

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Scuola di Medicina e Chirurgia

Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Oncologiche e Gastroenterologiche

U.O.C. Gastroenterologia

Direttore: Ch.ma Prof.ssa Patrizia Burra

TESI DI LAUREA

**I MICRORNA COME BIOMARCATORI NON INVASIVI
DI RISPOSTA ALLA DIETA SENZA GLUTINE NEI
PAZIENTI CELIACI**

Relatore: Prof.ssa Fabiana Zingone

Correlatore: Dott.ssa Michela Palo

Laureanda: Erika Zavasi

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

INDICE

RIASSUNTO/ABSTRACT	1
CAPITOLO I – INTRODUZIONE	3
1. La malattia celiaca	5
1.1. Storia della malattia celiaca	6
1.2. Epidemiologia	7
1.3. Patogenesi	10
1.4. Presentazione clinica	15
1.5. Diagnosi	21
1.6. Terapia	28
1.7. Follow up	31
2. Celiachia non responsiva	32
2.1. Definizione della NRCD	32
2.2. Algoritmo diagnostico della NRCD	35
2.3. Terapia della NRCD	37
3. MicroRNA come biomarkers nella CeD	39
3.1 MiRNAs	39
3.2 Ruolo dei miRNA nella patogenesi, diagnosi e FU della CeD	40
3.3 MiRNA nella dieta aglutinata	44
3.4 MiRNA nella celiachia complicata	45
CAPITOLO II – STUDIO CLINICO	
1. Scopo dello studio	47
2. Materiali e metodi	48
2.1. Pazienti	48
2.2. Raccolta dati	48
2.3. Estrazione e quantificazione dei miRNA dai prelievi ematici	49

2.4. Analisi Statistica	50
3. Risultati	51
Determinazione dei miRNA circolanti	54
4. Discussione	57
CONCLUSIONI	61
BIBLIOGRAFIA	63
RINGRAZIAMENTI	75

RIASSUNTO

Introduzione: Molti studi, condotti in pazienti celiaci, dimostrano una disregolazione dei microRNA (miRNA) nella patogenesi della CeD e un loro potenziale utilizzo come biomarkers circolanti non invasivi, sia per la diagnosi che per il monitoraggio durante il follow-up (FU). Solitamente, la CeD è caratterizzata da una buona prognosi e da un'ottima risposta alla dieta priva di glutine (GFD). Tuttavia, in alcuni pazienti si instaura un quadro di CeD non responsiva (NRCD), con persistenza di sintomi e/o segni della malattia nonostante l'aderenza alla GFD da almeno 12 mesi.

Scopo dello studio: Questo studio ha l'obiettivo di valutare il livello di alcuni miRNA, noti in letteratura per essere alterati nella CeD, in pazienti con CeD non responsiva (CeD-nr) e in pazienti che rispondono alla GFD (CeD-resp). Come obiettivi secondari, lo studio ha lo scopo di confrontare il livello di tali miRNA in pazienti celiaci in FU (CeD-FU) rispetto ai controlli sani (HC) e in pazienti celiaci arruolati al momento della diagnosi (CeD-T₀) e al successivo FU (CeD-T₁).

Materiali e metodi: Per questo studio sono stati arruolati, tra novembre 2019 e maggio 2024, 41 pazienti celiaci, seguiti presso il centro di celiachia dell'Azienda Ospedale Università Padova, e 10 soggetti sani, utilizzati come gruppo di controllo per l'analisi dei miRNA. Tra i soggetti celiaci, 26 sono risultati responsivi alla GFD (CeD- resp), mentre 15 hanno continuato a presentare sintomi, alterazioni endoscopiche e/o laboratoristiche nonostante la dieta (CeD- nr). I pazienti, dopo aver firmato un consenso scritto, sono stati sottoposti ad un prelievo ematico, dal cui plasma sono stati estratti e quantificati diversi miRNA coinvolti nella patogenesi della CeD (miR-155, miR-200, miR-125, miR-192, miR-21, miR-451, miR-146 e miR-1226).

Risultati: Il nostro studio non ha evidenziato nei pazienti CeD-nr differenze statisticamente significative di espressione dei miRNA, eccetto per la down-regolazione di miR-192 ($p = 0.05$), alterazione emersa in letteratura nei pazienti celiaci con anemia, lesioni istologiche severe e coinvolta nello sviluppo di RCD e EATL; si sono inoltre riscontrati livelli minori di miR-1226 nei CeD-nr, mentre i

miRNA correlati all'infiammazione (miR-125/146/155/21) sono risultati sovrapponibili tra i due gruppi.

Per quanto riguarda i nostri obiettivi secondari, il gruppo CeD-T₀ ha presentato livelli significativamente maggiori di miR-21 rispetto al gruppo CeD-T₁ ($p = 0.03$). Inoltre, nei pazienti CeD-T₀ i miRNA correlati all'infiammazione (miR-125, miR-146 e miR-155) e miR-1226, correlato con la tumorigenesi, sono risultati maggiormente espressi. In aggiunta, i valori di miR-451 sono risultati minori nei pazienti del gruppo CeD-FU rispetto al gruppo HC ($p = 0.004$), in accordo con i dati di letteratura, favorendo una diminuzione delle difese antiossidanti nei pazienti celiaci.

Conclusioni: I miRNA hanno un ruolo nella patogenesi della CeD. In questo studio abbiamo dimostrato che nei pazienti celiaci in GFD c'è un pattern di espressione differente rispetto ai controlli sani e rispetto ai celiaci CeD-T₀. Il confronto tra pazienti non-responsivi e responsivi, tuttavia, ha generato risultati non significativi, eccetto che per la down-regolazione di miR-192. Tali esiti potrebbero derivare dalla bassa numerosità del gruppo in studio, ma anche suggerire che i miRNA potrebbero non essere marker ottimali di non-risposta nei pazienti celiaci con sintomi lievi, ma non si esclude una loro utilità in presenza di pazienti non-responders complicati. Per definire se nei pazienti con NRCD ci sia un pattern specifico di espressione dei miRNA che ne spieghi il quadro clinico, saranno necessari studi futuri, con casistica più ampia e con inclusione di pazienti con complicanze dovute alla celiachia.

