomi suggestivi di malattia celiaca, tra i quali diarrea cronica, perdita di peso non volontaria, anemia ferropriva, deficit di ferro, folati o vitamina B12, ritardo di crescita e stipsi nei bambini, dolore addominale cronico, nausea o vomito ricorrenti, stomatite aftosa, anomalie dello smalto dentale e alterazioni inspiegabili degli enzimi epatici. In secondo luogo vanno sottoposti ad indagini per MC i familiari di primo e, in alcuni casi, anche di secondo grado di pazienti con diagnosi di celiachia. Infine vanno testati i pazienti che presentano delle condizioni che sono note per essere frequentemente associate alla malattia celiaca come la dermatite erpetiforme, la tiroidite di Hashimoto, il morbo di Graves, il DM1 e altre malattie autoimmuni come le epatiti autoimmuni o la gastrite atrofica autoimmune, ma anche altre patologie come la psoriasi, le coliti microscopiche, le sindromi di Down, Turner e Williams e il deficit di IgA. Vanno inoltre valutati i pazienti che si presentano con osteopenia o osteoporosi, ma anche con atassia o neuropatia periferica non altrimenti spiegabili, epilessia, infertilità con aborti ricorrenti, menarca ritardato o menopausa precoce, *chronic fatigue syndrome*, fibromialgia, iposplenismo, emosiderosi polmonare e nefropatia da IgA (92,106). Nelle categorie di pazienti descritte si andranno quindi a dosare gli anticorpi specifici per la MC e, successivamente, nei soggetti adulti con sierologia positiva, sarà necessaria l'esecuzione di un esame endoscopico ed istologico. È fondamentale che il paziente durante gli accertamenti sierologici e istologici per la malattia celiaca sia in corso di dieta libera contenente glutine (92,106,107).

1.5.2 Sierologia

I primi analiti utilizzati per la diagnosi di MC, largamente impiegati negli anni '80 e '90, sono stati gli anticorpi IgG e IgA anti-gliadina deaminata (anti-DGP) (106,108), i quali, tuttavia, possiedono un basso valore predittivo positivo (VPP), anche nei gruppi di pazienti ad alto rischio. Per tale motivo sono stati successivamente sostituiti dai più specifici anticorpi IgG e IgA anti-endomisio (EMA) e anticorpi IgG e IgA anti-transglutaminasi tissutale (TTG). L'introduzione degli anticorpi anti-EMA fu inizialmente promettente, poiché la loro sensibilità e specificità si assestavano attorno a valori del 90-95%; tuttavia, con il passare del tempo, emersero problematiche relative alla loro interpretazione da parte di

operatori diversi e al loro costo, fattori che ne hanno limitato l'uso come screening di prima linea per la MC. Come gli anticorpi anti-EMA, anche gli anti-TTG hanno ottime sensibilità e specificità, nonostante possano risultare elevati anche in concomitanza di patologie epatiche, cardiache e infezioni gastrointestinali (106). Un recente studio retrospettivo afferma che le immunoglobuline A (IgA) anti-TTG valutate attraverso ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) sono il test per la MC più sensibile (98,9%), mentre gli anticorpi anti-EMA sono i più specifici (100%). Le immunoglobuline G (IgG) anti-DGP hanno invece una sensibilità dell'88,9% e una specificità del 93,5% (109,110). Un ulteriore aspetto da considerare è che la performance del test ELISA anti-TTG dipende dalla qualità dell'antigene TTG; nello specifico il metodo di estrazione, la purezza del TTG e la sua processazione possono avere degli effetti sul risultato ottenuto. In aggiunta, è noto che TTG può esistere in due differenti conformazioni, aperta o chiusa, in base all'attività dell'enzima. Anche quest'ultima caratteristica può influenzare la performance dell'*assay* ELISA, considerando che la conformazione aperta di TTG è l'antigene che garantisce risultati migliori (106).

Attualmente il test sierologico utilizzato come prima linea per la diagnosi di MC è dato dalle IgA anti-transglutaminasi tissutale (TTG), le quali vanno sempre valutate unitamente alle IgA sieriche totali (92,106,111). Il motivo che sta alla base della necessità di testare le IgA totali è che spesso nei pazienti con malattie autoimmuni, ed in particolare con MC, sussiste un deficit selettivo di IgA (111). È doveroso sottolineare che i valori di IgA sono età-correlati, in quanto assenti alla nascita e successivamente presenti in numero sempre maggiore nel corso dell'età pediatrica, fino a raggiungere i livelli fisiologici per gli adulti già durante l'adolescenza (i valori normali variano tra 61 e 365 mg/dl). Il deficit totale di IgA si diagnostica con livelli sierici inferiori ai 7 mg/dl, mentre il deficit parziale di IgA si ha con valori superiori ai 7 mg/dl, ma comunque al di sotto del limite inferiore stabilito per quella fascia di età (112). Secondo le linee guida delle Società Italiane di Gastroenterologia, qualora venisse riscontrato un deficit totale di IgA, la diagnosi e il follow-up verranno effettuati attraverso le IgG anti-TTG e le IgG anti-DGP. Invece, nell'eventualità in cui un paziente avesse IgA sieriche a livelli normali associate a bassi valori di IgA anti-TTG, la SIGE suggerisce l'utilizzo delle IgA anti-EMA come conferma (92).

Negli adulti con sospetto di MC e sierologia positiva è indicata l'esecuzione di una biopsia duodenale in corso di esame endoscopico per diagnosticare la malattia celiaca (92). I costi e i rischi dell'esofagogastroduodenoscopia (EGDS), in aggiunta alle elevate sensibilità e specificità dei test sierologici per la MC, hanno condotto ad un dibattito su scala mondiale riguardo alla possibilità di utilizzare per la diagnosi di MC delle metodiche non invasive nei bambini con elevati livelli sierici di IgA anti-TTG. Nel 2012 e, in seguito, anche nel 2020, l'ESPGHAN ha proposto una diagnosi senza biopsia (*biopsy-free*) nei pazienti pediatrici con elevati livelli di IgA anti-TTG che eccedano di almeno 10 volte il limite superiore dei valori normali (ULN, *upper limit of normal*), in combinazione ad una positività delle IgA anti-EMA riscontrata durante l'analisi di un'ulteriore provetta di sangue (111,113). Secondo la SIGE, nei rari casi in cui non vi sia la possibilità di esecuzione di una EGDS, è suggerito l'utilizzo della videocapsula, metodica diagnostica che normalmente non viene invece utilizzata per la MC (92).

1.5.3 Celiachia sieronegativa

Sebbene gli anticorpi tipici della MC siano riscontrabili nella maggior parte dei pazienti celiaci, possedendo infatti una sensibilità che va dal 95 al 98%, una piccola percentuale di soggetti con MC può presentarsi con sierologia negativa. In questi rari casi la diagnosi si basa sull'istopatologia tipica in associazione alla positività per HLA-DQ2 o HLA-DQ8, che è assolutamente necessaria per porre il sospetto di celiachia sieronegativa (SNCD, *Seronegative Celiac Disease*). A supporto della diagnosi, tali pazienti vanno seguiti in FU per un adeguato periodo di tempo dall'inizio della dieta priva di glutine, di circa 6-24 mesi, successivamente ai quali dovrebbe verificarsi un miglioramento del quadro clinico, laboratoristico e istologico. La prevalenza della SNCD è dell'1,03% se consideriamo la totalità dei pazienti con malattia celiaca, ma sale al 28% all'interno del sottogruppo di pazienti con celiachia potenziale o latente (114). Nelle ultime decadi l'utilizzo del termine "celiachia sieronegativa" è risultato piuttosto controverso, ed è stato impiegato per riferirsi ad un'ampia varietà di condizioni cliniche ed istopatologiche. Secondo il recente *consensus* di Parigi di Schieppati *et al.* sulla diagnosi e sulla nomenclatura della MC sieronegativa, esistono differenti forme di malattia celiaca che si presentano con sierologia negativa (Tabella I). In primis fa parte di questo spettro di presentazioni cliniche la MC sieronegativa stessa, la quale, secondo Schieppati e

collegi, va considerata separatamente dalla malattia celiaca associata a deficit di IgA. In secondo luogo, la MC con sierologia negativa è stata riscontrata nel 30% dei pazienti con dermatite erpetiforme diagnosticata tramite biopsia e, più raramente, anche nei pazienti affetti sia da MC sia da immunodeficienza comune variabile. Infine, il *consensus* di Parigi cita due gruppi di pazienti che ha deciso di considerare come forme convenzionali di MC piuttosto che sieronegative. Il primo gruppo è quello dei pazienti che si presentano con sierologia negativa ma che, al momento del test, avevano già intrapreso una dieta priva di glutine oppure facevano uso di terapie immunosoppressive. Tali pazienti, se reintroducono un quantitativo di glutine sufficiente nella dieta e/o se interrompono la terapia immunosoppressiva, risulteranno nuovamente positivi al test sierologico. Il secondo gruppo analizzato dal *consensus* è quello dei pazienti con atrofia dei villi ma discrepanze tra i titoli degli anticorpi anti-TTG e anti-EMA. Queste ultime due categorie di pazienti sono molto frequentemente riscontrate in ambito clinico e spesso conducono ad errori diagnostici (115).

MC sieronegativa
MC associata a deficit di IgA
MC associata ad immunodeficienza comune variabile (CVID)
Dermatite erpetiforme
Dieta aglutinata già iniziata
Immunosoppressori

Tabella I. Spettro di presentazione della MC con sierologia negativa.

1.5.4 EGDS e biopsia duodenale

Gli esami endoscopico ed istologico sono una tappa fondamentale dell'iter diagnostico della MC nell'adulto e, come anticipato, vengono effettuati nei pazienti con sospetto di celiachia e sierologia positiva (92,111). Il duodeno è la sede maggiormente coinvolta dalla MC perché è il tratto che per primo incontra il glutine liberato in seguito alla digestione gastrica. Il danno a livello della mucosa dato dalla malattia celiaca può manifestarsi con una enteropatia diffusa del piccolo intestino, oppure può coinvolgere esclusivamente il duodeno, ma sono anche descritti casi in cui le lesioni si localizzano esclusivamente a livello del digiuno, con duodeno indenne (116). Macroscopicamente, l'aspetto endoscopico caratteristico prevede

l'assenza, la riduzione o lo *scalloping* (merlettatura) delle pliche di Kerckring, la presenza di noduli a livello della mucosa (pattern a mosaico), di atrofia duodenale con trama vascolare sottomucosa visibile e di fissurazioni della mucosa. (Figura 5).

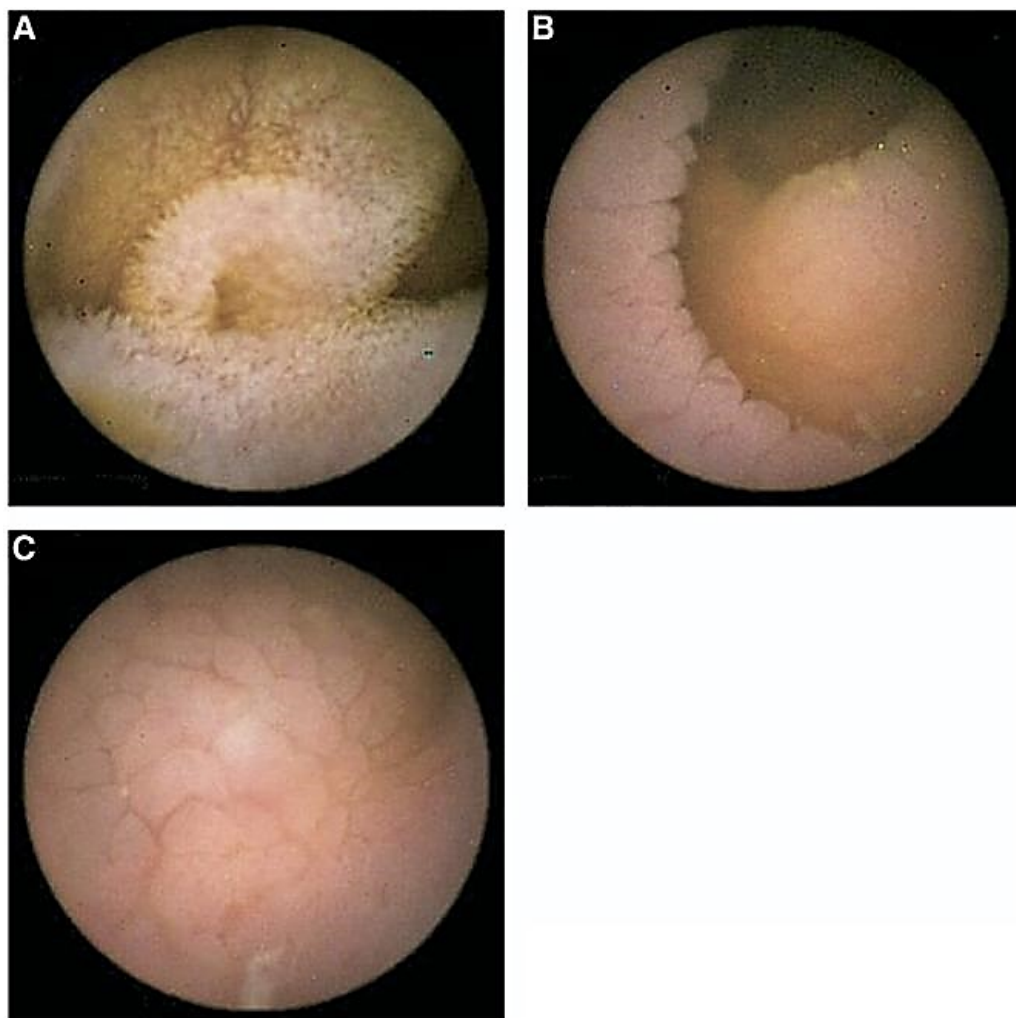


Figura 5: Aspetti endoscopici di un duodeno normale, con villi presenti (A), duodeno di paziente affetto da MC con scalloping della mucosa a livello delle pliche di Kerckring (B), duodeno di paziente affetto da MC con pattern a mosaico (C). Nelle immagini B e C è possibile notare l'assenza dei villi (116).

Tali reperti endoscopici, in una non trascurabile percentuale di casi, che si attesta attorno al 30%, sono impercettibili o addirittura assenti al momento della diagnosi (92,115). È dunque importante effettuare biopsie duodenali anche se l'aspetto macroscopico appare normale e, considerando che spesso il coinvolgimento della mucosa duodenale è discontinuo, la SIGE suggerisce l'esecuzione di biopsie multiple (almeno 4) a livello della seconda e terza porzione del duodeno. L'esecuzione di ulteriori biopsie a livello del bulbo duodenale conduce ad un

aumento dell'accuratezza diagnostica in quanto, in determinati casi, le lesioni tipiche della MC possono essere confinate a quest'area (92). Per una corretta valutazione dell'architettura dei villi è fondamentale eseguire le biopsie con un adeguato orientamento e utilizzando filtri Millipore in acetato di cellulosa, i quali sono in grado di mantenere un'ottima aderenza dei campioni bioptici, senza alterarne la qualità. In questa fase è di cruciale importanza la collaborazione tra endoscopista, infermiere e anatomopatologo (92,118).

Istologicamente, la mucosa intestinale normale si caratterizza per la presenza di villi digitiformi con un rapporto tra l'altezza dei villi e delle cripte sempre a favore del villo (3:1 o maggiore), infiltrato linfocitico intraepiteliale con meno di 25 linfociti per 100 cellule epiteliali e cripte comprendenti cellule epiteliali, endocrine, caliciformi e di Paneth, con una sola mitosi per cripta. La lamina propria può fisiologicamente contenere plasmacellule, eosinofili, istiociti, mastociti e linfociti, mentre invece i neutrofili sono generalmente assenti, ad eccezione dei casi di duodenite attiva (118). Le alterazioni istologiche tipiche della malattia celiaca prevedono, al contrario, un aumento dei linfociti T intraepiteliali (IELs) oltre i 25 ogni 100 enterociti e un incremento del numero di cellule infiammatorie a livello della lamina propria (119). I linfociti T intraepiteliali sono CD3 e CD8 positivi, dunque, sebbene sia possibile quantificarli attraverso la colorazione ematossilina-eosina, è consigliato il ricorso all'immunoistochimica, la quale permette una valutazione più accurata (118). In caso di MC vengono inoltre riscontrati un'iperplasia delle cripte associata alla presenza di più di una mitosi per cripta e atrofia dei villi fino ad una loro completa scomparsa, con alterazione del normale rapporto villo/cripta. Nessuna di queste lesioni è specifica di MC e, di conseguenza, la diagnosi di celiachia si basa sull'identificazione delle alterazioni istologiche descritte in associazione al sospetto clinico e sierologico (118,120).

La valutazione istopatologica dei campioni bioptici si basa sull'applicazione del sistema di classificazione proposto da Marsh nel 1992, che suddivide in 3 gradi di severità il danno istologico riscontrato: Marsh 1, o lesioni infiltrative, Marsh 2, o lesioni iperplastiche e Marsh 3, o lesioni distruttive. Successivamente Rostami e, a seguire, anche Oberhuber hanno proposto la suddivisione dello stadio 3 della classificazione di Marsh in tre sottogruppi, 3A, 3B e 3C, sulla base della presenza di, rispettivamente, un'atrofia dei villi lieve, moderata o severa. (Tabella II) (118). In numerosi pazienti esiste una correlazione tra Marsh e sierologia: secondo un

recente studio il titolo di IgA anti-TTG e di IgA anti-DGP è generalmente maggiore nei soggetti con Marsh 3C rispetto a quelli con Marsh 3B e 3A (109).