ABSTRACT

Introduction: Many studies, conducted on celiac disease patients, demonstrate dysregulation of microRNAs (miRNAs) in the pathogenesis of celiac disease (CeD) and their potential use as non-invasive circulating biomarkers, both for diagnosis and monitoring during follow-up (FU). Typically, CeD is characterized by a good prognosis and excellent response to a gluten-free diet (GFD). However, some patients develop a condition known as non-responsive CeD (NRCD), with persistent symptoms and/or signs of the disease despite adherence to GFD for at least 12 months.

Purpose of the study: The aim of the study is to evaluate the levels of miRNAs known to be altered in CeD, in patients with non-responsive CeD (CeD-nr) and in patients who respond to GFD (CeD-resp). Secondary aims were to compare the levels of these miRNAs in celiac disease patients during FU (CeD-FU) compared to healthy controls (HC) and in celiac disease patients at diagnosis (CeD-T₀) and during FU (CeD-T₁).

Materials and Methods: For this study, 41 celiac patients, followed at the Celiac Disease Center of the Azienda Ospedale Università Padova, and 10 healthy subjects, used as a control group for miRNA analysis, were enrolled between November 2019 and May 2024. Among the celiac disease subjects, 26 were classified as responder to the GFD (CeD-resp), while 15 continued to present symptoms, endoscopic alterations and/or high anti-tTG titers despite adherence to GFD (CeD-nr). After signing a written consent, patients underwent blood sampling, from which plasma was extracted and quantified for various miRNAs involved in the pathogenesis of CeD (miR-155, miR-200, miR-125, miR-192, miR-21, miR-451, miR-146, and miR-1226).

Results: Our study did not show statistically significant differences in miRNA expression in CeD-nr patients, except for the down-regulation of miR-192 ($p = 0.05$), an alteration reported in literature in celiac patients with anemia, severe histological lesions and involved in the development of RCD and EATL; moreover, lower levels of miR-1226 were found in CeD-nr, while inflammation-related miRNAs (miR-125/146/155/21) were comparable between the two groups.

Regarding our secondary objectives, the CeD-T₀ group had significantly higher levels of miR-21 compared to the CeD-T₁ group ($p = 0.03$). Additionally, in CeD-T₀ patients, inflammation-related miRNAs (miR-125, miR-146, and miR-155) and miR-1226, related to tumorigenesis, were more expressed. Moreover, miR-451 levels were lower in the CeD-FU group compared to the HC group ($p = 0.004$), consistent with literature data, suggesting decreased antioxidant defenses in celiac patients.

Conclusions: MiRNAs play a role in the pathogenesis of CeD. In this study, we demonstrated that celiac patients on a GFD have a different expression pattern compared to healthy controls and newly diagnosed celiac patients. However, the comparison between non-responsive and responsive patients did not yield significant results, except for the down-regulation of miR-192 in CeD-nr group. These outcomes might result from the small sample size of the study group, but they could also suggest that miRNAs are not optimal markers in non-responsive patients with mild symptoms; nevertheless, their usefulness in complicated non-responder patients cannot be excluded. Future studies with a larger sample size, including patients with celiac disease complications, will be necessary to determine if there is a specific miRNA expression pattern in NRCD patients that might explain their clinical picture.

INTRODUZIONE

CAPITOLO 1: LA MALATTIA CELIACA

La malattia celiaca (CeD) è un'enteropatia cronica immuno-mediata causata dall'esposizione al glutine in soggetti geneticamente predisposti [1]. La prevalenza nella popolazione generale è di circa l'1%, può presentarsi a qualsiasi età ed è più frequente nel sesso femminile. Il glutine rappresenta un gruppo di proteine insolubili in acqua presente in diversi cereali come il frumento, l'orzo e la segale; in soggetti geneticamente predisposti, il glutine parzialmente digerito genera peptidi che scatenano l'infiammazione del piccolo intestino, atrofia dei villi e iperplasia delle cripte [2]. Gli individui che esprimono specifici geni HLA (*human leukocyte antigen*) hanno maggiori probabilità di sviluppare la malattia: circa il 90-95% di pazienti con celiachia esprime infatti l'allele HLA-DQ2, mentre la restante parte esprime l'allele HLA-DQ8 [3],[4]. La presentazione clinica è variabile, caratterizzata da sintomi classici e non classici. Per tale ragione sono state identificate diverse forme della malattia: la celiachia classica, non classica, potenziale, refrattaria e subclinica [1]. In letteratura è inoltre descritta la presenza di pazienti con celiachia sieronegativa [5] e di pazienti celiaci slow-responders o non-responders (7-30%) che continuano a presentare sintomi nonostante seguano una dieta aglutinata da almeno sei mesi [6],[7]. La CeD può portare, in alcuni casi, allo sviluppo di complicanze, tra cui osteoporosi, linfomi e adenocarcinomi; inoltre può essere associata a possibili conseguenze sistemiche che possono coinvolgere la salute riproduttiva, cardiaca, neurologica e psichiatrica [8]. Per diagnosticare la CeD serve una combinazione di dati clinici, indagini sierologiche e istopatologiche, effettuate mentre il paziente è ancora in dieta contenente glutine [6]. Ad oggi, l'unica terapia efficace per il trattamento della CeD è una dieta priva di glutine (GFD) da mantenere per tutta la vita; l'aderenza stretta alla GFD determina nella maggior parte dei casi la regressione dei sintomi e del danno intestinale.

1.1 STORIA DELLA MALATTIA CELIACA

Il termine “celiaco” deriva dal greco *koiliakós*, e significa “addominale” [9]. I primi scritti che descrivono la malattia celiaca risalgono al I secolo a.C., quando Areteo di Cappadocia evidenziò l’incapacità di alcuni soggetti, specialmente donne, di assorbire il cibo [10]. Nel 1887 Samuel Gee, medico pediatra britannico, coniò il termine di “affezione celiaca”, facendo particolare riferimento all’aspetto delle feci, alla debolezza muscolare, al gonfiore addominale e al decorso cronico della malattia. Avanzò inoltre l’ipotesi che l’unica cura fosse la dieta, consigliando cibi come riso, frutta e verdura per portare alla regressione della sintomatologia [11]. 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 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 [12],[13]. Agli stessi anni risale la prima descrizione delle caratteristiche istologiche della CeD, grazie alla quale vennero stabiliti dei criteri diagnostici. Negli anni ’70 venne studiata la suscettibilità genetica della CeD 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 1 (DM1). Successivamente venne individuato il ruolo degli anticorpi anti-transglutaminasi e i meccanismi coinvolti nella determinazione dell’atrofia dei villi. Infine, negli ultimi vent’anni le ricerche si sono concentrate sul ruolo della risposta immunitaria extra intestinale, in particolare sui linfociti CD4+ e CD8+, e sulle citochine IL-2 e IL-15. Ad oggi, gli elementi che sono in grado di influenzare l’esordio della patologia sono la quantità di glutine assunto, le infezioni e/o i cambiamenti del microbiota [12]. Sulla base di queste evidenze, sono in corso numerosi studi che hanno lo scopo di identificare nuovi biomarkers utili per la diagnosi e il follow-up della CeD.

1.2 EPIDEMIOLOGIA

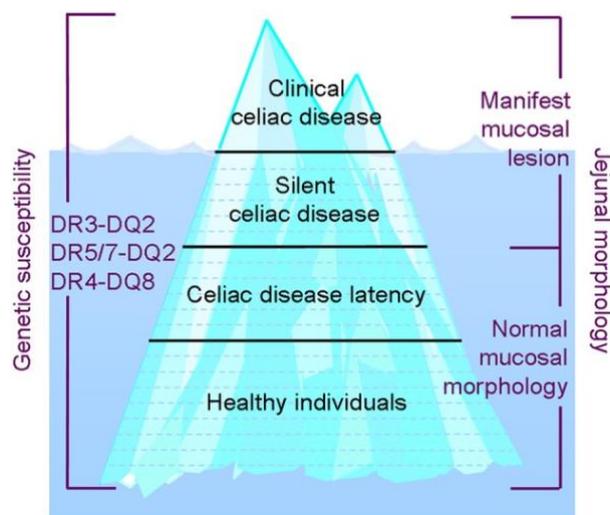


Figura 1: modello iceberg della malattia celiaca [15]

Sia la prevalenza che l'incidenza della CeD sono aumentate negli ultimi cinquant'anni e ciò è dovuto non solo ad un aumento del tasso di rilevamento della patologia, ma anche al cambiamento delle abitudini alimentari, che ha visto un incremento nel consumo di cibi pronti ad alto contenuto di glutine. Attualmente, grazie a screening sierologici rivolti ai pazienti a rischio o con sospetto clinico, è noto che la CeD nei paesi occidentali ha una prevalenza dell'1,4% circa e che può colpire tutte le classi di età con un rapporto femmine/maschi variabile tra 2:1 e 3:1 [5]; la prevalenza di CeD confermata da biopsia è invece del 0,7% [14]. Nonostante l'alta sensibilità e specificità dei test diagnostici, il numero di pazienti diagnosticati continua a rappresentare un "iceberg" statistico (*figura 1*), in quanto la maggior parte dei pazienti affetti da celiachia rimane non diagnosticata. Si stima che in media il 70% dei casi non sia diagnosticato, e quindi non trattato [15],[16],[17]. Secondo il modello iceberg, il numero totale di individui affetti da CeD corrisponde all'intero iceberg; 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 entrambi i casi 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. Le cause della mancata diagnosi sono principalmente l'eterogeneità dei sintomi e la poca conoscenza della

malattia [5]. Questa situazione determina il mancato trattamento, esponendo i pazienti a tutta una serie di rischi e complicanze a lungo termine, tra cui l'infertilità, l'osteoporosi e il cancro [18],[19],[20].

1.2.1 Differenze epidemiologiche nel mondo e nei due sessi

A lungo la CeD è stata considerata una patologia rara, diffusa tra gli individui europei, principalmente in età pediatrica. Nel corso degli anni, grazie al crescente impiego di metodiche diagnostiche ad alta sensibilità e specificità, come i test sierologici per la ricerca degli anticorpi antigliadina (AGA), anti-endomisio (EmA) e anti-transglutaminasi (tTG), è stato possibile valutare l'effettiva prevalenza della celiachia; ad oggi si tratta di una tra le più comuni malattie croniche dell'intestino e interessa globalmente individui di tutte le fasce d'età [17].

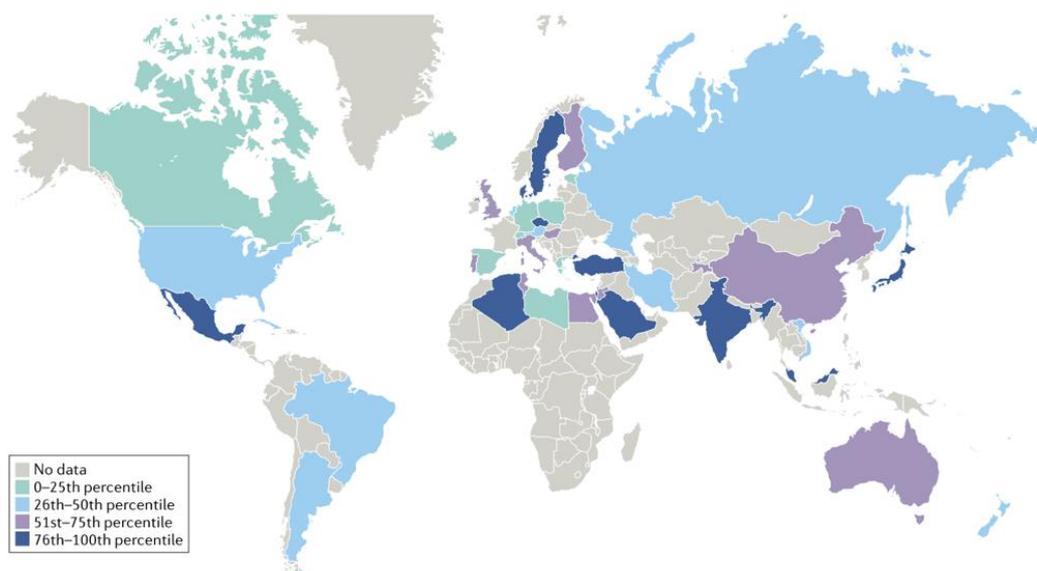


Figura 2: sieroprevalenza a livello mondiale della CeD [14]