Marsh 1	Villi morfologicamente normali con regolare rapporto villo/cripta di 3:1, aumentato numero di IELs (>25/100 enterociti).
Marsh 2	Villi morfologicamente normali con regolare rapporto villo/cripta, aumentato numero di IELs (>25/100 enterociti), iperplasia degli elementi ghiandolari delle cripte con aspetti rigenerativi evidenziati dalla ridotta attività mucipara e aumentato numero di mitosi.
Marsh 3A	Atrofia dei villi di grado lieve, aumentato numero di IELs (>25/100 enterociti), iperplasia delle cripte, enterociti di superficie con ridotta altezza, orletto a spazzola irregolare e, in alcuni casi, vacuoli citoplasmatici.
Marsh 3B	Atrofia dei villi di grado moderato, aumentato numero di IELs (>25/100 enterociti), iperplasia delle cripte, enterociti di superficie con ridotta altezza, orletto a spazzola irregolare e, in alcuni casi, vacuoli citoplasmatici.
Marsh 3C	Totale atrofia dei villi, aumentato numero di IELs (>25/100 enterociti), iperplasia delle cripte, enterociti di superficie con ridotta altezza, orletto a spazzola irregolare e, in alcuni casi, vacuoli citoplasmatici.

Tabella II. *Classificazione secondo Marsh/Oberhuber.*

Più recentemente, Corazza e Villanacci hanno introdotto una classificazione istologica della MC più semplice, suddividendo i pazienti in 3 gruppi sulla base della morfologia dei villi: A, o non atrofico, B1, o con atrofia parziale e B2, o con atrofia totale. (92,118,121). (Tabella III).

Grado A	Villi morfologicamente normali, incremento patologico del numero di IELs (>25/100 enterociti).
Grado B1	Villi con parziale atrofia e rapporto villo cripta inferiore a 3:1, incremento patologico del numero di IELs (>25/100 enterociti).
Grado B2	Villi non più identificabili, incremento patologico del numero di IELs (>25/100 enterociti).

Tabella III. *Classificazione secondo Corazza/Villanacci*

Esistono diverse condizioni che, dal punto di vista istologico, vanno in diagnosi differenziale con la MC. Considerando l'aumentato numero di cellule infiammatorie a livello della lamina propria, nel caso della celiachia risultano aumentati sia i linfociti sia le plasmacellule. L'immunodeficienza comune variabile mimica numerosi aspetti istologici della malattia celiaca, tra cui l'atrofia dei villi, l'iperplasia delle ghiandole nella lamina propria e un incrementato numero di IELs. Tuttavia, l'assenza (o il raro riscontro) di plasmacellule nella lamina propria degli individui con immunodeficienza comune variabile è un elemento fondamentale per la diagnosi differenziale. Un aumentato numero di IELs è riscontrabile anche in caso di duodenite peptica secondaria all'infezione gastrica da *Helicobacter Pylori* (HP), tuttavia questi soggetti presentano generalmente un Marsh 1, in quanto HP non causa atrofia dei villi. Altre condizioni che possono mimare l'istologia della MC sono la duodenite farmaco-indotta, la quale si stima possa affliggere fino al 60% dei pazienti in trattamento a lungo termine con farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS) (119,122), la malattia di Crohn, le enteriti eosinofile e gli EATL di tipo 1 e 2. Tali patologie, tuttavia, non pongono problemi nella diagnosi differenziale, anche in caso di MC sieronegativa. Esistono, invece, una serie di malattie che possono mettere in difficoltà al momento della diagnosi differenziale, soprattutto in quei casi in cui la sierologia della MC è negativa. Le patologie facenti parte di questa categoria sono l'enteropatia autoimmune, la già citata immunodeficienza comune variabile, la sprue tropicale, la giardiasi, il linfoma a cellule T CD4+ indolente e l'atrofia dei villi idiopatica (115).

1.5.5 Tipizzazione genetica

Secondo le linee guida italiane 2022, il test genetico per la ricerca di HLA-DQ2 o HLA-DQ8 non dovrebbe essere eseguito di routine quando vi è il sospetto di malattia celiaca. Le motivazioni di tale indicazione risiedono nel fatto che la prevalenza nella popolazione generale degli HLA tipici della MC è del 30-40%, dunque non possono avere un ruolo diagnostico di prima linea. Esistono tuttavia alcune situazioni in cui la tipizzazione genetica risulta utile. In primo luogo, testiamo per HLA DQ2/DQ8 un paziente quando i risultati della sierologia e dell'istologia sono in disaccordo, per esempio in caso di assenza di atrofia dei villi con positività per le IgA anti-TTG e anti-EMA oppure, viceversa, in presenza di

atrofia dei villi ma sierologia negativa. Un'altra categoria di pazienti che beneficia del test genetico è quella dei soggetti che sono già in dieta priva di glutine al momento della diagnosi, condizione che rende inadeguato l'utilizzo della diagnostica sierologica e istologica. Infine, possono essere ricercati gli HLA tipici anche nei familiari di primo grado dei pazienti con MC che desiderano essere informati dell'eventuale predisposizione genetica per la patologia (92). L'utilità della tipizzazione genetica è data principalmente dalla possibilità di escludere la presenza della MC qualora il test risultasse negativo mentre invece, in caso di positività, è necessario procedere con la valutazione sierologica ed istologica (44,45, 123).

1.6 TERAPIA

1.6.1 Dieta priva di glutine

Attualmente, l'unica terapia approvata per la malattia celiaca è l'adesione a vita ad una dieta priva di glutine (GFD, *Gluten Free Diet*), la quale si è dimostrata efficace nel far regredire il danno alla mucosa duodenale, con successiva risoluzione dei sintomi e dei segni causati dal malassorbimento (124). Per ottenere gli auspicati risultati clinici e istologici è fondamentale che i pazienti rimuovano tutte le fonti di glutine dalla propria alimentazione, tra cui le proteine del glutine contenute nel grano (gliadine) ma anche nell'orzo (ordeine), nella segale (secaline) e nell'avena (avenine) (6). Il glutine è contenuto, oltre ai cereali già citati, anche nel farro spelta, nel kamut e nei ceppi ibridi. La GFD si basa principalmente su alimenti che risultano essere naturalmente privi di glutine (legumi, frutta e verdura, carne non processata, pesce, uova e latticini), ma anche su sostituti di prodotti a base di grano ai quali viene sottratto il glutine o che hanno un contenuto inferiore, come da legislazione Europea, alle 20 parti per milione (ppm) (124).

L'inizio della GFD conduce, generalmente, alla regressione della sintomatologia sia intestinale sia extra-intestinale e previene complicazioni come scarsa crescita nei bambini, ridotta densità minerale ossea, osteoporosi e difetti dello smalto dentale. È dimostrato che un ritardo nell'inizio della GFD in pazienti adulti con MC si associa ad una ridotta qualità di vita, ad un maggior uso di medicinali e ad un più frequente ricorso all'assistenza medica. Se la dieta aglutinata generalmente porta ad un miglioramento sul piano clinico, ciò non è sempre vero dal punto di vista istologico; nello specifico, è possibile che alcune anomalie della MC persistano a

livello duodenale, tuttavia, quantomeno, in corso di GFD solitamente non si ha un peggioramento del danno alla mucosa. Un recente studio ha osservato per alcuni anni diversi pazienti adulti con MC in dieta aglutinata: il 35% di essi ha ottenuto una guarigione completa della mucosa duodenale dopo 2 anni di GFD, mentre il 66% è giunto allo stesso risultato dopo 5 anni, dei quali l'82% riferiva miglioramento clinico. Questi dati supportano la tesi secondo la quale il benessere clinico del paziente non può essere utilizzato come marker di regressione del danno a livello duodenale. È stato inoltre osservato che il miglioramento istologico della mucosa intestinale richiede maggior tempo ed è più spesso parziale negli adulti rispetto ai pazienti pediatrici, nei quali invece il tasso di guarigione della mucosa duodenale dopo due anni di GFD è del 95% (125). L'adesione ad una dieta priva di glutine conduce anche ad una progressiva riduzione del titolo degli anticorpi specifici della MC, fino alla loro completa negatività (6,124,125). Oltre al miglioramento sul piano clinico, istologico e sierologico, è dimostrato che la GFD è in grado di apportare modifiche al microbiota, già citato tra le componenti che subiscono variazioni a causa della malattia celiaca. Nello specifico, la rimozione del glutine dalla dieta porta ad un incremento di batteri quali *Firmicutes*, *Streptococcus spp.*, *Prevotella*, *Actinobacteria*, e *Gammaproteobacteria*. Nonostante ciò, si è osservato come, anche dopo GFD e riduzione dell'infiammazione a livello intestinale, i pazienti con MC non riescono comunque a raggiungere una normale composizione del microbiota (64).

Seppur concettualmente semplice, non sempre i pazienti riescono ad aderire perfettamente alla GFD. Le ragioni di tali difficoltà possono essere riconducibili a contaminazioni alimentari, costi elevati e scarsa reperibilità dei prodotti privi di glutine in alcuni contesti (6,7). Di notevole importanza risulta anche l'impatto psicologico che la GFD ha sui pazienti, in particolare se bambini o adolescenti. Una recente *review* ha posto l'accento sull'importanza di un supporto psicologico rivolto ai pazienti con diagnosi di MC in procinto di iniziare la dieta aglutinata. In particolare, secondo tale studio, il funzionamento sociale dei bambini e degli adolescenti con MC in GFD risulta essere l'area nella quale sono state identificate le maggiori difficoltà (126).

Numerosi studi hanno evidenziato che la GFD può esporre i pazienti con MC ad una dieta sbilanciata dal punto di vista nutrizionale. Nello specifico, una recente *review* ha sottolineato che i pazienti celiaci, soprattutto se adolescenti, tendono ad

assumere un maggior quantitativo di grassi rispetto ai coetanei in dieta libera e risultano anche avere un inadeguato introito di calcio, magnesio, ferro (127), selenio e zinco (124). Negli adulti, invece, è stato registrato uno scarso apporto di fibre se confrontati con soggetti che assumono liberamente il glutine. In tutte le fasce di età l'apporto di vitamina D è risultato insufficiente (127), così come quello di vitamina B12 e folati (124). Lo stato nutrizionale dei pazienti che aderiscono ad una dieta aglutinata dipende soprattutto dalla qualità degli alimenti che vengono scelti dal soggetto stesso. Se andiamo ad analizzare le farine prive di glutine che vengono utilizzate per la produzione di pane e altri prodotti formulati appositamente per celiaci, queste risultano essere povere sia in macro sia in micro-nutrienti. Per esempio, il riso e il mais contengono, se confrontati con altri cereali contenenti glutine, un ridotto quantitativo di proteine, fibre e folati. Inoltre, le formulazioni prive di glutine utilizzate per la preparazione di prodotti industriali per celiaci spesso richiedono l'impiego di additivi tensioattivi come amidi, ingredienti proteici e grassi come le proteine del latte e dell'uovo, oppure idrocolloidi e gelatine, in modo da migliorare la consistenza del prodotto andando a sopperire l'assenza di glutine. Spesso anche il contenuto di sale e zucchero risulta maggiore nei prodotti formulati appositamente per la dieta aglutinata (6,124). Le conseguenze sulla salute della GFD sono state a lungo studiate e i risultati appaiono spesso contrastanti. Alcuni studi osservazionali affermano che i valori della glicemia e della circonferenza vita sono più elevati nei soggetti che seguono una dieta aglutinata, mentre altri dichiarano il contrario. Sembra invece esserci maggiore unanimità tra diversi articoli nell'affermare che la pressione arteriosa è tendenzialmente maggiore nei soggetti in dieta aglutinata (128). Per quanto riguarda la ridotta densità minerale ossea dei pazienti con MC, questa risulta più difficilmente reversibile rispetto ai sintomi da malassorbimento anche dopo l'inizio della dieta aglutinata. Pertanto è fondamentale valutare attentamente la necessità di supplementazione, considerando anche lo scarso introito vitaminico di alcuni pazienti in GFD (124, 129).

Per le ragioni elencate, risulta quindi di fondamentale importanza l'affiancamento del paziente ad un nutrizionista all'inizio della GFD, in modo da promuovere l'aderenza alla dieta ma anche il suo corretto bilanciamento. Infatti, se condotta adeguatamente, con particolare attenzione rivolta agli alimenti naturalmente privi di glutine, la GFD non conduce a malnutrizione (124).

1.6.2 Altri approcci terapeutici

I numerosi ostacoli e le difficoltà che possono compromettere la corretta aderenza alla GFD hanno spronato diversi studiosi, negli ultimi anni, a ricercare terapie non dietetiche che potessero essere efficaci (130). Il trattamento farmacologico ideale per la MC dovrebbe permettere la reintroduzione del glutine nella dieta dei pazienti senza conseguenze sul loro stato di salute (131). Le terapie che sono state identificate possono essere raggruppate in cinque macrocategorie: modificazione del glutine, terapie intraluminali, immuno-modulazione, modulazione della permeabilità intestinale e della risposta adattativa (130). Attualmente, i farmaci che risultano più promettenti sono gli inibitori dell'interleuchina 15 (AMG-714), i quali hanno superato la fase II del trial clinico. L'obiettivo degli inibitori dell'IL-15 è quello di andare a bloccare il rilascio di citochine gliadina-mediato che conduce alla proliferazione degli enterociti, delle cellule dendritiche e dei linfociti intraepiteliali, tappe fondamentali nella patogenesi della MC. Anche gli antagonisti della zonulina, conosciuti con il nome di Larazotide Acetato (AT-1001), hanno dimostrato di avere le caratteristiche per essere impiegati come terapia per la MC. Altre promettenti molecole si trovano a stadi della sperimentazione più precoci e, tra di esse, troviamo inibitori della transglutaminasi tissutale 2, gli "HLA blockers" e anche alcuni probiotici. Tra le nuove possibilità terapeutiche stanno assumendo sempre maggior importanza alcuni enzimi da assumere per via orale che sono in grado di degradare il glutine. Oggi il più promettente sembra essere la latiglutenasi, anche se l'efficienza di degradazione del glutine è solamente dell'88% e sono emersi anche problemi relativi all'inattivazione da parte dei succhi gastrici e all'interazione con alcuni alimenti (132). Esistono anche dei microRNA che potrebbero essere utilizzati come target farmacologici, in quanto alterati nei pazienti con malattia celiaca; si tratta tuttavia di un campo che è stato studiato solo di recente e saranno quindi necessarie ulteriori indagini (131). In ciascuna delle categorie descritte esistono diverse limitazioni e complicanze che, in aggiunta alla mancanza di una completa efficacia della terapia, concorrono all'approvazione della sola GFD come terapia per la MC (130).

1.7 FOLLOW-UP

Dopo un tempo variabile dall'inizio della GFD i pazienti con MC ottengono una remissione clinica, sierologica e istologica nella maggior parte dei casi. Una volta

ottenuta tale remissione, è consigliato intraprendere un follow-up (FU) annuale sia per i bambini, che per gli adolescenti e per gli adulti (133). Il FU è fondamentale per comprendere se il paziente ha una buona aderenza alla GFD, in modo da sospettare la persistenza del danno istologico e prevenire le complicazioni come l'osteoporosi. Le rivalutazioni in corso di FU dovrebbero essere effettuate ogni 3-6 mesi nel corso del primo anno post-diagnosi e poi ogni 1-2 anni. Nei bambini il FU assume una grande importanza finché non raggiungono la loro "altezza bersaglio", in quanto la MC, come già descritto, può portare a bassa statura e scarsa crescita nei pazienti pediatrici (35). Se le tempistiche del FU hanno raccolto l'unanimità dei diversi studiosi, la figura medica che se ne deve occupare è invece ancora un argomento causa di controversie. La maggior parte delle linee guida concordano nell'affermare che il paziente debba essere seguito dai medici di medicina generale, dagli specialisti in gastroenterologia oppure da dietisti. Le linee guida del National Institute for Health and Care Excellence (NICE) del 2015, invece, suggeriscono che il FU debba essere preso in carico preferibilmente da dietisti esperti in MC. In ogni caso, tutte le linee guida sono concordi nello stabilire quali siano le informazioni fondamentali da raccogliere durante le valutazioni annuali del paziente. È essenziale effettuare una breve intervista per comprendere eventuali difficoltà nell'aderenza alla GFD, in aggiunta a test sierologici (IgA anti-TTG se il paziente non presenta deficit di IgA) e laboratoristici (124,125,134). Questi ultimi hanno lo scopo di valutare la presenza di malassorbimento di micronutrienti e vanno quindi a testare emocromo completo con formula leucocitaria, assetto marziale, folati, vitamina B12, calcio, fosfato e vitamina D. Risulta inoltre importante andare a sondare altri disturbi autoimmunitari attraverso il dosaggio del TSH (per le tireopatie) e della glicemia sierica (per il DM1). Non bisogna infine trascurare il profilo di funzionalità epatica, indagabile attraverso gli enzimi aspartato aminotransferasi (AST) e alanina aminotransferasi (ALT). La negativizzazione della sierologia specifica per MC è un segno di buona aderenza alla GFD ma non correla necessariamente con una completa risoluzione dell'atrofia dei villi a livello duodenale; al contrario, la persistenza di positività agli anticorpi tipici della MC dopo 12 mesi di GFD è indice di assunzione di glutine da parte del paziente (134).

CAPITOLO 2: MicroRNA E STRESS OSSIDATIVO

2.1 MicroRNA

Numerosi studi hanno cercato di svelare i meccanismi alla base della patogenesi della MC, di cercare nuovi marcatori molecolari da impiegare per la diagnosi o il follow-up del danno intestinale e di trovare metodi alternativi per evitare l'esecuzione di biopsie duodenali alla diagnosi. Negli ultimi due decenni, una classe di piccoli RNA non codificanti, chiamati microRNA (miRNA), è stata ampiamente studiata e si è scoperto il loro coinvolgimento in diversi processi biologici come la differenziazione, lo sviluppo e la morte cellulare (135). I miRNA sono brevi RNA non codificanti lunghi 18-22 nucleotidi (nt) e altamente conservati tra le diverse specie che, nel citoplasma cellulare, regolano l'espressione genica a livello post-trascrizionale (136). Vengono inizialmente trascritti dalla RNA polimerasi II come precursori lunghi (da 70 a 100 nt) chiamati pri-miRNA. La struttura primaria viene tagliata nel nucleo da un enzima, chiamato *Drosha*, di tipo RNA polimerasi III, per generare il precursore dei miRNA (pre-miRNA), una struttura *stem-loop* di circa 70 nucleotidi. I pre-miRNA vengono quindi trasferiti al citoplasma ed elaborati da un altro enzima di tipo RNA polimerasi III chiamato *Dicer*, che rimuove la regione loop della forcina (*hairpin*). In seguito il miRNA viene caricato sul RISC (*RNA-induced silencing complex*). A livello di questo complesso ribonucleoproteico, un filamento viene mantenuto come miRNA funzionale mentre l'altro viene eliminato. Solitamente, il miRNA maturo si lega alla regione 3' non tradotta (3'UTR) dei trascritti di mRNA di geni codificanti proteine. Un singolo miRNA potrebbe agire su diverse centinaia di mRNA bersaglio (molteplicità) e un mRNA può essere target di molti miRNA (cooperatività) allo stesso tempo. La complementarità parziale o totale del miRNA con l'mRNA target regola l'espressione dei geni bersaglio in modo negativo, portando rispettivamente alla *down*-regolazione o alla repressione della traduzione. Pertanto, una *up*-regolazione di uno specifico miRNA generalmente porta ad una ridotta espressione del suo mRNA target e della corrispondente proteina; mentre la *down*-regolazione di uno specifico miRNA potrebbe condurre a livelli più elevati dei mRNA e delle proteine target (135,136).