Negli ultimi cinquant'anni si è perciò assistito ad un aumento significativo della prevalenza e dell'incidenza della CeD in diverse aree geografiche. Al momento, la sieroprevalenza a livello mondiale è dell'1,4%, con una variabilità tra i diversi continenti che va dall'1,1% dell'Africa, 1,3% del Sud America fino all'1,8% dell'Asia, mentre l'Europa si colloca in una posizione intermedia (Figura 2). Le cause delle differenze di prevalenza tra i vari continenti includono sia fattori genetici, inclusi geni HLA e non-HLA, che fattori ambientali, come le abitudini di consumo di grano, le pratiche di alimentazione infantile, le infezioni gastrointestinali e l'utilizzo di farmaci [18]. Va evidenziato che la differenza di

prevalenza non si verifica solo tra continenti diversi, ma anche tra i diversi stati all'interno dello stesso continente [18]. In Europa, ad esempio, la prevalenza più elevata si riscontra in Finlandia, con il 2,4%, mentre in Germania è dello 0,3%; in Italia la prevalenza è dello 0,7% [16].

Per quanto riguarda le differenze epidemiologiche tra i due sessi, una recente metanalisi ha dichiarato che la prevalenza della patologia è di 1.5 volte maggiore nelle donne rispetto agli uomini [18]. Diversi studi dimostrano che gli uomini sono meno propensi a sottoporsi ad esami endoscopici, quali la EGDS (esofagogastroduodenoscopia), fattore che può contribuire alla sotto-diagnosi della condizione nel sesso maschile [18],[19]. È inoltre noto che la sintomatologia alla diagnosi è variabile tra i due sessi [20]: nelle donne sono più frequenti i sintomi gastrointestinali come gonfiore addominale, nausea e vomito, mentre negli uomini il sintomo intestinale più frequente è la steatorrea. Anche segni laboratoristici e quali anemia, bassa statura, perdita di peso e osteoporosi sono riscontrati più frequentemente nel sesso femminile [21],[22]. Proprio a causa della maggior frequenza di tali segni e sintomi, le donne si sottopongono più frequentemente ad approfondimenti medici [21–23] e vengono diagnosticate in media 4 anni prima rispetto ai pazienti di sesso maschile [22]. Per di più, la CeD è una patologia autoimmune ed è assodato che il sesso femminile influenza la prevalenza, la severità e l'espressione delle malattie su base autoimmunitaria [24]. È inoltre importante considerare che spesso la CeD 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 [25],[18],[26].

1.3 PATOGENESI

Inizialmente la CeD era considerata un'ipersensibilità alimentare; nel tempo si è scoperto che si tratta di una patologia immuno-mediata che condivide molte delle caratteristiche tipiche delle malattie autoimmuni tessuto-specifiche, come l'artrite reumatoide e il DM1. La combinazione di fattori genetici e ambientali fa sì che la celiachia sia riconosciuta tra le malattie ad origine multifattoriale.

1.3.1 Predisposizione genetica

È evidente come la componente genetica abbia un peso preponderante per lo sviluppo della CeD [1],[4]. A dimostrazione di ciò, si osserva un aumento del rischio di sviluppare CeD in individui i cui familiari ne sono affetti. Inoltre, si ha una concordanza di circa 50-75% in gemelli monozigoti [17],[27],[28], del 10% tra gemelli dizigoti, del 7,5% tra i parenti di primo grado e del 2,3% in quelli di secondo grado [29],[30].

I geni che predispongono alla CeD codificano per il sistema HLA e sono localizzati in un cluster genico sul braccio corto del cromosoma 6, contenente centinaia di geni con funzioni immunologiche. Il prodotto dei geni HLA è un eterodimero composto 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, ciascuno dei quali può presentare alleli differenti, dalla combinazione dei quali derivano poi diversi aplotipi. Gli aplotipi associati alla CeD sono HLA-DQ2.5 (codificato da DQA1*05 e DQB1*02), HLA-DQ2.2 (codificato da DQA1*0201 e DQB1*0202) oppure HLA-DQ8 (codificato da DQA1*0301 e DQB1*0302). È inoltre possibile che i pazienti con CeD non presentino nessuna delle molecole HLA sopracitate, ma presentino la molecola HLA-DQ7.5 (codificato dagli alleli DQA1*0505 e DQB1*0301).

Oltre ai geni HLA, sono stati recentemente studiati più di 40 geni non-HLA implicati nella patogenesi della celiachia, molti dei quali codificano per molecole coinvolte nel funzionamento dei linfociti T e B [31].

Circa il 90% dei pazienti con celiachia esprime l'aplotipo HLA-DQ2, il 5% esprime HLA-DQ8 e il restante 5% dei pazienti con CeD è portatore di almeno uno dei due

geni (DQA1 o DQB1) [3],[31]. La predisposizione genetica è un fattore necessario ma non sufficiente per lo sviluppo della patologia: va sottolineato che queste varianti hanno una prevalenza di circa il 30-40% nella popolazione caucasica, a fronte di una prevalenza della CeD dell'1%. Per tale ragione, il typing dell'HLA ha un basso valore predittivo positivo (VPP), mentre il valore predittivo negativo (VPN) è molto alto (>99%) [32],[33], tanto che la negatività della genetica porta all'esclusione della CeD [31]. Lo screening genetico viene effettuato nei casi in cui i risultati della sierologia e dell'istologia discordano, quando un paziente è in dieta senza glutine prima di ricevere la diagnosi di CeD e come screening nei familiari di primo grado di un paziente con CeD, per escludere una predisposizione genetica [34].

Gli alplotipi HLA-DQ2 e HLA-DQ8 hanno una grande avidità per i peptidi di glutine, soprattutto dopo che sono stati deamidati dall'enzima transglutaminasi. Una volta legati, il complesso HLA-DQ-peptidi del glutine è molto stabile e può attivare le cellule T CD4+ nella mucosa del piccolo intestino [3],[2].

1.3.2 Glutine

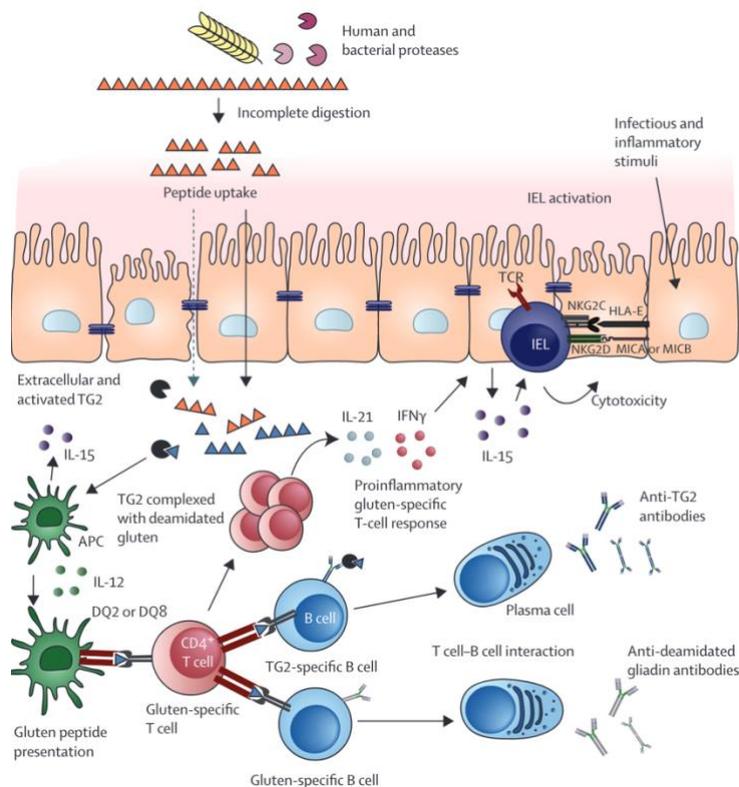


Figura 3: fisiopatologia della malattia celiaca [17]

Il glutine è un termine comunemente usato per indicare il complesso di proteine solubili in alcol denominate gliadine (suddivise nei sottotipi α , γ e ω) e proteine alcol-insolubili chiamate glutenine, suddivise a loro volta in sottotipi ad alto e basso peso molecolare. Simili proteine, denominate ordeina e secalina, si trovano nell'orzo e nella segale. Nello specifico il glutine è la proteina di stoccaggio del grano. Nonostante il basso valore nutrizionale, viene abbondantemente consumato come parte della dieta occidentale (10/20 grammi al giorno per persona); il motivo dell'utilizzo massivo del glutine da parte delle industrie alimentari è la sua capacità di conferire all'impasto elasticità, viscosità e coesione, mantenendo aria nella matrice proteica e favorendo la lievitazione e la cottura (11),(36).

Le gliadine e le glutenine sono ricche di amminoacidi quali la prolina e la glutammina, altamente resistenti all'azione delle proteasi umane e batteriche. Ciò determina l'accumulo di frammenti peptidici della lunghezza di 30-40 amminoacidi nel piccolo intestino, anche in soggetti sani (figura 3). Nei soggetti geneticamente predisposti, tali peptidi risultano altamente immunogenici e raggiungono la regione sub-epiteliale della mucosa del piccolo intestino. Fisiologicamente, le giunzioni

serrate dell'epitelio intestinale formano una barriera che ostacola il passaggio delle macromolecole; secondo alcuni studi, la gliadina è in grado di provocare un temporaneo aumento della permeabilità delle giunzioni intercellulari grazie al rilascio di una proteina chiamata zonulina [3],[35]. Una volta che i peptidi sono giunti nella lamina propria, l'enzima transglutaminasi tissutale 2 (tTG2) deamina i peptidi del glutine, convertendo i residui di glutammina ad acido glutammico, carico negativamente, il quale si lega alle cellule APC che esprimono gli alleli HLA-DQ2/ DQ8, attivando così la cascata infiammatoria nel piccolo intestino [3],[2],[9].

Tra i peptidi del glutine è stato individuato il residuo 33-mer come principale trigger della patologia, derivante dalla gliadina e costituito da 33 amminoacidi; la sua affinità di legame per le molecole HLA-DQ2 e DQ8 è così elevata da essere definito come un superantigene per la CeD [36].

1.3.3 Fattori ambientali aggiuntivi

Per decenni si è cercato di studiare il ruolo di altri fattori ambientali coinvolti nello sviluppo della celiachia come la modalità del parto, la stagione di nascita [37], le infezioni virali e l'alterazione del microbiota, che possono facilitare e/o scatenare la risposta immunitaria al glutine [38], [39].

Nei pazienti pediatrici è stata attribuita una grande importanza all'allattamento al seno e all'età di introduzione del glutine nella dieta [40],[41]. Ad oggi non ci sono evidenze sufficienti per dare linee guida precise, e l'ESPGHAN (European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition) raccomanda di introdurre il glutine nella dieta in qualsiasi momento tra i 4 e i 12 mesi di vita, in quantità limitate durante i primi mesi di introduzione [38]. Il ruolo delle infezioni è stato valutato in studi di coorte sulla popolazione [42],[43], dimostrando che infezioni precoci potrebbero predisporre allo sviluppo della CeD; in popolazioni a rischio si è confermato il ruolo predisponente delle infezioni da enterovirus e rotavirus [44],[45]. Inoltre, si è visto che la vaccinazione per il Rotavirus riduce il rischio di CeD. Tuttavia è probabile che infezioni subcliniche o cliniche da EBV (Epstein-Barr Virus), CMV (Cytomegalovirus) e rosolia abbiano un ruolo

protettivo, un dato che potrebbe spiegare il motivo per cui in regioni con condizioni igieniche ed economiche minori la prevalenza della CeD sia minore [2].

Negli ultimi anni ci si è focalizzati sul ruolo del microbiota intestinale; si tratta di un complesso ecosistema che conta migliaia di specie batteriche e che gioca un ruolo fondamentale nella maturazione e nel mantenimento del sistema immunitario mucosale, nei cambiamenti nella permeabilità intestinale e collabora nei processi digestivi [46]. È stato evidenziato che cambiamenti nella composizione del microbiota intestinale e conseguente disbiosi siano fattori di rischio per la CeD [47].

Da qui l'idea di ricercare nuovi biomarker batterici per monitorare il decorso della CeD e per personalizzare e migliorare i metodi di trattamento della malattia [48].