2.2 RUOLO DEI miRNA NELLA PATOGENESI, DIAGNOSI E FOLLOW-UP DELLA MALATTIA CELIACA

Nonostante il crescente numero di studi relativi al ruolo dei miRNA nelle malattie autoimmuni, i dati relativi ai miRNA in associazione alla malattia celiaca sono attualmente scarsi (135).

2.2.1 miRNA nelle biopsie duodenali

A livello dell'epitelio intestinale la regolazione dell'espressione genica è un processo complesso, modulato da diverse vie di *signaling* (per esempio quelle che regolano l'equilibrio proliferazione/differenziazione). Nei pazienti affetti da MC l'espressione di specifici miRNA risulta alterata, suggerendo che questi ultimi potrebbero essere coinvolti nella patogenesi della disfunzione di barriera ed essere associati a particolari caratteristiche cliniche. Diversi studi hanno rivelato che i miRNA sono deregolati nelle biopsie intestinali dei pazienti affetti da malattia celiaca. In particolare, tutti i mRNA target dei miRNA deregolati che sono riportati in letteratura (per esempio miR-31-5p, miR-192, miR-194, miR-449a e miR-638) sono coinvolti in diversi processi biologici di notevole importanza come il WNT-*signaling*, pathways di proliferazione e differenziazione cellulare, ma anche nella formazione delle giunzioni aderenti (135). Un recente studio dell'Università di New Mexico ha dimostrato che, nei pazienti con MC, TNF α causa un rapido incremento di uno specifico miRNA (miR-122a) a livello degli enterociti. L'over-espressione di miR-122a conduce alla degradazione dell'mRNA codificante per le occludine. A ciò consegue una deplezione di occludine a livello degli enterociti e una aumentata permeabilità del tratto gastrointestinale (137).

I miRNA risultano inoltre coinvolti nella regolazione della risposta immunitaria. Sono state condotte analisi per capire quali potessero essere i possibili target dei miRNA individuati e sono stati identificati diversi geni coinvolti in diversi processi immunitari. Tra questi, CXCL2 e NOD, due proteine coinvolte nell'immunità innata, avevano un significativo aumento sia dell'mRNA sia della proteina stessa nei pazienti Marsh 3C, e i livelli rilevati correlavano inversamente con i livelli di miR-192-5p (138). Inoltre, altri 3 fattori coinvolti nella regolazione dell'immunità innata e adattativa come FOXP3, *Run-related transcription factor 1* e IL-18 (rispettivamente target di miR-31-5p, miR-338-3p e miR-197) risultavano *up-*

regolati nei pazienti con MC. Oltre a ciò, si è notato che l'alterazione di CXCL2, NOD2, FOXP3, miR-192-5p, e miR-31-5p è dovuta proprio all'azione "trigger" che la gliadina svolge nei pazienti con MC (138).

Una recente review ha confermato che i miRNA sono in grado di alterare la funzionalità cellulare e la differenziazione delle cellule epiteliali, di incrementare l'apoptosi a livello delle cripte e di modificare la permeabilità intestinale (131). Le alterazioni dei miRNA sono inoltre risultate in grado di influenzare l'attività di NOTCH1 e quindi di interferire nella differenziazione cellulare degli enterociti dei pazienti con MC (131). In sintesi, nella mucosa duodenale dei pazienti con MC l'espressione dei miRNA è significativamente alterata e questa alterazione può incrementare l'espressione di molecole coinvolte nei processi immunitari (138).

2.2.2 miRNA circolanti

Fino a poco tempo fa, la quasi totalità degli studi che si proponeva di analizzare i miRNA in pazienti con MC, si limitava all'analisi dei miRNA estratti da campioni di mucosa duodenale (miRNA tissutali). Soltanto negli ultimi anni sono stati trovati miRNA circolanti in diversi fluidi corporei, quali siero e plasma, protetti dal legame con alcune proteine o racchiusi in vescicole e rilasciati nello spazio extracellulare. Molti studi hanno sottolineato la loro importanza come potenziali biomarcatori. Inoltre, i miRNA circolanti potrebbero agire come "attori" della comunicazione intercellulare, trasmettendo il loro "messaggio" ad altre cellule distanti, mediando azioni sia autocrine sia paracrine (139). Poiché i miRNA circolanti sono altamente stabili nella circolazione corporea e anche in condizioni di laboratorio estreme (per esempio pH e temperatura, cicli ripetuti di congelamento-scongelo, ecc.) e la loro espressione si associa a condizioni specifiche, risultano promettenti come possibili biomarker diagnostici, prognostici e terapeutici (135). Un'altra caratteristica dei miRNA circolanti è che sembrerebbero correlare con diversi stadi dello sviluppo della MC e con l'adesione alla dieta aglutinata.

Al tal proposito, Tan et al. hanno analizzato 53 miRNA in pazienti pediatrici arruolati nello studio alla nascita poiché ad alto rischio di sviluppare MC per familiarità e/o patologie associate. Tra i miRNA valutati, molti (miR-21-3p, miR-374a-5p, 144-3p, miR-500a-3p, miR-486-3p, let-7d-3p, let-7e-5p e miR-3605-3p) sono stati riscontrati più di un anno in anticipo rispetto alla positività degli anticorpi anti-TTG e, alcuni di essi (es. miR-150-5p/-3p), iniziano a normalizzarsi in seguito

all'introduzione della dieta aglutinata (140). In un altro studio, invece, sono stati analizzati miRNA-146a e miRNA-155, i quali hanno dimostrato alta sensibilità e specificità per la presenza di MC, indipendentemente dal trattamento dietetico in corso (141). Ulteriori miRNA che sono risultati significativamente alterati nei pazienti con MC rispetto ai pazienti sani sono miR-125b, il quale risulta *up*-regolato nei pazienti celiaci, mentre miR-192 (142) e miR-451a appaiono solitamente *down*-regolati rispetto ai controlli (135).

Un recente studio ha identificato una serie di miRNA che caratterizzano la celiachia refrattaria di tipo 2 (RCD2) e che possono essere monitorati nel siero dei pazienti. Per esempio, miR-200 e miR-192/215 risultano quasi assenti nei soggetti con RCD2 e con LNH, mentre miR-17/92 e C19MC sono *up*-regolati nella stessa categoria di pazienti. È interessante notare come alcuni dei miRNA identificati in concomitanza con RCD2 sono noti per essere associati con lo stato infiammatorio; altri, invece, sono in grado di segnalare in anticipo la progressione della patologia verso lo sviluppo di LNH, in quanto associati all'oncogenesi. Secondo il medesimo studio, i miRNA che risultano incrementati selettivamente nei pazienti con RCD2 e che potrebbero essere utilizzati come markers di tale condizione sono miR-770-5p, miR-181b-2-3p, miR-1193 e miR-1226-3p (143).

2.3 STRESS OSSIDATIVO

Lo stress ossidativo è una condizione di alterato bilancio tra la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e l'efficienza dei meccanismi antiossidanti (144). I ROS sono prodotti in seguito al fisiologico metabolismo cellulare e giocano un ruolo vitale nella stimolazione delle vie di trasduzione del segnale nelle cellule animali e vegetali, in risposta a cambiamenti delle condizioni dell'ambiente intra ed extra-cellulare. La maggior parte dei ROS viene prodotta nelle cellule dalla catena respiratoria mitocondriale. Durante reazioni metaboliche endogene, le cellule aerobiche producono ROS come l'anione superossido (O_2^-), perossido di idrogeno (H_2O_2), radicale idrossile ($OH \cdot$) e perossidi organici, come normali prodotti della riduzione biologica dell'ossigeno molecolare (145). Bassi livelli di ROS sono essenziali per diversi processi fisiologici, come la fosforilazione delle proteine, l'attivazione dei fattori di trascrizione, la differenziazione cellulare, l'apoptosi, l'immunità cellulare, ed inoltre agiscono come secondi messaggeri nella regolazione della funzionalità delle cellule cardiache e vascolari. Eccessivi livelli

di ROS hanno invece effetti su specifici componenti cellulari come il DNA, i lipidi e le proteine (146).

Le proteine sono biomolecole funzionali che influenzano l'attività cellulare, e lo stress ossidativo a carico delle stesse può esitare in una loro alterata funzione. Per quanto riguarda il danno a livello del DNA, esso gioca un ruolo significativo per quanto riguarda lo sviluppo di mutazioni, l'instabilità genetica e le modificazioni (144). Numerose ricerche nelle ultime due decadi hanno rivelato il meccanismo secondo il quale uno stress ossidativo protratto nel tempo può portare ad infiammazione cronica, la quale a sua volta media la maggior parte delle malattie croniche incluso il cancro, il diabete, le patologie cardiovascolari, neurologiche e polmonari. Lo stress ossidativo può attivare una molteplicità di fattori trascrizionali, tra cui NF- κ B, AP-1, p53, HIF-1 α , PPAR- γ , β Catenina/WNT e Nrf2. L'attivazione di questi fattori trascrizionali può condurre all'espressione di oltre 500 differenti geni, inclusi quelli codificanti per fattori di crescita, citochine pro-infiammatorie, chemochine, molecole che regolano il ciclo cellulare e molecole anti-infiammatorie (145).

2.3.1 8-OHdG come biomarker di stress ossidativo

Nel DNA nucleare e mitocondriale, 8-hydroxy-2' -deoxyguanosine (8-OHdG) e 8-oxo-7,8-dihydro-2' -deoxyguanosine (8-oxodG) sono le principali forme di danno ossidativo indotto dai radicali liberi e, di conseguenza, sono stati ampiamente utilizzati come biomarcatori per lo stress ossidativo e la cancerogenesi (147). 8-OHdG, nello specifico, è un addotto che si genera in seguito all'ossidazione della desossiguanina (gG), che è tra i normali nucleosidi che vanno a costituire il DNA (148). (Figura 6)

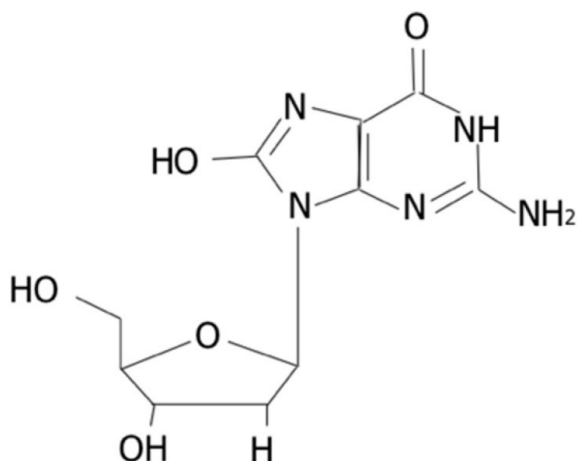


Figura 6: struttura dell'addotto 8-OHdG (149).

La caratteristica di 8-OHdG è che possiede due differenti conformazioni: la conformazione *syn* è in grado di appaiarsi alla base adenina attraverso un appaiamento del tipo “*hoogsten base pair*” e, contemporaneamente, la sua conformazione *anti* è ancora in grado di appaiarsi con la citosina. Di conseguenza, 8-OHdG causa una trasversione guanina-timina, la quale provoca mutazioni (149,150).

I primi studi relativi a 8-OHdG e al suo ruolo come biomarker per il danno ossidativo nei confronti del DNA risalgono al 1984, grazie a Kasai e Nishimura (151,152). Successivamente alla sua identificazione, l'addotto 8-OHdG è stato associato, secondo diversi studi, a numerose patologie cardiovascolari, ma anche alla broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) (149). I suoi valori possono inoltre risultare incrementati a causa del fumo di sigaretta, dell'esposizione occupazionale ad agenti fisici, chimici e biologici e in seguito al fisiologico invecchiamento. Oltre che come biomarker per lo stress ossidativo, 8-OHdG è stato anche utilizzato come marker del processo di cancerogenesi. I tumori correlati all'infiammazione si caratterizzano per la presenza di mutazioni a livello del DNA, che sono proprio 8-oxodG e 8-OHdG (150,151). Numerosi studi hanno inoltre dimostrato la formazione di 8-oxodG e 8-OHdG nei tessuti con lesioni cancerose e pre-cancerose dovute ad infezioni e in presenza di fattori pro-infiammatori (153). Recentemente sono state analizzate le caratteristiche che permettono a 8-OHdG di essere utilizzato come biomarker: esso possiede un elevato coefficiente di correlazione inter-classe (ICC di 0,96), fattore che rende le misurazioni dell'addotto riproducibili, ma anche un basso coefficiente di variazione, risultato che coincide

con una bassa deviazione standard (DS) e quindi elevata precisione della misurazione (149).

2.4 LO STRESS OSSIDATIVO NELLA MALATTIA CELIACA

Il coinvolgimento dello stress ossidativo nella patogenesi della MC è stato ampiamente discusso negli ultimi anni. I risultati di differenti esperimenti affermano che la gliadina è in grado di perturbare il bilancio pro-ossidante/anti-ossidante dei pazienti affetti tramite l'iperproduzione di ROS. Molteplici analisi *in vitro* confermano la presenza di squilibrio redox e aumentati livelli di radicali liberi in seguito all'esposizione di cellule alla gliadina (146,154). Precedenti studi hanno inoltre constatato, nei pazienti con MC, un notevole aumento dell'attività di SOD (superossido dismutasi) e una significativa riduzione dell'attività di GPx (glutazione perossidasi) (145), laddove GPx è considerato uno dei principali enzimi antiossidanti, che riduce i perossidi a composti meno tossici (155) e la famiglia delle superossido dismutasi è specializzata nell'eliminazione dei radicali anione superossido derivanti da stimoli extracellulari (156).

Secondo un altro studio lo stato infiammatorio tipico della MC attiva potrebbe essere direttamente correlato all'aumentata produzione di citochine pro-infiammatorie come INF- γ e TNF- α . È interessante sottolineare come alcune delle citochine prodotte possano, a loro volta, produrre una grande quantità di specie reattive dell'ossigeno. È inoltre noto che elevati livelli plasmatici di TNF-alfa sono responsabili dell'aumento dello stress ossidativo e del danno, ROS indotto, a carico del DNA delle cellule CD34+. La risposta infiammatoria, nello specifico, può condurre al reclutamento di leucociti attivati che poi, a loro volta, potrebbero dare origine ad un "*respiratory burst*", cioè ad un aumentato uptake di ossigeno, che causa il rilascio di elevate quantità di ROS, come il superossido e il perossido di idrogeno, con possibile successiva produzione di danni al DNA (154).

2.4.1 Rapporto tra dieta aglutinata e stress ossidativo

Considerando la patogenesi della malattia celiaca, una GFD è l'unico trattamento in grado di ristabilire l'integrità dell'epitelio ed eliminare le complicanze. Uno studio dell'Università di Granada ha valutato se l'uso di una GFD fosse sufficiente a mantenere un corretto bilancio pro-ossidativo e anti-ossidativo. Non furono trovate differenze nello stress ossidativo tra i pazienti con malattia celiaca in dieta

agglutinata stretta e i controlli; tuttavia INF-gamma, IL-1alfa, IP-10 e TNF β erano più elevati nei pazienti con MC (157). Anche VEGF era più elevato rispetto al gruppo di controllo. In conclusione, la dieta agglutinata nei pazienti con malattia celiaca è sufficiente a ridurre lo stress ossidativo; tuttavia, considerando il *signaling* infiammatorio, l'iniziale esposizione al glutine precedente all'inizio della dieta agglutinata è sufficiente per indurre uno stato infiammatorio che viene mantenuto (anche in corso di dieta agglutinata). L'aumento di VEGF registrato nel gruppo con MC potrebbe, invece, derivare da un meccanismo di compenso per riparare la mucosa danneggiata e l'atrofia dei villi a livello duodenale, a causa del suo ruolo nell'attivazione endoteliale e nella formazione di nuovi network vascolari stabili e funzionali (157). Secondo un altro studio, l'alterata omeostasi redox descritta nei pazienti con MC può condurre all'iper-espressione di alcuni fattori quali HSP-70 (*Heat Shock Protein 70*), HIF1-alfa (*Hypoxia-inducible factor 1-alpha*) e il fattore pro-apoptotico BAX. Tutti e tre i fattori analizzati sono in grado di apportare alterazioni a livello della mucosa intestinale, soprattutto in termini di integrità di barriera. Sono stati in seguito valutati gli stessi pazienti dopo l'adesione alla GFD e si è riscontrata la permanenza di un'aumentata espressione intestinale di HSP-70. Questi risultati suggeriscono che la dieta priva di glutine riesce a ridurre lo stress ossidativo causato dalla malattia celiaca solo parzialmente (158).

2.5 STRESS OSSIDATIVO E miRNA A CONFRONTO

Se le informazioni riguardo al ruolo dello stress ossidativo e dei miRNA nella patogenesi della celiachia risultano in aumento negli ultimi anni, gli studi che si focalizzano sulla relazione tra miRNA e ROS nel contesto della MC sono estremamente scarsi.