La composizione del microbiota è determinata anche dalla dieta. È stato dimostrato come l'adesione ad una dieta occidentale, ricca di cibi calorici, carboidrati semplici e proteine animali, va ad impattare sulla qualità del microbiota e sull'infiammazione a livello intestinale [49].

1.4 PRESENTAZIONE CLINICA

Prima degli anni '90, la maggior parte dei pazienti con CeD presentava alla diagnosi una sintomatologia tipicamente gastrointestinale con diarrea e dolori addominali. Dopo l'introduzione dei test sierologici, vennero presi in considerazione anche tutti gli altri possibili sintomi che caratterizzano la malattia [50]. Oggi è assodato che la celiachia possiede presentazioni cliniche estremamente eterogenee. La classificazione di Oslo del 2013, permette di classificare la CeD in 5 forme: classica, non-classica, subclinica, potenziale e refrattaria [1].

1.4.1 Forma classica

La forma classica è caratterizzata da sintomi e segni che si accompagnano al tipico quadro di malassorbimento, tra cui diarrea cronica, gonfiore addominale, perdita di peso e mancato raggiungimento degli standard di incremento ponderale e staturale nei pazienti pediatrici. Tradizionalmente, tale presentazione clinica è stata riferita come “forma tipica” (prima della classificazione di Oslo), “forma diarroica” e “forma intestinale” [51],[5]. Le manifestazioni classiche della CeD variano in base all'età: diarrea, distensione addominale, deperimento muscolare e mancanza di appetito sono i sintomi gastrointestinali più frequenti nei bambini, in particolare in pazienti con età inferiore a 3 anni. Negli adolescenti e negli adulti, invece, i sintomi più frequenti della forma classica sono diarrea, gonfiore e dolore addominale, costipazione e calo ponderale [52]. La forma classica è più frequente nei pazienti pediatrici, al contrario degli adulti, nei quali invece prevale la forma non-classica [5].

In rari casi, la sindrome da malassorbimento può condurre ad una emergenza medica conosciuta come “crisi celiaca”, versione a insorgenza acuta della forma classica della CeD che richiede ospedalizzazione e nutrizione parenterale. Si tratta di una sindrome rara ma con una mortalità del 9%, che presenta un esordio acuto con diarrea profusa, severa disidratazione, instabilità emodinamica, acidosi, ipotensione e ipoalbuminemia associata a disfunzione renale e neurologica [53],[54]. La crisi celiaca si verifica solitamente all'esordio della malattia,

soprattutto in casi pediatrici, ma è stata descritta anche in individui con una bassa aderenza alla GFD [55].

1.4.2 Forma non-classica

La forma non-classica, conosciuta anche come forma “atipica”, “extra- intestinale” o “non-diarroica” [51] si presenta con dolore addominale ricorrente, nausea, vomito, gonfiore, difetti dello smalto dentario e ipertransaminasemia, condizione denominata “epatite celiaca” [56]. La manifestazione clinica non-classica più frequentemente riscontrata è l’anemia da carenza di ferro: una recente review afferma che la sua prevalenza varia tra il 12% e l’82% nei pazienti con nuova diagnosi di CeD [57] ed è di più comune riscontro nel sesso femminile [58]. L’anemia ferropriva riscontrata nei pazienti con CeD è determinata soprattutto da cicli mestruali abbondanti, sanguinamenti intestinali occulti o ridotto assorbimento di ferro [58]; va sottolineato che nei pazienti con CeD i livelli circolanti e le riserve di ferro sono bassi, sia che presentino o meno anemia [58]. Altre cause di anemia nei pazienti con CeD sono la carenza di folati e di vitamina B12, comuni anch’esse al momento della diagnosi. La natura infiammatoria della celiachia può condurre a un’anemia da flogosi cronica [59], riscontrata in circa il 25% dei pazienti con CeD. Spesso i pazienti che si presentano alla diagnosi con tale quadro lamentano i classici sintomi di anemia come debolezza, cefalee, ridotta tolleranza all’esercizio fisico, irritabilità e depressione, ma anche altri sintomi come alterazioni nella termoregolazione, ritardo nello sviluppo psicomotorio nei bambini, scarsa concentrazione e performance scolastiche negli adolescenti, perdita di capelli e prurito [60].

Nei pazienti celiaci possono verificarsi cambiamenti nella densità minerale ossea (Bone Mineral Density- BMD) con conseguenti osteopenia e osteoporosi [61]; secondo una recente metanalisi il 30-60% dei pazienti giunge alla diagnosi di CeD con ridotta densità, mentre il 18-35% dei soggetti presenta osteoporosi [62]. L’eziopatogenesi della ridotta BMD e dell’osteoporosi risiede in primo luogo nella sindrome da malassorbimento, che determina un’ipovitaminosi D e deficit di calcio, essenziali per il processo di rimodellamento osseo, che possono portare a iperparatiroidismo secondario con aumento del riassorbimento osseo e osteoporosi.

Tra le manifestazioni della forma non-classica si riscontrano anche diversi disturbi di natura neurologica e psichiatrica tra cui atassia cerebellare, neuropatia periferica, convulsioni, cefalea, decadimento cognitivo, spesso riferito come “nebbia mentale”, mioclono corticale, irritabilità e depressione [5],[63],[64].

Il trattamento di tali disturbi include controllo dei sintomi e stretta aderenza alla GFD, in grado di alleviare la quasi totalità delle manifestazioni neurologiche, ad eccezione del mioclono corticale e della demenza avanzata, che in certi casi richiedono una terapia immunosoppressiva [63].

Negli ultimi decenni è stata inoltre ampiamente studiata la prevalenza di problematiche nel concepimento e nel mantenimento della gravidanza tra le donne celiache. Molteplici studi hanno dimostrato che la celiachia impatta non solo sulla fertilità, ma in generale sulla sfera ginecologica: alla CeD sono associati menarca ritardato, menopausa anticipata, aborti ripetuti, infertilità, ritardo di crescita intrauterino e basso peso alla nascita (95). È stato evidenziato che la diagnosi di CeD è motivo del 4-8% dei casi di infertilità inspiegabile e che, dopo la diagnosi e il trattamento della CeD, la fertilità si ricolloca nei range di normalità; inoltre le donne che seguono una dieta aglutinata a lungo termine hanno una durata della finestra fertile paragonabile a quella di soggetti sani [66]. I meccanismi che spiegano questa associazione epidemiologica tra CeD e infertilità sono l'infiammazione uterina mediata da citochine, meccanismi mediati da anticorpi anti-tTG circolanti, malassorbimento intestinale e successiva malnutrizione ma anche alterazioni della coagulazione [66],[67]. È bene evidenziare che non tutti gli studi concordano su questa conclusione [68] e altri studi non hanno trovato maggior incidenza di infertilità in donne con CeD [69].

Tra le manifestazioni extra-intestinali, di rilievo è la Dermatite Erpetiforme, o Dermatite Erpetica di Duhring (Dermatitis Herpetiformis- DH), una variante cutanea di celiachia. Si tratta di una rara malattia infiammatoria della pelle determinata dall'ingestione di glutine, che appare solitamente in età adulta e più frequentemente negli uomini [70],[71]. La DH può apparire anche in assenza di lesioni intestinali (fino al 30% dei casi) nei casi in cui il paziente affronta un periodo di introduzione del glutine in quantità maggiori (gluten challenge) [72]. È caratterizzata dalla presenza di un rash vescicoloso e papuloso altamente pruriginoso e localizzato a livello di gomiti, collo e glutei. La DH è caratterizzata da depositi di anticorpi IgA granulari a livello delle papille dermiche; tali anticorpi sono diretti contro la tTG2.

Tuttavia, è stato dimostrato che i pazienti con DH possono anche sviluppare anticorpi contro la transglutaminasi epidermica 3 (TG3) [73]; tali anticorpi si legano alla TG3 presente nella cute e scatenano una reazione infiammatoria [59]. La DH viene diagnosticata sulla base delle caratteristiche cliniche e sull'esecuzione di biopsia cutanea che mostra, all'immunofluorescenza, i tipici depositi di anticorpi; in tutti i pazienti le lesioni vescicolose regrediscono dopo l'adesione alla GFD, anche se la risoluzione può richiedere diversi mesi. Spesso è necessario il trattamento con dapsons o sulfapiridina per migliorare i sintomi rapidamente [59]. Altre manifestazioni non-classiche extraintestinali più rare sono manifestazioni oculari, correlate alla carenza di vitamina A, la cataratta e l'uveite, manifestazione dermatologiche, manifestazioni orali come la stomatite aftosa ricorrente, manifestazioni scheletriche e cardiovascolari [56],[70].

La prevalenza delle manifestazioni extra-intestinali 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 [52],[63].

1.4.3 Forma subclinica

Tra le differenti forme cliniche di CeD esiste la cosiddetta forma subclinica, definita anche "silente". Negli anni tale termine è stato utilizzato per indicare diversi quadri clinici, di conseguenza il termine "subclinico" ha subito cambiamenti nel suo significato: secondo la classificazione di Oslo, la CeD subclinica è un quadro al di sotto della soglia di diagnosi, senza segni o sintomi che giustificano l'esecuzione di test volti a confermare la presenza di CeD [1]. Solitamente è riconosciuta dopo l'introduzione della GFD [5]. Tipicamente, ciò si verifica in pazienti che hanno effettuato screening per la celiachia dopo la diagnosi di un familiare [74]. I casi di celiachia subclinica risultano essere in aumento negli ultimi anni a causa di una maggior consapevolezza della malattia. I pazienti con CeD subclinica 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 [75].

1.4.4 Forma potenziale

Con il termine celiachia potenziale si intende la forma di CeD caratterizzata da positività sierologica agli anticorpi anti-tTG2 ed EmA, associata a test genetico positivo, in assenza però di atrofia dei villi (Marsh 0-2, Corazza-Villanacci grado A). Si tratta di una condizione ad alto rischio di sviluppo di CeD [1]; secondo recenti studi epidemiologici, rappresenta circa il 20% dei soggetti con CeD [76]. Tuttavia, nonostante l'assenza di lesioni intestinali severe, i pazienti con CeD potenziale possono sviluppare manifestazioni extra-intestinali glutine-dipendenti. Per tale ragione, il dibattito sul trattamento dei celiaci potenziali con una dieta aglutinata è ancora aperto. Recenti studi hanno evidenziato che circa il 70% ha mostrato miglioramenti clinici dopo aver introdotto la GFD; tuttavia, un altro studio prospettico su pazienti pediatrici ha concluso che solo metà dei pazienti ha ottenuto un beneficio clinico [77]. Le nuove linee guida lasciano al paziente e al medico la decisione di intraprendere o meno la GFD [34].

1.4.5 Forma refrattaria

La diagnosi di celiachia refrattaria (Refractory Celiac Disease- RCD) viene presa in considerazione nel momento in cui un paziente celiaco, dopo almeno 12 mesi di dieta aglutinata stretta, manifesta ancora sintomi di malassorbimento e alterazioni istologiche [78]. Tale condizione si verifica con un'incidenza che varia tra lo 0,04-1,5% dei casi totali di CeD, prevalentemente dopo i 50 anni [79]. Per confermarne la diagnosi è fondamentale accertarsi che il paziente aderisca strettamente alla GFD ed escludere altre cause di malassorbimento.

L'analisi istologica e molecolare delle biopsie duodenali permette di distinguere due forme di refrattarietà sulla base dell'immunofenotipo dei linfociti intraepiteliali (IELs) riscontrati: la RCD di tipo I, con fenotipo normale dei linfociti CD3⁺CD8⁺,

e la RCD di tipo II, in cui è presente un'espansione clonale aberrante di IELs, tanto che viene definita come una condizione di pre-linfoma [79]. Nella RCD di tipo II si verifica la perdita dei fisiologici marker di superficie CD3, CD4 e CD8 [5],[1]; inoltre il recettore TCR va incontro a un riarrangiamento monoclonale della catena gamma, anche se è stato dimostrato che tale riarrangiamento non è specifico solo della RCD di tipo II [34]. La distinzione in due diverse forme è fondamentale per la terapia e per la prognosi. I pazienti con RCD I solitamente reagiscono positivamente alla terapia farmacologica. Al contrario, la RCD II viene considerata una severa complicanza della CeD in quanto presenta una mortalità a 5 anni del 55%, rispetto al tipo I, in cui la mortalità è del 7%. La RCD II presenta un rischio elevato di sviluppo di linfoma intestinale associato alle cellule T - EATL (*Enteropathy-associated T-cell lymphoma*) ad alto grado, che coinvolge i linfociti del tratto gastrointestinale. L'incidenza di EATL nei pazienti con CeD è varia e si sviluppa nel 33-52% dei pazienti con RCD di tipo II entro 5 anni dalla diagnosi [5],[80]. Il trattamento della RCD prevede supporto dietetico con adesione ad una dieta aglutinata stretta associata all'utilizzo di farmaci corticosteroidi e immunosoppressori, anche se con utilità limitata. Un trattamento alternativo è il trapianto di cellule staminali emopoietiche e successivo ciclo di chemioterapia ad alta dose [79].