È noto che le alterazioni nella produzione dei miRNA sono in grado di influenzare l'espressione e la funzionalità di numerosi altri fattori, inclusi quelli coinvolti nello stress ossidativo. È infatti confermata l'esistenza di un rapporto tra i livelli di ROS e la funzione regolatrice svolta da alcuni miRNA, relazione che riveste particolare importanza nel contesto della cancerogenesi (159). Una recente review ha posto l'accento sull'esistenza di alcuni specifici miRNA, chiamati ROS-miRs o redoximiRs, i quali risultano essere regolati dallo stress ossidativo e sono in grado di modulare i target di espressione genica in risposta ai ROS stessi. In particolare, l'asse stress ossidativo (OS)/NFkB induce l'espressione di miR-9/9*; viceversa,

miR-21 regola l'omeostasi dei ROS inibendo la risposta anti-ossidante nelle cellule endoteliali umane. Un recente articolo ha inoltre evidenziato una correlazione tra i valori di 8-OHdG e di un particolare miRNA: miR-200a. Nello specifico, Tinaburri *et al* hanno sottolineato una netta riduzione di OGG1-2a, un enzima critico nel processo di riparazione dell'addotto 8-OHdG, in seguito all'over-espressione di miR-200a nei cheratinociti invecchiati. Oltre alla riduzione dell'enzima OGG1-2a, l'over-espressione di miR-200a conduce all'up-regolazione dell'inflammosoma NLRP3 e dell'interleuchina IL-1 β . Dunque, miR-200a gioca un ruolo fondamentale nella determinazione dello stress ossidativo, in quanto risulta essere in grado di inibire la riparazione del danno ossidativo a carico del DNA (160).

Questi risultati suggeriscono che i ROS possono essere sia regolatori a monte sia effettori a valle dell'attività di alcuni miRNA (161).

Il *cross-talk* tra ROS e miRNA si basa, secondo le conoscenze attuali, su tre momenti ben precisi. In primis, è stato dimostrato che lo stress ossidativo invecchiamento-correlato è in grado di down-regolare *Dicer*, uno dei due enzimi chiave per la produzione dei miRNA, insieme a *Drosha*. La down-regolazione di *Dicer* conduce ad una drammatica riduzione dell'espressione dei miRNA, condizione che alcuni studi hanno messo in correlazione con una soppressione della produzione dei ROS nelle cellule endoteliali microvascolari umane. Queste informazioni suggeriscono che l'espressione di *Dicer* fa parte di un circuito di feedback che ha lo scopo di modulare la produzione dei ROS e di mantenere l'omeostasi cellulare. Il secondo punto cardine di questo complesso rapporto è dato dal fatto che i ROS sono in grado di regolare l'espressione dei miRNA anche attraverso la modulazione di specifici fattori di trascrizione quali c-myc, p53, c-Jun, HIF e NFkB. La terza modalità con la quale i ROS modulano l'espressione dei miRNA è attraverso le modificazioni epigenetiche. Si è osservato che le regioni "promotore" di due particolari miRNA (miR-125b e miR-199a) vengono ipermetilate da parte di DNMT1 (DNA metil-transferasi 1) in seguito all'esposizione ad H₂O₂ (161,162).

D'altro canto, i miRNA modulano la produzione di ROS intracellulare agendo su altrettanti *pathways* di *signaling*. Alcuni studi hanno dimostrato che diversi miRNA (tra cui miR-144, miR-28, miR-200a, e miR-93) possiedono come target il pathway di Nrf2 (*nuclear factor erythroid-derived 2-like 2*) e del suo inibitore Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*). Questi ultimi sono degli importanti regolatori della

risposta del nostro organismo allo stress ossidativo. Infatti, in caso di aumento dei ROS, il complesso Nrf2/Keap1 si separa e Nrf2 viene trasferito nel nucleo, favorendo la produzione di fattori anti-ossidanti che vanno ad inibire l'apoptosi cellulare, promuovendo allo stesso tempo la sopravvivenza cellulare e la tumorigenesi. La seconda modalità con cui i miRNA regolano l'omeostasi dei ROS è la modulazione delle vie di segnale mitocondriali, attraverso la regolazione di diverse proteine mitocondriali implicate nel mantenimento dell'equilibrio redox (162,163). Di notevole importanza, infine, è la capacità dei miRNA di modulare la *pathway* di SOD/Catalasi. La famiglia delle superossido dismutasi risulta essere, per la maggior parte degli elementi che la compongono, target di specifici miRNA, tra cui il già citato miR-21, che è in grado di sopprimere l'attività di SOD2 e SOD3 (162,163).

Il rapporto tra miRNA e ROS descritto assume una particolare importanza nel contesto della tumorigenesi di molteplici neoplasie, tra cui alcune del tratto GI (cancro gastrico, esofageo e coloretale), mentre le informazioni relative al ruolo di tale *cross-talk* nella patogenesi della MC sono purtroppo ancora scarse (163).

È interessante considerare che miR-155, già citato come miRNA fortemente associato alla presenza di malattia celiaca (141), risulta anche implicato nella regolazione dell'apoptosi e dello stato infiammatorio. Più precisamente, miR-155 è in grado di stimolare la produzione di linfociti Th17, di attivare le cellule NK (*Natural Killer*) e, inoltre, quando i suoi valori sono incrementati, contribuisce allo sviluppo di stress ossidativo (164,165). Similmente, miR-146 sembra associarsi alla MC con elevate sensibilità e specificità (141) e, contemporaneamente, è coinvolto nella regolazione dello stato infiammatorio tramite la modulazione dei linfociti T regolatori, dei monociti e dei macrofagi. Lo stesso miR-146 è anche in grado di influenzare i processi di apoptosi e autofagia (164). Andando a considerare un ulteriore miRNA, miR-21, anche in questo caso esso risulta essere associato sia alla malattia celiaca, tanto da essere stato candidato come possibile biomarker della patologia (140,166,167), sia allo stress ossidativo e alla risposta cellulare anti-ROS (160,162,163). Allo stesso modo, miR-125b è significativamente correlato alla malattia celiaca (142) e, contemporaneamente, ha un ruolo nella modulazione della risposta infiammatoria (164) e nella protezione dallo stress ossidativo (168,169). Infine, miR-451a appare significativamente *down*-regolato nei pazienti con malattia celiaca se confrontato con il valore nei controlli sani (135) e, secondo un recente

studio sullo stress ossidativo a livello polmonare, una riduzione di miR451 correla con una minor attività degli enzimi catalasi e glutazione perossidasi, entrambi di fondamentale importanza nell'ambito dell'equilibrio redox (170).

SCOPO DELLO STUDIO

Ad oggi esistono alcuni studi che testimoniano l'interazione tra stress ossidativo e miRNA nelle patologie neurodegenerative, nelle patologie del fegato e dello stomaco, nel diabete e nell'infarto miocardico acuto. Il ruolo di questa interazione nei pazienti adulti con MC rimane, invece, ancora da chiarire.

Questo studio pilota è stato dunque condotto per valutare il ruolo dei miRNA e dello stress ossidativo nei pazienti adulti con MC e, in particolare, per analizzare le loro potenziali interazioni. Nello specifico si è posta l'attenzione su alcuni miRNA che sono conosciuti per avere un ruolo nella patogenesi della malattia celiaca e che, allo stesso tempo, hanno anche un noto rapporto con lo stress ossidativo. I miRNA in questione, dosati a partire da prelievi ematici, sono stati miR-155, miR-200, miR-125, miR-192, miR-21, miR-451, miR-146 e miR-1226. I dati presenti in letteratura riguardo al loro rapporto con le diverse fasi della MC sono ad oggi contrastanti, pertanto si è deciso di includere nello studio differenti gruppi di soggetti, in modo da valutarne gli eventuali cambiamenti partendo dai pazienti con nuova diagnosi di MC, dai pazienti celiaci in dieta aglutinata e, infine, includendo anche casi di celiachia complicata.

Lo scopo dello studio è, dunque, quello di mettere in relazione i miRNA citati con l'addotto 8-OHdG, estratto sia da biopsie duodenali sia dal sangue periferico, in differenti gruppi di pazienti, per comprendere l'interazione tra di essi e il ruolo di quest'ultima nella malattia celiaca.

MATERIALI E METODI

Pazienti

Per lo svolgimento di questa tesi è stata arruolata prospettivamente, tra novembre 2019 e maggio 2023, una coorte soggetti celiaci sottoposti a EGDS per conferma della diagnosi di celiachia (CeD-dia), per follow up della MC (CeD-fu) e per la nota diagnosi di celiachia complicata (CeD-compl), seguiti presso il centro di celiachia dell'Azienda Ospedaliera di Padova. Inoltre, nello stesso arco temporale, sono stati inclusi nello studio anche pazienti non celiaci ma sottoposti ad EGDS per altri disturbi gastrointestinali (CP), impiegati come gruppo di controllo nell'analisi dell'addotto 8-OHdG e controlli sani (HC), reclutati tra lo staff medico e paramedico, utilizzati come gruppo di controllo per l'analisi dei miRNA circolanti. Per tutti i gruppi l'inclusione nello studio è avvenuta sulla base dei seguenti criteri:

- Età 18-80 anni.
- Consenso informato scritto alla partecipazione allo studio.

Per tutti i gruppi i criteri di esclusione allo studio sono invece stati:

- Età < 18 anni o > 80 anni;
- Revoca del consenso informato scritto;
- Disturbi psichiatrici;
- Patologie neoplastiche;
- Altre patologie autoimmuni;
- Assunzione di farmaci in grado di interferire con la produzione di radicali liberi come farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS), inibitori di pompa protonica (PPI) o integratori a base di vitamina C.

Criteri di esclusione aggiuntivi per i singoli gruppi:

- Dieta libera contenente glutine al momento dell'esame endoscopico (CeD-dia);
- Complicazioni associate alla malattia celiaca (CeD-dia e CeD-fu);
- Mancata adesione alla dieta priva di glutine (CeD-fu e CeD-compl);
- Sierologia e/o istologia negativa per malattia celiaca (HC, CP).

Raccolta dati

Tutti i pazienti che hanno fornito il proprio consenso informato scritto alla partecipazione allo studio sono stati sottoposti, prima di procedere agli accertamenti

previsti dallo studio, ad un colloquio finalizzato alla raccolta di dati specifici, inclusi dati anagrafici, anamnesi patologica prossima e remota, finalizzate alla valutazione della presenza di patologie autoimmuni, neoplastiche o di altra natura, e l'anamnesi farmacologica.

Inoltre sono stati raccolti in un registro dedicato, per i gruppi di pazienti celiaci (CeD-dia, CeD-fu, CeD-compl), i dati relativi alla diagnosi (sintomi e segni di malattia, sierologia, esito istologico) e, per i gruppi di pazienti CeD-fu e CeD-compl, i dati relativi al follow up, inclusi sintomi persistenti, compliance alla dieta (VAS 0-10), sierologia ed esito istologico di controllo.

Estrazione del DNA e quantificazione dell'addotto 8-OHdG dai campioni biotici

Tutti i soggetti hanno fornito il proprio consenso informato scritto alla partecipazione allo studio. I gruppi sottoposti a EGDS al momento del reclutamento (CeD-dia, CeD-fu, CeD-compl e CP) hanno accettato di sottoporsi, oltre che alle biopsie gastriche e duodenali routinarie, ad ulteriori quattro biopsie dalla seconda porzione duodenale. Una volta raccolti, i campioni biotici necessari allo studio sono stati tempestivamente congelati in azoto liquido e successivamente mantenuti a -80°C fino al momento della determinazione dell'addotto 8-OHdG.

La quantificazione dell'addotto 8-OHdG sui campioni biotici di mucosa duodenale è avvenuta presso il laboratorio dell'U.O.C. di Gastroenterologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova. Il procedimento si è articolato in tre fasi (171):

1. Estrazione del DNA genomico;
2. Idrolisi enzimatica del DNA;
3. Analisi mediante HPLC-EC (*High Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection*).

Il DNA genomico è stato estratto dalle biopsie attraverso un kit commerciale, denominato Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Italia, Milano). La concentrazione di DNA estratto da ciascun campione è stata stabilita attraverso un'analisi spettrofotometrica, impiegando lo Spettrofotometro Lambda 25 Perkin Elmer e leggendo l'assorbanza a $\lambda = 240$ nm. Al momento dell'uso, i campioni di DNA estratti dai campioni biotici sono stati scongelati e da questi sono stati prelevati 100 μ l per la determinazione dell'addotto 8-OHdG. A ciascun campione sono stati aggiunti 20 μ l di sodio acetato (100 mM) a pH 4 e 10 μ l di nucleasi P1 e,

dopo centrifugazione a 3000 rpm per 1 minuto, sono stati lasciati incubare a 37°C per 45 minuti in modo da digerire il DNA a nucleotidi. Terminata l'incubazione, ai campioni sono stati aggiunti 20 µl di TRIS/HCl (1M) a pH 8 e 10 µl (7500 U) di fosfatasi alcalina e, dopo centrifugazione a 3000 rpm per 1 minuto, sono stati lasciati nuovamente incubare a 37°C per 45 minuti affinché i nucleotidi si idrolizzassero a nucleosidi.

La determinazione dei livelli di 8-OHdG è stata eseguita mediante HPLC con rilevazione elettrochimica (HPLC-EC).

In breve il metodo è consistito nell'iniettare il campione idrolizzato e filtrato nel sistema HPLC (Alliance Waters 2695) e analizzato mediante una colonna LC-18 DB (Supelco, 75 x 46 mm) provvista di una pre-colonna (Supelguard LC-18-DB, 2 cm, Supelco, Bellefonte, PA) (168). L'analisi è avvenuta in condizioni isocratiche ad un flusso di 1 ml al minuto, impiegando una fase mobile costituita per il 90% da 50 mM di KH₂PO₄ tampone ad un pH di 5.5 e per il 10% da Metanolo.

Il sistema di rilevazione e quantificazione utilizzato per l'analisi degli analiti presenti nel DNA disponeva di due canali:

- Il primo canale, per il rilevatore spettrofotometrico, impostato ad una lunghezza d'onda di 254 nm (una banda dello spettro UV molto intensa ed in grado di rilevare minime quantità di sostanza). Tramite questo primo canale è stato possibile apprezzare la separazione dei desossinucleotidi (deossicitosina, 5-metildeossicitosina, deossiguanosina, deossitimina e deossiadenina);
- Il secondo canale, per il rilevatore elettrochimico (Coulochem II, ESA, Chelmsford, MA), dotato di una cella elettrochimica (ESA, modello 5011) provvista di due elettrodi, ai quali sono stati applicati due differenti potenziali (150 mV e 350 mV) che rimangono costanti durante l'intera analisi. In questo modo viene garantita la creazione di un potenziale sufficientemente elevato per far avvenire la reazione di ossidoriduzione, grazie alla quale si possono rilevare le variazioni di corrente nel tempo. La corrente risultante dalla reazione di ossidoriduzione è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'addotto 8-OHdG.

La quantificazione di quest'ultimo è stata resa possibile grazie all'impiego di uno standard di 8-OHdG (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), il quale è stato iniettato prima di ciascuna serie di analisi. L'intervallo di operatività dello standard

è compreso tra 1 ng/μl e 0.03 ng/μl, ed è stato analizzato in triplicato al potenziale di lavoro di 350 mV con una sensibilità di 10 nA (171). Le quantità di addotto rilevate sono state paragonate ai livelli di desossiguanosina (dG) presenti in ogni campione di DNA secondo il rapporto n° addotti/ 10⁵dG.

Estrazione e quantificazione dell'addotto 8-OHdG e miRNA dai prelievi ematici

Tutti i soggetti inclusi nello studio si sono sottoposti ad un prelievo ematico per la raccolta di un campione di siero, di plasma ed allo stoccaggio di una provetta di sangue intero.

Il DNA genomico dai campioni di sangue intero conservati a -20°C è stato estratto mediante l'utilizzo di un kit commerciale (QIAamp® DNA Blood Midi/Maxi, Qiagen) seguendo le indicazioni del fornitore.

In breve, 2 ml di sangue intero sono stati trattati con 200 μl di proteinasi K, Buffer fornito dal kit, incubati a 70°C e successivamente trattati con Etanolo per ottenere un lisato che è stato caricato in una Colonna spin QIAamp. Il DNA si lega alla membrana QIAamp mentre le impurità sono efficacemente lavate via in due fasi di centrifugazione. Infine, il DNA ottenuto viene eluito con buffer e letto allo spettrofotometro per la quantificazione.

La determinazione dei livelli di 8-OHdG nel sangue è stata eseguita seguendo il metodo già descritto nel paragrafo precedente.

Per la separazione del siero e del plasma dai campioni ematici raccolti si è proceduto con una prima centrifugazione a 3000 giri per minuto (rpm) per 15 minuti e successivamente i surnatanti ottenuti sono stati ulteriormente centrifugati a 4000 rpm per 15 minuti per rimuovere eventuali residui cellulari, utilizzando materiale sterile. I campioni di siero e plasma così ottenuti sono stati conservati a -80° C fino al momento dell'analisi biochimica.

L'RNA totale è stato estratto da 200 uL di plasma utilizzando un Kit commerciale di estrazione per siero/plasma (miRNeasy Serum/Plasma Advanced kit - Qiagen). L'efficienza dell'estrazione è stata verificata mediante l'aggiunta di oligonucleotidi sintetici (UniSp2, UniSp4, UniSp5) alle concentrazioni raccomandate. In seguito è stata effettuata la trascrizione inversa per la sintesi del cDNA utilizzando il kit miRCURY LNA RT (Qiagen), seguendo le istruzioni del produttore. L'efficienza

di tale procedura è stata valutata mediante l'aggiunta di oligonucleotidi sintetici (UniSp6).

L'espressione dei miRNA è stata poi quantificata mediante analisi qRT-PCR (miRCURY LNA miRNA PCR Assays and PCR Panels - Qiagen), secondo le istruzioni del produttore, su un sistema PRISM 7900HT (Applied Biosystems) con miR-93-5p, miR-103a-3p, miR-425-5p come controlli interni per la normalizzazione. Le condizioni per la qRT-PCR sono state le seguenti: 95° C per 2 minuti, seguite da 40 cicli a 95° C per 10 secondi e a 56° C per altri 60 secondi.

L'espressione relativa di ciascun miRNA è stata calcolata utilizzando il metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (fold change), utilizzando i volontari sani come gruppo di controllo di riferimento per la normalizzazione.

Analisi statistica

Per l'analisi statistica dei dati raccolti, le variabili categoriche sono state espresse sottoforma di frequenze con percentuali, mentre le variabili continue come medie con deviazione standard (DS). La comparazione tra variabili categoriche è avvenuta tramite test del chi-quadro, mentre quella tra variabili continue attraverso Student t-test. È stata considerata come statisticamente significativa una p value inferiore allo 0.05. Le analisi statistiche sono state effettuate mediante l'impiego del software STATA 11.

RISULTATI

Caratteristiche della popolazione studiata

Le caratteristiche della popolazione studiata sono riassunte nella Tabella IV.

Sono stati arruolati prospettivamente nello studio 51 pazienti: 12 pazienti alla diagnosi (CeD-dia), 18 pazienti celiaci in dieta senza glutine (CeD-fu), 5 pazienti celiaci complicati di cui 3 con diagnosi di RCD1 e 2 con diagnosi di RCD2 (CeD-compl), 6 soggetti sani (HC) e 10 con altre patologie diverse dalla celiachia (CP), che si erano sottoposti a EGDS per reflusso gastroesofageo (4) e dispepsia (6).

Per quanto riguarda la distribuzione dei due sessi, tra i gruppi di pazienti celiaci non si è riscontrata una differenza significativa di genere (Tabella IV).

L'età media alla diagnosi \pm deviazione standard (DS) è, per i 3 gruppi che includono pazienti celiaci (gruppi CeD-dia, CeD-fu e CeD-compl): 27,97 anni \pm 12,54 anni per il gruppo CeD-dia, 25,49 \pm 15,06 anni per il gruppo CeD-GFD e di 49,44 \pm 13,07 anni per il gruppo CeD-compl. Per quanto riguarda il dato dell'età media alla diagnosi, non sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra i 3 gruppi.

Per i gruppi CeD-fu e CeD-compl, la durata media della dieta aglutinata \pm DS è stata di, rispettivamente, 2,03 \pm 0,6 anni e 5,35 \pm 8,90 anni, con una differenza statisticamente significativa tra CeD-fu e CeD-compl ($p = 0.006$).

Per quanto riguarda la sintomatologia alla diagnosi, dei pazienti appartenenti al gruppo CeD-dia, 2 avevano sintomatologia classica, 9 non classica e solo uno era asintomatico. Considerando invece il gruppo CeD-fu, 7 pazienti presentavano sintomatologia classica, 10 non classica e uno era asintomatico. Per quanto riguarda il gruppo CeD-compl, 4 pazienti avevano sintomatologia classica, 1 non classica e nessuno era asintomatico. Considerando la sintomatologia alla diagnosi, non esistono differenze statisticamente significative tra i gruppi analizzati.

	CeD-dia	CeD-fu	CeD-compl	P CeD-dia vs CeD- fu	P CeD-fu vs CeD- compl
Numero di pazienti	12	18	5		
Maschi, n (%)	5 (41.7)	7 (38.9)	2 (40)	0.5	0.8
Età alla diagnosi, media ± DS	28 ± 12,5	25,5 ± 15,1	49,4 ± 13,1	0.5	0.1
Durata dieta aglutinata, media ± DS		2 ± 0,6	5,3 ± 8,9		0.006*
Presentazione clinica alla diagnosi				0.7	0.5
Classica, n (%)	2 (16.7)	7 (38.9)	4 (80)		
Non classica, n (%)	9 (75)	10 (55.6)	1 (20)		
Asintomatica, n (%)	1 (8.3)	1 (5.6)	0 (0)		

Tabella IV: Caratteristiche della popolazione in studio. *P* = *p* value; * *P* < 0.05; *n*, numero; *DS*, deviazione standard.

Il sesso e l'età dei due gruppi controllo erano così distribuiti:

- CP: 70% donne, età media 25,7 anni;
- HC: 66,7% donne, età media 36,5 anni.

Determinazione dei miRNA circolanti

Nei gruppi CeD-dia, CeD-fu, CeD-compl e HC sono stati determinati i seguenti miRNA secondo le modalità già descritte: miR-155, miR-200, miR-125, miR-192, miR-21, miR-451, miR-146 e miR-1226.

La tabella V riporta gli esiti dei miRNA nelle diverse popolazioni in studio.

Tra i miRNA valutati, miR-451, miR-146, miR-155 e miR-1226 sono risultati essere espressi diversamente tra diversi gruppi.

In particolare, i gruppi CeD-dia e CeD-fu hanno livelli significativamente inferiori di miR-451 ($p = 0.01$ e $p = 0.006$, rispettivamente) rispetto al gruppo HC, mentre lo stesso miRNA non è risultato diverso nelle due popolazioni di celiaci ($p = 0.1$)

L'espressione di miR-146 nel gruppo CeD-dia e CeD-fu è risultata significativamente maggiore ($p = 0.03$ e $p = 0.01$, rispettivamente) rispetto al gruppo HC, inoltre è stato osservato un livello maggiore dello stesso miRNA nel gruppo CeD-dia rispetto al gruppo CeD-fu ($p = 0.03$).

Inoltre, l'espressione di miR-155 nei gruppi CeD-dia e CeD-fu è risultata maggiore rispetto al gruppo HC ($p = 0.05$ e $p = 0.06$, rispettivamente).

È infine da sottolineare che l'espressione di miR-1226 è risultata maggiore nel gruppo CeD-compl rispetto al gruppo CeD-fu, tuttavia non è stata raggiunta una significatività statistica a causa della scarsa numerosità del gruppo ($p = 0.2$).

Tutti gli altri miRNA presentavano una distribuzione simile tra i gruppi in esame.

	CD at diagnosis (CeD-dia)	CD at follow up (CeD-fu)	CD complicated (CeD-compl)	Healthy controls (HC)	P CeD-dia vs CeD-fu	P CeD-fu vs CeD-compl	P CeD-dia vs HC	P CeD-fu vs HC
miR-155 , n ± DS	3.3±2.4	3.2±2.4	1.3±0.8	1.2±0.7	0.9	0.09	0.05	0.06
miR-200 , n ± DS	1.7±1.7	2.3±2.8	1.3±1.1	1.0±0.9	0.5	0.4	0.4	0.3
miR-125 , n ± DS	0.8±0.6	1.2±0.8	1.6±1.5	1.1±0.5	0.1	0.4	0.3	0.8
miR-192 , n ± DS	1.7±1.3	1.3±0.7	1.1±0.9	1.0±0.3	0.6	0.6	0.5	0.3
miR-21 , n ± DS	1.6±0.7	1.4±0.5	1.7±0.8	1.0±0.3	0.4	0.3	0.09	0.1
miR-451 , n ± DS	0.6±0.3	0.7±0.2	0.9±0.1	1.0±0.8	0.1	0.07	0.01*	0.006*
miR-146 , n ± DS	4.1±3.0	2.3±1.1	1.9±1.2	1.1±0.6	0.03*	0.4	0.03*	0.01*
miR-1226 , n ± DS	5.0±5.1	3.5±7.8	9.9±13.6	0.9±1.0	0.5	0.2	0.07	0.4

Tabella V: risultati dei miRNA nelle popolazioni dello studio. N ± DS, numero ± deviazione standard; P, p value; * P < 0.05. CeD dia: celiac disease at diagnosis; CD fu: celiac disease al follow up (on a gluten free diet); CeD compl: complicated celiac disease; HC: healthy controls.

Si riportano nella figura 7 i dati relativi ai miRNA nei gruppi analizzati.

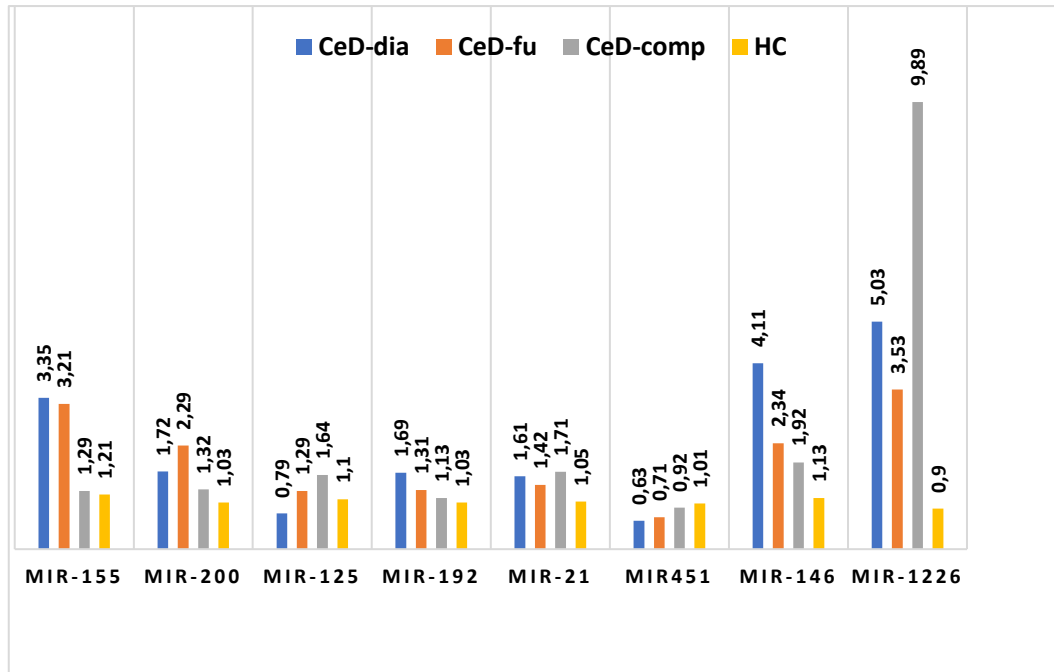


Figura 7: visione d'insieme dei miRNA analizzati messi a confronto nei diversi gruppi. Da sinistra a destra sono rappresentati in ordine miR-155, miR-200, miR-125, miR-192, miR-21, miR-451, miR-146 e miR-1226.

Determinazione dell'addotto 8-OHdG

La determinazione dell'addotto 8-OHdG è stata effettuata a partire da prelievi ematici venosi e da campioni istologici provenienti dalla seconda porzione duodenale dei soggetti aderenti allo studio. Per l'analisi dell'addotto 8-OHdG sono stati utilizzati come controlli i pazienti appartenenti al gruppo PC.

La tabella VI riporta gli esiti dell'analisi di 8-OHdG tissutale ed ematico nelle diverse popolazioni in studio.

I valori ematici di 8-OHdG sono risultati significativamente maggiori nei gruppi CeD-dia e CeD-fu rispetto al gruppo CP ($p = 0.03$ e $p = 0.002$, rispettivamente), mentre non sono risultati diversi nelle due popolazioni di celiaci ($p = 0.7$).

Considerando sempre 8-OHdG tissutale, non si raggiunge una differenza significativa nel confronto tra gruppi, pur osservandosi un trend significativamente maggiore nei CeD-dia rispetto ai PC ($P = 0.07$) e ai CeD-fu (0.3).

	CD at diagnosis (CeD-dia)	CD at follow up (CeD-fu)	CD complicated (CeD-compl)	Patients controls (PC)	P CeD-dia vs CeD-fu	P CeD-fu vs CeD-compl	P CeD-dia vs PC	P CeD-fu vs PC
8-OHdG (peripheral blood), n ± DS	12.7 ± 4.91	13.4 ± 3.7	16.3 ± 11.5	8.3 ± 3.0	0.7	0.1	0.03*	0.002*
8-OHdG (duodenal tissue), n ± DS	8 ± 4.3	6.4 ± 3.2	4.4 ± 0.9	4.7 ± 2.9	0.3	0.4	0.07	0.2

Tabella VI: risultati dei valori di 8-OHdG tissutale e circolante nelle popolazioni dello studio. *N ± DS*, numero ± deviazione standard; *P*, *p* value; * *P* < 0.05. *CeD dia*: celiac disease at diagnosis; *CD fu*: celiac disease al follow up (on a gluten free diet); *CeD compl*: complicated celiac disease; *PC*: patients controls.

Si riportano in Figura 8 i dati relativi a 8-OHdG tissutale e circolante nei gruppi analizzati.

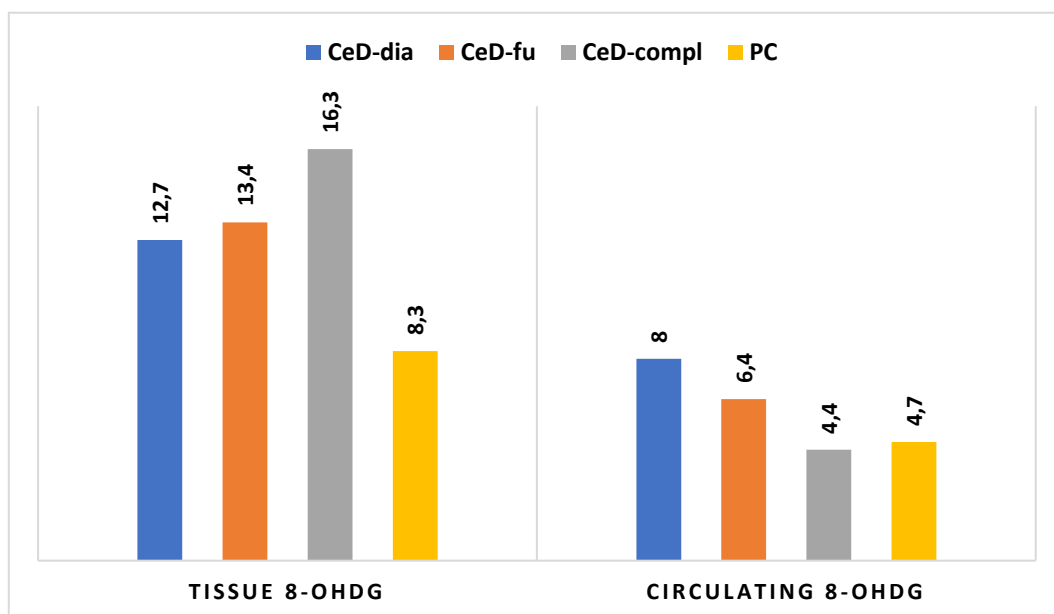


Figura 8: visione d'insieme dei valori di 8-OHdG tissutale e circolante messi a confronto nei diversi gruppi.

Confronto miRNA e 8-OHdG

I valori ematici di 8-OHdG sono risultati correlare positivamente con miR-155 nel gruppo CeD-compl ($r = 0.9$, $p = 0.04$), mentre i valori ematici di 8-OHdG tendono a correlare negativamente con miR-125 nel gruppo CeD-dia, ($r = 0.5$ e $p = 0.06$). Nessuna correlazione è stata dimostrata tra i valori di 8-OHdG tissutale e i diversi miRNA analizzati.

Si riportano in figura 9 i dati relativi al confronto tra 8-OHdG tissutale e circolante e i miRNA nei gruppi analizzati.

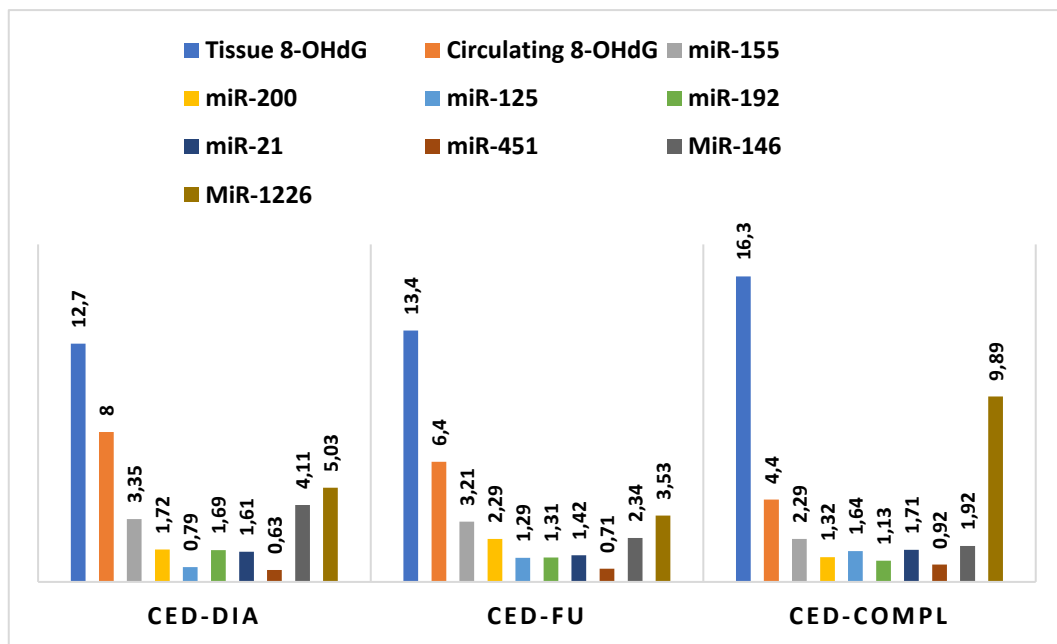


Figura 9: visione d'insieme di 8-OHdG tissutale, 8-OHdG circolante e dei diversi miRNA analizzati nei 3 gruppi di celiaci (CeD-dia, CeD-fu e CeD-compl). Per ciascun gruppo, da sinistra verso destra sono rappresentati 8-OHdG tissutale, 8-OHdG circolante, miR-155, miR-200, miR-125, miR-192, miR-21, miR451, miR-146, miR-1226.

DISCUSSIONE

Il presente lavoro di tesi mirava ad analizzare due elementi coinvolti nella patogenesi della MC: lo stress ossidativo e i miRNA.

Il primo elemento, lo stress ossidativo, è noto per avere un importante ruolo nella MC: infatti, la gliadina è in grado di perturbare il bilancio pro-ossidante/anti-ossidante dei pazienti affetti tramite l'iperproduzione di ROS. Nel presente studio è stato utilizzato come biomarker di stress ossidativo l'addotto 8-OHdG, il prodotto dell'ossidazione della desossiguanina in seguito all'esposizione del DNA allo stress ossidativo. Recentemente sono state valutate le caratteristiche che permettono a 8-OHdG di essere utilizzato come biomarker: esso possiede un elevato coefficiente di correlazione inter-classe e anche un basso coefficiente di variazione (149), motivo per il quale abbiamo deciso di impiegarlo come marker di stress ossidativo. Gli studi che in passato hanno indagato il ruolo dello stress ossidativo nella malattia celiaca si sono concentrati prevalentemente sulla popolazione pediatrica (156,157), a differenza del nostro studio, che invece vedeva come criterio di esclusione proprio un'età inferiore ai 18 anni, andando dunque ad indagare una coorte di pazienti adulti. Inoltre, secondo quanto riportato in letteratura, in alcuni studi l'addotto 8-OHdG è stato isolato da campioni di urina (156), mentre in altri (157) dal plasma. Per quanto abbiamo potuto constatare, nessuno studio in letteratura ha analizzato l'addotto 8-OHdG sia circolante sia da campioni di mucosa duodenale. Nonostante ciò, gli studi che hanno valutato, sia su campioni di urina sia su plasma, l'addotto, concordano nell'affermare che i pazienti celiaci presentano livelli di 8-OHdG superiori rispetto ai controlli sani. Sono invece contrastanti i risultati degli studi citati riguardo all'efficacia del trattamento dietetico (GFD) nel ridurre lo stress ossidativo. Sembra infatti che la produzione di ROS venga in parte soppressa grazie all'eliminazione del glutine nella dieta, ma che rimanga comunque un background di infiammazione indipendentemente dal trattamento in corso (157).

Nel nostro studio, i valori ematici di 8-OHdG sono risultati significativamente maggiori nel gruppo dei pazienti celiaci alla diagnosi (CeD-dia) e nel gruppo di pazienti celiaci al follow up (CeD-fu) rispetto ai controlli, mentre non sono state registrate differenze tra i due gruppi di celiaci.

Per quanto riguarda invece i valori di 8-OHdG tissutale, è stato registrato un trend di valori superiori nel Gruppo CeD-dia rispetto ai controlli, ma anche nel gruppo

CeD-compl rispetto a tutti gli altri gruppi, non raggiungendo tuttavia una differenza statisticamente significativa probabilmente a causa della scarsa numerosità del campione.

Questi risultati appaiono in linea con quanto riportato negli studi citati, supportando l'ipotesi della presenza di un maggior stress ossidativo nei pazienti celiaci rispetto ai controlli, probabilmente dato dall'iniziale interazione con il glutine nel periodo pre-diagnosi. L'assenza di una differenza significativa tra il gruppo di celiaci alla diagnosi e al follow up supporta i risultati di Diaz-Castro et al (157), secondo il quale una dieta priva di glutine non è del tutto in grado di ridurre lo stress ossidativo nei pazienti con MC. Nel nostro studio i pazienti CeD-fu e CeD-compl erano in dieta priva di glutine da almeno 1 anno, con una media della durata della dieta aglutinata di 2 anni nel gruppo CeD-fu e di 5,3 nel gruppo CeD-compl. Probabilmente saranno necessari ulteriori approfondimenti e futuri studi che vadano ad inquadrare il danno ossidativo dopo un tempo maggiore di dieta aglutinata. Infatti, secondo uno studio del 2018 (125) condotto su pazienti celiaci in GFD, sembra che il danno indotto dal glutine nelle fasi iniziali della patologia necessiti di tempistiche maggiori per risolversi laddove il paziente in questione sia adulto, mentre nei pazienti pediatrici il processo di ripristino della mucosa duodenale sembrerebbe sia più veloce. Non solo, secondo il medesimo studio la guarigione del danno nel bambino è più completa e precoce, mentre nell'adulto spesso è parziale e richiede più anni. Questi dati potrebbero in parte spiegare i risultati ottenuti nel nostro studio che, per l'appunto, si basa esclusivamente su pazienti adulti. Inoltre, nella popolazione complicata è atteso un aumentato stress ossidativo per la natura pre-neoplastica del RCD e della persistenza del danno intestinale che la caratterizza.

Per quanto riguarda gli altri markers inclusi nello studio, i miRNA, negli ultimi anni sono state condotte molteplici ricerche che hanno confermato il loro ruolo nella MC e nella comunicazione intercellulare, grazie alla loro capacità di trasmettere informazioni in modo sia autocrino sia paracrino. È inoltre stata posta recentemente l'attenzione proprio sui miRNA come potenziali biomarker diagnostici, prognostici e terapeutici di MC, essendo altamente stabili nella circolazione corporea e anche in condizioni di laboratorio estreme (135,141-143).

La scelta dei miRNA da analizzare nello studio si è basata sulla letteratura e, in particolare, si è optato per miR-155, miR-21, miR-146, miR-125, miR-451, miR-

192 e miR-200, noti per essere associati sia alla MC sia allo stress ossidativo. Si è deciso di includere anche miR-1226 in quanto risulta, secondo precedenti studi, associato alla RCD.

miRNA-146 e miRNA-155 hanno recentemente dimostrato, come riportato in letteratura, alta sensibilità e specificità per la presenza di MC, indipendentemente dal trattamento dietetico in corso (141). Quest'ultima caratteristica rende i due miRNA ottimi candidati come biomarker di patologia.

Nel nostro studio, miR-146 e miR-155 sono proprio tra i miRNA che hanno dato risultati promettenti in tal senso. Nello specifico, l'espressione di miR-146 nei pazienti con MC, sia alla diagnosi sia al follow up, è risultata significativamente superiore rispetto ai controlli sani. Inoltre è stato osservato un livello significativamente maggiore dello stesso miRNA nel gruppo CeD-dia rispetto al gruppo CeD-fu. Questi risultati sono in linea con i pochi studi che hanno analizzato miR-146 in associazione alla MC in pazienti adulti: la sua up-regolazione sia nel gruppo CeD-dia sia CeD-fu sembrerebbe confermare la sua posizione di ottimo candidato come biomarker di patologia.

Sempre secondo il nostro studio, l'espressione di miR-155 nei gruppi CeD-dia e CeD-fu è risultata maggiore rispetto al gruppo di controllo, pur non raggiungendo una significatività statistica. Anche questo risultato è in linea con quanto riportato in altri studi (141,143) e potrebbe essere importante per future considerazioni sul suo utilizzo come marker di malattia.

Un altro miRNA che secondo recenti studi correla con la MC è miR-451 che, nello specifico, risulta down-regolato nei pazienti celiaci rispetto ai controlli sani (135). I risultati del nostro studio sono concordi con quanto affermato da Felli et al (135), dal momento che i gruppi CeD-dia e CeD-fu hanno mostrato livelli significativamente inferiori di miR-451 rispetto ai controlli. Contemporaneamente, lo stesso miRNA non è risultato diverso tra il gruppo di celiaci alla diagnosi e quello di celiaci al follow up, caratteristica che, come per miR-146 e miR-155, depone per il suo possibile futuro utilizzo come biomarker di patologia.

Infine, è doveroso porre l'accento sui nostri risultati riguardanti miR-1226: la sua espressione è risultata maggiore nel gruppo CeD-compl rispetto ai gruppi CeD-dia, CeD-fu e HC, tuttavia non è stata raggiunta una significatività statistica a causa della scarsa numerosità del gruppo. Questo dato è perfettamente in linea con un recente studio di Bianchi et al (143), secondo il quale miR-1226 risulta up-regolato

selettivamente nei pazienti con RCD2. Tra altri miRNA analizzati nel medesimo studio, è quello che più correla con la malattia celiaca refrattaria e che quindi sembra essere il miglior candidato come biomarker per RCD2.

I risultati di miR-125, miR-21, miR-200 e miR-192 non sono stati discussi in questo capitolo poiché non significativi.

I nostri risultati supportano l'ipotesi secondo la quale alcuni miRNA sono deregolati nella MC e alcuni di essi lo sono indipendentemente dal trattamento dietetico in corso. Nonostante ciò, secondo alcuni studi, la deregolazione di alcuni miRNA a livello ematico come miR-146 e miR-155 è confermata nei pazienti con MC, tuttavia non risulta essere sufficientemente specifica di malattia, essendo alterati anche in altre malattie come l'artrite reumatoide e l'Alzheimer (141, 143). Quest'ultima considerazione è di estrema importanza nella valutazione del possibile utilizzo dei miRNA come markers di patologia: sono sicuramente necessari ulteriori studi per chiarire se l'up o down-regolazione di alcuni miRNA sia sufficientemente sensibile e specifica per la MC.

Successivamente all'analisi dello stress ossidativo e dei miRNA citati, abbiamo deciso di valutarne la relazione. Infatti, ad oggi non esistono review che abbiano messo a confronto i miRNA con l'addotto 8-OHdG in pazienti adulti con malattia celiaca. L'obiettivo dello studio è stato dunque quello di comprendere se esiste un crosstalk tra i due elementi. Le motivazioni di questa indagine risiedono nel fatto che, qualora esistesse un crosstalk tra determinati miRNA e lo stress ossidativo, ci sarebbero delle importanti implicazioni nel follow up, in ambito prognostico e terapeutico. Infatti, se alcuni miRNA che si associano con alta sensibilità e specificità alla MC risultassero anche essere associati allo stress ossidativo nei pazienti con MC, potrebbero essere impiegati per monitorare i pazienti nel follow up.

Nonostante miRNA e 8-OHdG non siano mai stati confrontati in pazienti con MC, esistono numerosi lavori che hanno provato l'esistenza di una stretta relazione tra determinati miRNA e lo stress ossidativo in altre patologie, come nelle malattie neurodegenerative, nelle patologie del fegato e dello stomaco, nel diabete e nell'infarto miocardico acuto. Infatti, è noto che diversi miRNA sono in grado di svolgere una funzione di modulazione nei confronti dello stress ossidativo e, viceversa, quest'ultimo riesce ad up-regolare o down-regolare specifici miRNA (141,163-170).

Nel nostro studio pilota abbiamo confrontato gli 8 miRNA elencati precedentemente sia con l'addotto 8-OHdG estratto dalle biopsie duodenali, sia con l'addotto estratto dai prelievi ematici venosi. Per quanto riguarda 8-OHdG tissutale, non è stato trovato alcun tipo di correlazione con i miRNA citati. Al contrario, i valori di 8-OHdG ematico hanno dimostrato di correlare positivamente con miR-155 nel gruppo di celiaci con malattia complicata. Questo dato è molto interessante in quanto miR-155 è un miRNA che, sia secondo la letteratura sia secondo il nostro studio, tende ad associarsi con buone sensibilità e specificità alla MC.

È inoltre da segnalare che i valori di 8-OHdG ematico correlano negativamente con miR-125 nel gruppo CeD-dia, senza tuttavia raggiungere una significatività statistica. Quest'ultimo risultato è in linea con quanto già dimostrato in altri studi (161,162) che mettevano a confronto miR-125 con lo stress ossidativo nelle cellule cancerose, nelle quali miR-125 risultava appunto correlare negativamente con lo stress ossidativo.

Tali evidenze potrebbero supportare l'ipotesi dell'esistenza di un crosstalk tra miRNA e stress ossidativo anche nella malattia celiaca, aggiungendola alla lista delle patologie nelle quali questi due elementi, aventi un ruolo nella patogenesi, sono in grado di influenzarsi vicendevolmente.

CONCLUSIONI

Per quanto abbiamo potuto constatare, il nostro studio è il primo ad essersi proposto di mettere a confronto i miRNA con l'addotto 8-OHdG in pazienti adulti con malattia celiaca. Seppur con il limite di un campione di soggetti ridotto, abbiamo per la prima volta dimostrato l'esistenza di un crosstalk tra miR-155 e miR-125 e i valori ematici dell'addotto 8-OHdG.

Sicuramente saranno necessari ulteriori studi con un campione molto più ampio, in particolare per quanto riguarda il gruppo dei pazienti con malattia celiaca complicata. Pensiamo che possa essere un argomento meritevole di approfondimenti in quanto l'esistenza di un crosstalk tra miRNA e stress ossidativo risulterebbe utile nella valutazione delle complicanze della malattia celiaca durante il follow up, ma anche per la valutazione dell'aderenza alla GFD. Se l'esistenza di un'interazione tra miRNA e 8-OHdG nella MC fosse confermata, un requisito fondamentale dei futuri studi in tale ambito sarebbe quello di chiarire la natura del crosstalk. Dunque, così come è stato fatto per altre patologie, sarebbe utile comprendere in che modo miR-155 e miR-125 si rapportano allo stress ossidativo e se questa relazione può avere un significato prognostico, soprattutto nei casi di malattia celiaca complicata.

Oltre agli approfondimenti sul crosstalk tra miRNA e stress ossidativo, sono necessari ulteriori studi anche sui due elementi separatamente.

È ancora da chiarire quali siano i miRNA con la più elevata sensibilità e specificità per MC, anche se numerosi studi, tra cui il presente, depongono per miR-451, miR-146, miR-155 e, per la RCD2, miR-1226.

Nel contesto dello stress ossidativo, sono necessari futuri studi che includano l'analisi di 8-OHdG anche a livello tissutale oltre che ematico, in modo da implementare le informazioni ricavate nel nostro studio. È inoltre ancora da confermare la persistenza di livelli elevati di stress ossidativo nei pazienti dopo l'inizio di una dieta priva di glutine: sarebbe pertanto utile dosare l'addotto 8OH-dG a distanza di tempo negli stessi individui per valutarne eventuali cambiamenti. Trattandosi di un progetto pilota, le indagini dello studio proseguiranno nel prossimo futuro, con la possibilità di fornire dati significativi a riguardo.

BIBLIOGRAFIA

1. Green PHR, Lebowhl B, Greywoode R. Celiac disease. Vol. 135, Journal of Allergy and Clinical Immunology. Mosby Inc.; 2015. P.1099-106.
2. Ciclitira PJ. Recent advances in coeliac disease. Clin Med (Lond). 2003 Mar-Apr;3(2):166-9. doi: 10.7861/clinmedicine.3-2-166.
3. Biesiekierski JR. What is gluten? J Gastroenterol Hepatol. 2017; 32:78-81.
4. Rubio-Tapia A, Murray JA. Celiac Disease. Curr Opin Gastroenterol. 2010; 26(2):116-22.
5. Catassi C, Verdu EF, Bai JC, Lionetti E. Coeliac disease. Lancet. 2022 Jun 25;399(10344):2413-2426.
6. Bara Aljada, Ahmed Zohni, Wael El-Matary. The Gluten-free diet for celiac disease and beyond. Nutrients 2021 Nov 9;13(11):3993.
7. Makharia, G.K., Singh, P., Catassi, C. et al. The global burden of coeliac disease: opportunities and challenges. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2022;19, 313–327.
8. Losowsky MS. A history of coeliac disease. Dig Dis. 2008;26(2):112-20.
9. Burki TK. Samuel Gee: the modern era for coeliac disease. Lancet Gastroenterol Hepatol. 2019;4(2):100.
10. MI Pinto-Sanchez, J A Silvester, B Lebowhl, DA Leffler, RP Anderson, A Therrien, CP Kelly, EF Verdu. Society for the study of Celiac Disease position statement on gaps and opportunities in coeliac disease. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2021 Dec;18(12):875-884.
11. Dicke WK, Weijers HA, Van de Kamer JH. Coeliac disease II. The presence in wheat of a factor having a deleterious effect in cases of coeliac disease. Acta Paediatr. 1953;42(1):34-42.
12. Makharia GK, Chauhan A, Singh P, Ahuja V. Review article: Epidemiology of coeliac disease. Aliment Pharmacol Ther. 2022 Jul;56 Suppl 1:S3-S17.
13. Al-Toma A, Volta U, Auricchio R, Castillejo G, Sanders DS, Cellier C, et al. European Society for the Study of Coeliac Disease (ESsCD) guideline for coeliac disease and other gluten-related disorders. United European Gastroenterol J-2019;7(5):583-613.
14. Catassi C, Ratsh I-M, Fabini E, Rossini M, Coppa GV, Giorgi PL, et al. Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg. Lancet.1994 Jan 22;343(8891):200-3.

15. Caio G, Volta U, Sapone A, Leffler DA, De Giorgio R, Catassi C, Fasano A. Celiac disease: a comprehensive current review. *BMC Med.* 2019 Jul 23;17(1):142.
16. Lohi S, Mustalahti K, Kaukinen, Laurila K, Collin P, Rissanen H, et al. Increasing prevalence of coeliac disease over time. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007;26(9):1217-25.
17. Lindfors K, Ciacci C, Kurppa K, Lundin KEA, Makharia GK, Mearin ML, et al. Coeliac Disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2019;5(1):3.
18. Lionetti E, Catassi C. New clues in celiac disease epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, and treatment. *Int Rev Immunol.* 2011;30(4):219-31.
19. Ciclitira PJ, Johnson MW, Dewar DH, Ellis HJ. The pathogenesis of coeliac disease. *Mol Aspects Med.* 2005;26(6):421-58.
20. Singh P, Arora A, Strand TA, Leffler DA, Catassi C, Green PH, et al. Global Prevalence of Celiac Disease: Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2018 Jun 1;16(6):823-36.
21. Benjamin Lebwohl, Alberto Rubio-Tapia. Epidemiology, Presentation, and Diagnosis of Celiac Disease. *Gastroenterology* 2021;160:63–75.
22. Ludvigsson JF, Murray JA. Epidemiology of Celiac Disease. *Gastroenterol Clin North Am.* 2019;48(1):1-18.
23. Mustalahti K, Catassi C, Runanen A, Fabiani E, Heier M, McMillan S, et al. The prevalence of celiac disease in Europe: results of a centralized, international mass screening project. *Ann Med.* 2010;42(8):587-95.
24. Stahl M, Li Q, Lynch K, Koletzko S, Mehta P, Gragert L, Norris JM, Andrén Aronsson C, Lindfors K, Kurppa K, Ilonen J, Krischer J, Alkolkar B, Ziegler AG, Toppari J, Rewers MJ, Agardh D, Hagopian W, Liu E; TEDDY Study Group. Incidence of Pediatric Celiac Disease Varies by Region. *Am J Gastroenterol.* 2023 Mar 1;118(3):539-545.
25. Rubio-Tapia A, Ludvigsson JF, Brantner TL, Murray JA, Everhart JE. The prevalence of celiac disease in the United States. *Am J Gastroenterol.* 2012;107(10):1538-44;quiz 7,45.
26. Choung RS, Ditah IC, Nadeau AM, Rubio-Tapia A, Marietta EV, Brantner TL, et al. Trends and racial/ethnic disparities in gluten-sensitive problems in the United States: Findings from the national health and nutrition examination surveyes from 1988 to 2012. *Am J Gastroenterol.* 2015 Mar 10;110(3):455-61.
27. Farrukh A, Mayberry JF. COELIAC DISEASE IN CENTRAL AND SOUTH AMERICA: time for a concerted approach to its epidemiology. *Arq Gastroenterol.* 2015 Apr-Jun;52(2):129-33.

28. Parra-Medina R, Molano-Gonzalez N, Rojas-Villarraga A, Agmon-Levin N, Arango MT, Shoenfeld Y, et al. Prevalence of celiac disease in latin america: a systematic review and meta-regression. *PLoS One*. 2015;10(5):e124040.
29. Singh P, Arora S, Singh A, Strand TA, Makharia GK. Prevalence of celiac disease in Asia: a systematic review and meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2016; 31(6):1095-101.
30. Ramakrishna BS, Makharia GK, Chetri K, Dutta S, Mathur P, Ahuja V, et al. Prevalence of Adult Celiac Disease in India: Regional Variations and Associations. *Am J Gastroenterol*. 2016;111(1):115-23.
31. Bardella MT, Fredella C, Saladino V, Trovato C, Cesana BM, Quatrini M, et al. Gluten intolerance: Gender-and age-related differences in symptoms. *Scand J Gastroenterol*. 2005 Jan;40(1):15-9.
32. Green PHR, Stravropoulos SN, Panagi SG, Goldstein SL, McMahon DJ, Absan H, et al. Characteristics of adult celiac disease in the USA: results of a national survey. *Am J Gastroenterol*. 2001;96(1):126-31.
33. Kujawowicz K, Mirończuk-Chodakowska I, Witkowska AM. Dietary Behavior and Risk of Orthorexia in Women with Celiac Disease. *Nutrients*. 2022 Feb 21;14(4):904.
34. Ciacci C, Cirillo M, Sollazzo R, Savino G, Sabbatini F, Mazzacca G. Gender and clinical presentation in adult celiac disease. *Scand J Gastroenterol*. 1995;30(11):1077-81.
35. Lima RF, Maria da Silva Kotze L, Kotze LR, Chrisostomo KR, Nisihara R. Gender-Related Differences in Celiac Patients at Diagnosis. *Arch Med Res*. 2019 Oct;50(7):437-441.
36. Jansson-Knodell CL, King KS, Larson JJ, Van Dyke CT, Murray JA, Rubio-Tapia A. Gender-Based Differences in a Population-Based Cohort with Celiac Disease: More Alike than Unalike. *Dig Dis Sci*. 2018 Jan;63(1):184-192.
37. Dixit R, Lebowitz B, Ludvigsson JF, Lewis SK, Rizkalla-Reilly N, Green PH. Celiac disease is diagnosed less frequently in young adult males. *Dig Dis Sci*. 2014 Jul;59(7):1509-12.
38. Galli G, Amici G, Conti L, Lahner E, Annibale B, Carabotti M. Sex-Gender Differences in Adult Coeliac Disease at Diagnosis and Gluten-Free-Diet Follow-Up. *Nutrients*. 2022 Aug 4;14(15):3192.
39. Pasternack C, Hervonen K, Mansikka E, Reunala T, Kaukinen K, Salmi T. Sex-differences in Gluten-free Dietary Adherence and Clinical Symptoms in Patients with Long-term Treated Dermatitis Herpetiformis. *Acta Derm Venereol*. 2022 May 16;102:adv00713.

40. Rubio-Tapia A, Kyle RA, Kaplan EL, Johnson DR, Page W, Erdtmann F, et al. Increased Prevalence and Mortality in Undiagnosed Celiac Disease. *Gastroenterology*. 2009;137(1):88-93.
41. Iversen R, Sollid LM. The Immunobiology and Pathogenesis of Celiac Disease. *Annu Rev Pathol*. 2023 Jan 24;18:47-70.
42. Kuja-Halkola R, Lebwohl B, Halfvarson J, Wijmenga C, Magnusson PK, Ludvigsson JF. Heritability of non-HLA genetics in coeliac disease: a population-based study in 107 000 twins. *Gut*. 2016;65(11):1793-8.
43. Espino L, Núñez C. The HLA complex and coeliac disease. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2021;358:47-83.
44. Brown NK, Guandalini S, Semrad C, Kupfer SS. A Clinician's Guide to Celiac Disease HLA Genetics. *Am J Gastroenterol*. 2019;114(10):1587-92.
45. Aboulaghras S, Piancatelli D, Taghzouti K, Balahbib A, Alshahrani MM, Al Awadh AA, Goh KW, Ming LC, Bouyahya A, Oumhani K. Meta-Analysis and Systematic Review of HLA DQ2/DQ8 in Adults with Celiac Disease. *Int J Mol Sci*. 2023 Jan 7;24(2):1188.
46. Rubio-Tapia A, Hill ID, Kelly CP, Calderwood AH, Murray JA. ACG clinical guidelines: Diagnosis and management of celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2013 May; 108(5):656-76.
47. Oxentenko AS, Rubio-Tapia A. Celiac Disease. *Mayo Clin Proc*. 2019;94(12):2556-71.
48. Lundin KEA, Wijmenga C. Coeliac disease and autoimmune disease – Genetic overlap and screening. Vol. 12, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. Nature Publishing Group; 2015.p.507-15.
49. Gnodei E, Meneveri R, Barisani D. Celiac disease: From genetics to epigenetics. *World J Gastroenterol*. 2022 Jan 28;28(4):449-463.
50. Machado MV. New Developments in Celiac Disease Treatment. *Int J Mol Sci*. 2023 Jan 4;24(2):945.
51. Schumann M, Richter JF, Wedell I, Moos V, Zimmermann-Kordmann M, Schneider T, Daum S, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Mechanisms of epithelial translocation of the alpha(2)-gliadin-33mer in coeliac sprue. *Gut*. 2008 Jun;57(6):747-54.
52. Herrera MG, Amundarain MJ, Nicoletti F, Drechsler M, Costabel M, Gentili PL, Dodero VI. Thin-Plate Superstructures of the Immunogenic 33-mer Gliadin Peptide. *Chembiochem*. 2022 Nov 18;23(22):e202200552.
53. Schumann M, Siegmund B, Schulzke JD, Fromm M. Celiac Disease: Role of Epithelial Barrier. Vol. 3, *CMGH*. Elsevier Inc; 2017.p.150-62.

54. Fasano A, Catassi C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology*. 2001;120(3):636-51.
55. Silano M, Vincentini O, De Vincenzi M. Toxic, immunostimulatory and antagonist gluten peptides in celiac disease. *Curr Med Chem*. 2009;16(12):1489-98.
56. Lammers KM, Lu R, Brownley J, Lu B, Gerard C, Thomas K, et al. Gliadin Induces an Increase in Intestinal Permeability and Zonulin Release by Binding to the Chemokine Receptor CXCR3. *Gastroenterology*. 2008 Jul;135(1):194-204.
57. Levescot A, Malamut G, Cerf-Bensussan N. Immunopathogenesis and environmental triggers in coeliac disease. *Gut*. 2022 Jul 25;71(11):2337-49.
58. Stricker S, Müller M, Zimmer KP, Jacob R. Altered Posttranslational Modification of Microtubules Contributes to Disturbed Enterocyte Morphology in Celiac Disease. *Int J Mol Sci*. 2023 Jan 30;24(3):2635.
59. Diós Á, Srinivasan B, Gyimesi J, Werkstetter K, Valenta R, Koletzko S, Korponay-Szabó IR. Changes in Non-Deamidated versus Deamidated Epitope Targeting and Disease Prediction during the Antibody Response to Gliadin and Transglutaminase of Infants at Risk for Celiac Disease. *Int J Mol Sci*. 2022 Feb 24;23(5):2498.
60. Leonard MM, Kenyon V, Valitutti F, Pennacchio-Harrington R, Piemontese P, Francavilla R, Norsa L, Passaro T, Crocco M, Baldassarre M, Trovato CM, Fasano A; CDGEMM working group. Cohort profile: Celiac disease genomic, environmental, microbiome and metabolome study; a prospective longitudinal birth cohort study of children at-risk for celiac disease. *PLoS One*. 2023 Mar 8;18(3):e0282739.
61. Leonard MM, Valitutti F, Karathia H, Pujolassos M, Kenyon V, Fanelli B, et al. Microbiome signatures of progression toward celiac disease onset in at-risk children in a longitudinal prospective cohort study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(29):e2020322118.
62. Olivares M, Walker AW, Capilla A, Benitez-Paez A, Palau F, Parkhill J, et al. Gut microbiota trajectory in early life may predict development of celiac disease. *Microbiome*. 2018;6(1):36.
63. Girdhar K, Dogru YD, Huang Q, Yang Y, Tolstikov V, Raisingani A, Chrudinova M, Oh J, Kelley K, Ludvigsson JF, Kiebish MA, Palm NW, Ludvigsson J, Altindis E. Dynamics of the gut microbiome, IgA response, and plasma metabolome in the development of pediatric celiac disease. *Microbiome*. 2023 Jan 13;11(1):9.

64. Trakman GL, Fehily S, Basnayake C, Hamilton AL, Russell E, Wilson-O'Brien A, Kamm MA. Diet and gut microbiome in gastrointestinal disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2022 Feb;37(2):237-245.
65. Xu Q, Ni JJ, Han BX, Yan SS, Wei XT, Feng GJ, Zhang H, Zhang L, Li B, Pei YF. Causal Relationship Between Gut Microbiota and Autoimmune Diseases: A Two-Sample Mendelian Randomization Study. *Front Immunol.* 2022 Jan 24;12:746998.
66. Groele L, Szajewska H, Szalecki M, Świdorska J, Wysocka-Mincewicz M, Ochocińska A, et al. Lack of Effect of *Lactobacillus Rhamnosus* GG and *Bifidobacterium Lactis* Bb12 on Beta-Cell Function in Children With Newly Diagnosed Type 1 Diabetes: A Randomised Controlled Trial. *BMJ Open Diabetes Res Care* (2021) 9(1):e001523.
67. Auricchio R, Calabrese I, Galatola M, et al. Gluten consumption and inflammation affect the development of celiac disease in at-risk children. *Sci Rep* 2022;12:5396.
68. Skoracka K, Hryhorowicz S, Rychter AM, Ratajczak AE, Szymczak-Tomczak A, Zawada A, Słomski R, Dobrowolska A, Krela-Kaźmierczak I. Why are western diet and western lifestyle pro-inflammatory risk factors of celiac disease? *Front Nutr.* 2023 Jan 20;9:1054089.
69. Diani L, Forchielli ML. Sugar Intake: Are All Children Made of Sugar? *Life (Basel).* 2021 May 14;11(5):444.
70. Sood A, Midha V, Makharia G, Thelma BK, Halli SS, Mehta V, Mahajan R, Narang V, Sood K, Kaur K. A simple phenotypic classification for celiac disease. *Intest Res.* 2018 Apr;16(2):288-292.
71. Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A, Green PHR, et al. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms *Gut.* 2013 Jan;62(1):43-52.
72. Salarian L, Khavaran M, Dehghani SM, Mashhadiagha A, Moosavi SA, Rezaeianzadeh S. Extra-intestinal manifestations of Celiac disease in children: their prevalence and association with human leukocyte antigens and pathological and laboratory evaluations. *BMC Pediatr.* 2023 Jan 4;23(1):8.
73. Durazzo M, Ferro A, Brascugli I, Mattivi S, Fagoonee S, Pellicano R. Extra-Intestinal Manifestations of Celiac Disease: What Should We Know in 2022? *J Clin Med.* 2022 Jan 4;11(1):258.
74. Guéant JL, Guéant-Rodriguez RM, Alpers DH. Vitamin B12 absorption and malabsorption. *Vitam Horm.* 2022;119:241-274.
75. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabò IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, et al. European society for pediatric gastroenterology, hepatology, and nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. Vol. 54, *Journal of*

- Pediatric Gastroenterology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*; 2012.p.136.60.
76. Balaban DV, Dima A, Jurcut C, Popp A, Jinga M. Celiac crisis, a rare occurrence in adult celiac disease: A systematic review. *World J Clin Cases*. 2019 Feb 6;7(3):311-319.
 77. Mazman Dİ, Dereci S, Hızlı Ş, Doğan HT, Ateş BB, Hızal G, Demir AM, Aksu AÜ. Celiac crisis with thrombocytopenia and coagulopathy in a child. *Turk J Pediatr*. 2022;64(6):1156-1160.
 78. Seidita A, Mansueto P, Compagnoni S, Castellucci D, Soresi M, Chiarello G, Cavallo G, De Carlo G, Nigro A, Chiavetta M, Mandreucci F, Giuliano A, Disclafani R, Carroccio A. Anemia in Celiac Disease: Prevalence, Associated Clinical and Laboratory Features, and Persistence after Gluten-Free Diet. *J Pers Med*. 2022 Sep 26;12(10):1582.
 79. Montoro-Huguet MA, Santolaria-Piedrafita S, Cañamares-Orbis P, García-Erce JA. Iron Deficiency in Celiac Disease: Prevalence, Health Impact, and Clinical Management. *Nutrients*. 2021 Sep 28;13(10):3437.
 80. Atallah Baydoun, Joseph E. Maakaron, Houssam Halawi, Jihane Abou Rahal & Ali T. Taher. Hematological manifestations of celiac disease, *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 2012. 47(12):1401-141.
 81. Lungaro L, Manza F, Costanzini A, Barbalinardo M, Gentili D, Caputo F, Guarino M, Zoli G, Volta U, De Giorgio R, Caio G. Osteoporosis and Celiac Disease: Updates and Hidden Pitfalls. *Nutrients*. 2023 Feb 22;15(5):1089.
 82. Kondapalli AV, Walker MD. Celiac disease and bone. *Arch Endocrinol Metab*. 2022 Nov 11;66(5):756-764.
 83. Alkhiari R. Psychiatric and Neurological Manifestations of Celiac Disease in Adults. *Cureus*. 2023 Mar 3;15(3):e35712.
 84. Tersigni C, Castellani R, de Waure C, Fattorossi A, De Spirito M, Gasbarrini A, Scambia G, Di Simone N. Celiac disease and reproductive disorders: meta-analysis of epidemiologic associations and potential pathogenic mechanisms. *Hum Reprod Update*. 2014 Jul-Aug;20(4):582-93.
 85. Di Simone N, Gratta M, Castellani R, D'Ippolito S, Specchia M, Scambia G, Tersigni C. Celiac disease and reproductive failures: An update on pathogenic mechanisms. *Am J Reprod Immunol*. 2021 Apr;85(4):e13334.
 86. Jabeen S, Khan AU, Ahmed W, Ahmad MU, Jafri SA, Bacha U, Ali A, Muzammil HS, Alsagaby SA, Al Abdulmonem W, Abdelgawad MA, Riaz M, Mahwish, Nasir M, Zafar A, Tufail T, Imran M, Anwar Faridi T, Aslam M, Abid Shah SF, Farooq S, Awan TN, Ur-Rehman H. Disease specific symptoms indices in patients with celiac disease-A hardly recognised entity. *Front Nutr*. 2022 Sep 7;9:944449.

87. Therrien A, Kelly CP, Silvester JA. Celiac Disease: Extraintestinal Manifestations and Associated Conditions. *J Clin Gastroenterol*. 2020 Jan;54(1):8-21.
88. Tan IL, Withoff S, Kolkman JJ, Wijmenga C, Weersma RK, Visschedijk MC. Non-classical clinical presentation at diagnosis by male celiac disease patients of older age. *Eur J Intern Med*. 2021 Jan;83:28-33.
89. Mania-Końsko A, Szponar E, Dańczak-Pazdrowska A, Bowszyc-Dmochowska M, Pazdrowski J, Wyganowska M. Immunopathological Assessment of the Oral Mucosa in Dermatitis Herpetiformis. *Int J Environ Res Public Health*. 2023 Jan 31;20(3):2524.
90. Rostami Nejad M, Hogg-Kollars S, Ishaq S, Rostami K. Subclinical celiac disease and gluten sensitivity. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2011 Summer;4(3):102-8.
91. Popp A, Mäki M. Gluten-Induced Extra-Intestinal Manifestations in Potential Celiac Disease-Celiac Trait. *Nutrients*. 2019 Feb 1;11(2):320.
92. Zingone F, Maimaris S, Auricchio R, Caio GPI, Carroccio A, Elli L, Galliani E, Montagnani M, Valiante F, Biagi F. Guidelines of the Italian societies of gastroenterology on the diagnosis and management of coeliac disease and dermatitis herpetiformis. *Dig Liver Dis*. 2022 Oct;54(10):1304-1319.
93. Soldera J, Salgado K, Pêgas KL. Refractory celiac disease type 2: how to diagnose and treat? *Rev Assoc Med Bras (1992)*. 2021 Feb;67(2):168-172.
94. Demiroren K. Possible relationship between refractory celiac disease and malignancies. *World J Clin Oncol*. 2022 Mar 24;13(3):200-208.
95. Dieckman T, Schreurs M, Mahfouz A, Kooy-Winkelaar Y, Neefjes-Borst A, Bouma G, Koning F. Single-Cell Analysis of Refractory Celiac Disease Demonstrates Inter- and Intra-Patient Aberrant Cell Heterogeneity. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2022;14(1):173-192.
96. Hujoel IA, Murray JA. Refractory Celiac Disease. *Curr Gastroenterol Rep*. 2020 Mar 17;22(4):18.
97. Lundin KE, Wijmenga C. Coeliac disease and autoimmune disease-genetic overlap and screening. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015 Sep;12(9):507-15.
98. Malandrini S, Trimboli P, Guzzaloni G, Virili C, Lucchini B. What about TSH and Anti-Thyroid Antibodies in Patients with Autoimmune Thyroiditis and Celiac Disease Using a Gluten-Free Diet? A Systematic Review. *Nutrients*. 2022 Apr 18;14(8):1681.

99. Ashok T, Patni N, Fatima M, Lamis A, Siddiqui SW. Celiac Disease and Autoimmune Thyroid Disease: The Two Peas in a Pod. *Cureus*. 2022 Jun 23;14(6):e26243.
100. Goodwin G. Type 1 Diabetes Mellitus and Celiac Disease: Distinct Autoimmune Disorders That Share Common Pathogenic Mechanisms. *Horm Res Paediatr*. 2019;92(5):285-292.
101. Fisher AH, Lomasky SJ, Fisher MJ, Oppenheim YL. Celiac disease and the endocrinologist: a diagnostic opportunity. *Endocr Pract*. 2008 Apr;14(3):381-8.
102. Lauret E, Rodrigo L. Celiac disease and autoimmune-associated conditions. *Biomed Res Int*. 2013;2013:127589.
103. Rodriguez-Castro KI, Franceschi M, Miraglia C, Russo M, Nouvenne A, Leandro G, Meschi T, De' Angelis GL, Di Mario F. Autoimmune diseases in autoimmune atrophic gastritis. *Acta Biomed*. 2018 Dec 17;89(8-S):100-103.
104. Malle L, Patel RS, Martin-Fernandez M, Stewart OJ, Philippot Q, Buta S, et al. Autoimmunity in Down's syndrome via cytokines, CD4 T cells and CD11c⁺ B cells. *Nature*. 2023 Mar;615(7951):305-314.
105. Pelizzaro F, Marsilio I, Fassan M, Piazza F, Barberio B, D'Odorico A, Savarino EV, Farinati F, Zingone F. The Risk of Malignancies in Celiac Disease-A Literature Review. *Cancers (Basel)*. 2021 Oct 21;13(21):5288.
106. Ludvigsson JF, Card TR, Kaukinen K, Bai J, Zingone F, Sanders DS, Murray JA. Screening for celiac disease in the general population and in high-risk groups. *United European Gastroenterol J*. 2015 Apr;3(2):106-20.
107. Rubio-Tapia A, Hill ID, Semrad C, Kelly CP, Greer KB, Limketkai BN, Lebwohl B. American College of Gastroenterology Guidelines Update: Diagnosis and Management of Celiac Disease. *Am J Gastroenterol*. 2023 Jan 1;118(1):59-76.
108. Paredes-Echeverri S, Rodríguez AN, Cárdenas WA, Mendoza de Molano B, González JM. Seroprevalence of Antitransglutaminase and Antiendomysium Antibodies in Adult Colombian Blood Bank Donors. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2020 Nov 30;2020:7541941.
109. Sghiri R, Hassine HB, Almogren A, Shakoob Z, Alswayed M. Diagnostic performances of celiac disease serological tests among Saudi patients. *Saudi J Gastroenterol*. 2023 Jan-Feb;29(1):31-38.
110. Abdulkhakimova D, Dossybayeva K, Grechka A, Almukhamedova Z, Boltanova A, Kozina L, Nurgaliyeva K, Hasanova L, Tanko MN, Poddighe D. Reliability of the Multiplex CytoBead CeliAK Immunoassay

- to Assess Anti-tTG IgA for Celiac Disease Screening. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Sep 21;8:731067.
111. Novis CL, Wahl E, Camacho E, Aure MA, Mahler M, Nandakumar V. Performance Assessment of a Novel Multi-analyte Methodology for Celiac Disease Biomarker Detection and Evaluation of the Serology-Alone Criteria for Biopsy-Free Diagnosis. *Arch Pathol Lab Med*. 2023 Mar 2.
 112. Poddighe D, Capittini C. The Role of HLA in the Association between IgA Deficiency and Celiac Disease. *Dis Markers*. 2021 Dec 13;2021:8632861.
 113. Di Biase AR, Marasco G, Ravaioli F, Colecchia L, Dajti E, Lecis M, Passini E, Alemanni LV, Festi D, Iughetti L, Colecchia A. Clinical Presentation of Celiac Disease and Diagnosis Accuracy in a Single-Center European Pediatric Cohort over 10 Years. *Nutrients*. 2021 Nov 18;13(11):4131.
 114. Dhingra K, Maharshi S, Sapra B, Ratra S, Sharma SS, Nijhawan S. Seronegative Celiac Disease; Frequently Encountered Yet Undiagnosed Clinical Entity. *Middle East J Dig Dis*. 2021 Jan;13(1):35-42.
 115. Schieppati A, Sanders DS, Baiardi P, Caio G, Ciacci C, Kaukinen K, Lebwohl B, Leffler D, Malamut G, Murray JA, Rostami K, Rubio-Tapia A, Volta U, Biagi F. Nomenclature and diagnosis of seronegative coeliac disease and chronic non-coeliac enteropathies in adults: the Paris consensus. *Gut*. 2022 Nov;71(11):2218-2225.
 116. Murray JA, Rubio-Tapia A, Van Dyke CT, Brogan DL, Knipschild MA, Lahr B, Rumalla A, Zinsmeister AR, Gostout CJ. Mucosal atrophy in celiac disease: extent of involvement, correlation with clinical presentation, and response to treatment. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008 Feb;6(2):186-93; quiz 125.
 117. Friedel D, Sharma J. Duodenal Biopsy. 2022 Jul 25. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. PMID: 32809472.
 118. Villanacci V, Vanoli A, Leoncini G, Arpa G, Salviato T, Bonetti LR, Baronchelli C, Saragoni L, Parente P. Celiac disease: histology-differential diagnosis-complications. A practical approach. *Pathologica*. 2020 Sep;112(3):186-196.
 119. Owen DR, Owen DA. Celiac Disease and Other Causes of Duodenitis. *Arch Pathol Lab Med*. 2018 Jan;142(1):35-43.
 120. Calado J, Verdelho Machado M. Celiac Disease Revisited. *GE Port J Gastroenterol*. 2021 Mar 17;29(2):111-124.
 121. Villanacci V. The histological classification of biopsy in celiac disease: time for a change? *Dig Liver Dis*. 2015 Jan;47(1):2-3.

122. Rossi C, Simoncelli G, Arpa G, Stracuzzi A, Parente P, Fassan M, Vanoli A, Villanacci V. Histopathology of intestinal villi in neonatal and paediatric age: main features with clinical correlation - Part II. *Pathologica*. 2022 Feb;114(1):22-31.
123. Sahin Y, Mermer S. Frequency of celiac disease and distribution of HLA-DQ2/DQ8 haplotypes among siblings of children with celiac disease. *World J Clin Pediatr*. 2022 Jul 9;11(4):351-359.
124. Melini V, Melini F. Gluten-Free Diet: Gaps and Needs for a Healthier Diet. *Nutrients*. 2019 Jan 15;11(1):170.
125. Itzlinger A, Branchi F, Elli L, Schumann M. Gluten-Free Diet in Celiac Disease-Forever and for All? *Nutrients*. 2018 Nov 18;10(11):1796.
126. Ho WHJ, Atkinson EL, David AL. Examining the Psychosocial Well-Being of Children and Adolescents With Coeliac Disease: A Systematic Review. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2023 Jan 1;76(1):e1-e14.
127. Gessaroli M, Frazzoni L, Sikandar U, Bronzetti G, Pession A, Zagari RM, Fuccio L, Forchielli ML. Nutrient intakes in adult and pediatric coeliac disease patients on gluten-free diet: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Nutr*. 2023 Mar 1. Epub ahead of print. PMID: 36859658.
128. Defeudis G, Massari MC, Terrana G, Coppola L, Napoli N, Migliaccio S. Gluten-Free Diet and Metabolic Syndrome: Could Be a Not Benevolent Encounter? *Nutrients*. 2023 Jan 26;15(3):627.
129. Di Stefano M, Miceli E, Mengoli C, Corazza GR, Di Sabatino A. The Effect of a Gluten-Free Diet on Vitamin D Metabolism in Celiac Disease: The State of the Art. *Metabolites*. 2023 Jan 2;13(1):74. PMID: 36676999; PMCID: PMC9861273.
130. Vaquero L, Bernardo D, León F, Rodríguez-Martín L, Alvarez-Cuenllas B, Vivas S. Challenges to drug discovery for celiac disease and approaches to overcome them. *Expert Opin Drug Discov*. 2019 Oct;14(10):957-968.
131. Singh RS, Singh A, Batra G, Kaur H, Medhi B. Novel targets for drug discovery in celiac disease. *Indian J Pharmacol*. 2019 Sep-Oct;51(5):359-365.
132. Dieckman T, Koning F, Bouma G. Celiac disease: New therapies on the horizon. *Curr Opin Pharmacol*. 2022 Oct;66:102268.
133. Husby S, Bai JC. Follow-up of Celiac Disease. *Gastroenterol Clin North Am*. 2019 Mar;48(1):127-136.
134. Raiteri A, Granito A, Giamperoli A, Catenaro T, Negrini G, Tovoli F. Current guidelines for the management of celiac disease: A systematic

- review with comparative analysis. *World J Gastroenterol.* 2022 Jan 7;28(1):154-175.
135. Felli C, Baldassarre A, Masotti A. Intestinal and Circulating MicroRNAs in Coeliac Disease. *Int J Mol Sci.* 2017 Sep 6;18(9):1907.
136. Correia de Sousa M, Gjorgjieva M, Dolicka D, Sobolewski C, Foti M. Deciphering miRNAs' Action through miRNA Editing. *Int J Mol Sci.* 2019 Dec 11;20(24):6249.
137. Ye D, Guo S, Al-Sadi R, Ma TY. MicroRNA regulation of intestinal epithelial tight junction permeability. *Gastroenterology.* 2011 Oct;141(4):1323-33.
138. Magni S, Buoli Comani G, Elli L, Vanessi S, Ballarini E, Nicolini G, Rusconi M, Castoldi M, Meneveri R, Muckenthaler MU, Bardella MT, Barisani D. miRNAs affect the expression of innate and adaptive immunity proteins in celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 2014 Oct;109(10):1662-74.
139. Zingone F, Pilotto V, Cardin R, Maddalo G, Orlando C, Fassan M, Marsilio I, Collese E, Pelizzaro F, Farinati F. Autoimmune Atrophic Gastritis: The Role of miRNA in Relation to *Helicobacter Pylori* Infection. *Front Immunol.* 2022 Jul 22;13:930989.
140. Tan IL, Coutinho de Almeida R, Modderman R, Stachurska A, Dekens J, Barisani D, Meijer CR, et al. Circulating miRNAs as Potential Biomarkers for Celiac Disease Development. *Front Immunol.* 2021 Dec 7;12:734763.
141. Bascuñán KA, Pérez-Bravo F, Gaudio G, Vaira V, Roncoroni L, Elli L, Monguzzi E, Araya M. A miRNA-Based Blood and Mucosal Approach for Detecting and Monitoring Celiac Disease. *Dig Dis Sci.* 2020 Jul;65(7):1982-1991.
142. Felli C, Baldassarre A, Uva P, Alisi A, Cangelosi D, Ancinelli M, Caruso M, Paolini A, Montano A, Silano M, Vincentini O, Catassi C, Lionetti E, Gatti S, Ferretti F, Masotti A. Circulating microRNAs as novel non-invasive biomarkers of paediatric celiac disease and adherence to gluten-free diet. *EBioMedicine.* 2022 Feb;76:103851.
143. Bianchi N, Doneda L, Elli L, Taccioli C, Vaira V, Scricciolo A, Lombardo V, Terrazzan A, Colapietro P, Terranova L, Bergamini C, Vecchi M, Scaramella L, Nandi N, Roncoroni L. Circulating microRNAs Suggest Networks Associated with Biological Functions in Aggressive Refractory Type 2 Celiac Disease. *Biomedicines.* 2022 Jun 14;10(6):1408.
144. Jelic MD, Mandic AD, Maricic SM, Srdjenovic BU. Oxidative stress and its role in cancer. *J Cancer Res Ther.* 2021 Jan-Mar;17(1):22-28.

145. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med*. 2010 Dec 1;49(11):1603-16.
146. Patlevič P, Vašková J, Švorc P Jr, Vaško L, Švorc P. Reactive oxygen species and antioxidant defense in human gastrointestinal diseases. *Integr Med Res*. 2016 Dec;5(4):250-258.
147. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2' -deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. 2009 Apr;27(2):120-39.
148. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K, Loridas S. Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms. *Int J Environ Res Public Health*. 2013 Aug 27;10(9):3886-907.
149. Graille M, Wild P, Sauvain JJ, Hemmendinger M, Guseva Canu I, Hopf NB. Urinary 8-OHdG as a Biomarker for Oxidative Stress: A Systematic Literature Review and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci*. 2020 May 26;21(11):3743.
150. Hahm JY, Park J, Jang ES, Chi SW. 8-Oxoguanine: from oxidative damage to epigenetic and epitranscriptional modification. *Exp Mol Med*. 2022 Oct;54(10):1626-1642.
151. Kasai, H. & Nishimura, S. Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic Acids Res*. 1984. 12, 2137–2145.
152. Kasai, H. & Nishimura, S. Hydroxylation of the C-8 position of deoxyguanosine by reducing agents in the presence of oxygen. *Nucleic Acids Symp*. 1983. Ser. 165–167.
153. Murata M. Inflammation and cancer. *Environ Health Prev Med*. 2018 Oct 20;23(1):50.
154. Szaflarska-Poplawska A, Siomek A, Czerwionka-Szaflarska M, Gackowski D, Rózalski R, Guz J, Szpila A, Zarakowska E, Olinski R. Oxidatively damaged DNA/oxidative stress in children with celiac disease. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010 Aug;19(8):1960-5.
155. Trenz TS, Delaix CL, Turchetto-Zolet AC, Zamocky M, Lazzarotto F, Margis-Pinheiro M. Going Forward and Back: The Complex Evolutionary History of the GPx. *Biology (Basel)*. 2021 Nov 12;10(11):1165.
156. Miao L, St Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med*. 2009 Aug 15;47(4):344-56.

157. Diaz-Castro J, Muriel-Neyra C, Martin-Masot R, Moreno-Fernandez J, Maldonado J, Nestares T. Oxidative stress, DNA stability and evoked inflammatory signaling in young celiac patients consuming a gluten-free diet. *Eur J Nutr.* 2020 Jun;59(4):1577-1584.
158. Piatek-Guziewicz A, Ptak-Belowska A, Przybylska-Felus M, Pasko P, Zagrodzki P, Brzozowski T, Mach T, Zwolinska-Wcislo M. Intestinal parameters of oxidative imbalance in celiac adults with extraintestinal manifestations. *World J Gastroenterol.* 2017 Nov 28;23(44):7849-7862.
159. Ebrahimi SO, Reisi S, Shareef S. miRNAs, oxidative stress, and cancer: A comprehensive and updated review. *J Cell Physiol.* 2020 Nov;235(11):8812-8825.
160. Tinaburri L, D'Errico M, Sileno S, Maurelli R, Degan P, Magenta A, Dellambra E. miR-200a Modulates the Expression of the DNA Repair Protein OGG1 Playing a Role in Aging of Primary Human Keratinocytes. *Oxid Med Cell Longev.* 2018 Mar 25;2018:9147326.
161. Lin YH. MicroRNA Networks Modulate Oxidative Stress in Cancer. *Int J Mol Sci.* 2019 Sep 11;20(18):4497.
162. Lu C, Zhou D, Wang Q, Liu W, Yu F, Wu F, Chen C. Crosstalk of MicroRNAs and Oxidative Stress in the Pathogenesis of Cancer. *Oxid Med Cell Longev.* 2020 Apr 28;2020:2415324.
163. R Babu K, Tay Y. The Yin-Yang Regulation of Reactive Oxygen Species and MicroRNAs in Cancer. *Int J Mol Sci.* 2019 Oct 26;20(21):5335.
164. Ginckels P, Holvoet P. Oxidative Stress and Inflammation in Cardiovascular Diseases and Cancer: Role of Non-coding RNAs. *Yale J Biol Med.* 2022 Mar 31;95(1):129-152.
165. Li J, Liu Y, Cao Y, Wang J, Zhao X, Jiao J, Li J, Zhang K, Yin G. Inhibition of miR-155 Attenuates CD14⁺ Monocyte-Mediated Inflammatory Response and Oxidative Stress in Psoriasis Through TLR4/MyD88/NF- κ B Signaling Pathway. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2022 Feb 9;15:193-201.
166. Amr KS, Bayoumi FS, Eissa E, Abu-Zekry M. Circulating microRNAs as potential non-invasive biomarkers in pediatric patients with celiac disease. *Eur Ann Allergy Clin Immunol.* 2019 Jul;51(4):159-164.
167. Domsa EM, Berindan-Neagoe I, Budisan L, Braicu C, Para I, Tantau AI, Orasan OH, Ciobanu L, Pop TA, Filip GA, Leach N, Negrean V, Matei D, Andreica V. Expression of Selected Genes and Circulating microRNAs in Patients with Celiac Disease. *Medicina (Kaunas).* 2022 Jan 25;58(2):180.

168. Pelullo M, Savi D, Quattrucci S, Cimino G, Pizzuti A, Screpanti I, Talora C, Cialfi S. miR-125b/NRF2/HO-1 axis is involved in protection against oxidative stress of cystic fibrosis: A pilot study. *Exp Ther Med*. 2021 Jun;21(6):585.
169. Chen YF, Wei YY, Yang CC, Liu CJ, Yeh LY, Chou CH, Chang KW, Lin SC. miR-125b suppresses oral oncogenicity by targeting the anti-oxidative gene PRXL2A. *Redox Biol*. 2019 Apr;22:101140.
170. Wu F, Yuan X, Liu W, Meng L, Li X, Gao X, Zhou S, Fang L, Yu D. Deletion of the *miR-144/451* cluster aggravates lethal sepsis-induced lung epithelial oxidative stress and apoptosis. *Ann Transl Med*. 2022 May;10(10):538.
171. Cardin R, Piciocchi M, Sinigaglia A, Lavezzo E, Bortolami M, Kotsafti A, Cillo U, Zanusi G, Mescoli C, Rugge M, Farinati F. Oxidative DNA damage correlates with cell immortalization and mir-92 expression in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*. 2012 May 15;12:177.