1.5 DIAGNOSI DI CELIACHIA

Negli anni '90 la diagnosi di CeD si basava unicamente sulla presentazione clinica e sull'esecuzione di un esame istologico per ottenere la conferma del danno della mucosa intestinale. Dopo l'introduzione di test sierologici è stato possibile sottoporre i pazienti a test sensibili e poco invasivi: la diagnosi si basa ora sulla combinazione di sintomi suggestivi di CeD, sierologia positiva e istologia positiva [34],[6],[81].

1.5.1 “Case finding” per la celiachia

La celiachia è una patologia ad oggi sottodiagnosticata, la quale non gode degli screening di massa che si utilizzano per altre patologie, poiché non rispetta tutti i criteri stipulati dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS). Per tale motivo la Società Italiana di Gastroenterologia ed Endoscopia (SIGE) ha recentemente proposto delle linee guida che hanno lo scopo di chiarire in quali casi si raccomanda l'esecuzione di screening per la CeD [34]. In primo luogo, è necessario considerare solo i pazienti che presentano sintomi e segni suggestivi di celiachia, quali diarrea cronica, perdita di peso involontaria, anemia ferropriva, deficit di ferro, folati, vitamina B12, ritardo di crescita e stipsi nei bambini, dolore addominale cronico, nausea o vomito ricorrenti. Da prendere in considerazione sono anche quei pazienti che presentano delle condizioni come la DH, la tiroidite di Hashimoto, il morbo di Graves, il DM1 e altre malattie autoimmuni associate alla celiachia. Se c'è sospetto di CeD ma la sierologia è negativa, la biopsia duodenale va comunque effettuata [34], [65]. È fondamentale che il paziente, durante gli accertamenti sierologici e istologici, sia in corso di dieta libera contenente glutine [82].

1.5.2 Sierologia

I primi analiti utilizzati per la diagnosi di CeD, largamente impiegati negli anni '80 e '90, sono stati gli anticorpi IgG e IgA anti-gliadina deaminata (anti-DGP) che però hanno performance adeguate solo nel caso in cui ci sia un'alta probabilità che i disturbi siano causati dalla CeD, ovvero quando la probabilità pre-test di CeD è

molto alta, mentre nella popolazione generale hanno basso VPP e bassa specificità [6]. Successivamente, venne introdotta la ricerca per gli EmA e, dopo l'individuazione della tTG2 come antigene verso cui gli anticorpi sono rivolti, l'indagine sierologica della CeD ha subito una svolta in termini di sensibilità e di specificità. Oggi gli anticorpi che vengono utilizzati maggiormente sono le IgA anti-tTG ricercati con metodica ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ad elevata riproducibilità e a basso costo. Secondo una recente metanalisi, la sensibilità degli anticorpi IgA anti-tTG negli adulti è del 90,7% mentre la specificità è dell'87,4%; nei bambini tali valori si spostano al 97,7% per la sensibilità e 70,2% per la specificità; gli anticorpi anti-EmA hanno sensibilità dell'88% negli adulti e 94,5% nei bambini; la specificità è invece del 99,6% e del 93,8% [83], rispettivamente. Ciò significa che gli anticorpi anti-tTG sono i test più sensibili, mentre gli anti-EmA sono i più specifici [6].

Una problematica riguardante gli anticorpi specifici della CeD è che questi risultano molto elevati alla diagnosi e tendono a ridursi dopo l'inizio della GFD. Tuttavia, alcuni pazienti continuano a presentare elevati livelli anticorpali nonostante la stretta aderenza alla dieta e la conseguente guarigione della mucosa, mentre altri presentano bassi livelli anticorpali nonostante la persistenza dell'atrofia dei villi.

1.5.3 Celiachia sieronegativa

In una piccola percentuale di pazienti, che varia tra il 3 e il 15%, la CeD si presenta senza lo sviluppo di anticorpi specifici anti-tTG e anti-EmA; tale condizione è detta celiachia sieronegativa, la cui diagnosi si basa sul riscontro di atrofia dei villi in pazienti con genetica predisponente HLA-DQ2 o HLA-DQ8 positiva, e con evidenza di miglioramento delle condizioni cliniche ed istologiche dopo un anno dall'inizio della GFD.

Per la diagnosi di celiachia sieronegativa è importante escludere altre cause di atrofia dei villi ed è fondamentale, per la conferma della diagnosi, l'impostazione della GFD e di un follow-up di almeno un anno, successivamente al quale si verifica un miglioramento del quadro clinico. La celiachia sieronegativa è di difficile diagnosi ed è talvolta over diagnosticata; entra in diagnosi differenziale con altre enteropatie che determinano atrofia dei villi, come infezioni parassitarie (Giardia

lamblia), enteropatia autoimmune, contaminazione batterica del piccolo intestino, immunodeficienza comune variabile, gastroenterite eosinofila, linfoma intestinale EATL, malattia di Crohn, sprue tropicale, enteropatia da HIV, la malattia di Whipple e enteropatia da farmaci, provocata da olmesartan e altri sartani, FANS (farmaci antinfiammatori non steroidei) e micofenolato [5]. Negli ultimi decenni l'utilizzo del termine 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 Schieppatti et al. sulla diagnosi e sulla nomenclatura della CeD sieronegativa, esistono differenti forme di CeD che si presentano con sierologia negativa (Tabella I). In primis, la CeD sieronegativa stessa fa parte di questo spettro di presentazioni cliniche, la quale, secondo lo studio, va considerata separatamente dalla CeD associata a deficit di IgA. In secondo luogo, la CeD con sierologia negativa è stata riscontrata nel 30% dei pazienti con DH diagnosticata tramite biopsia e, più raramente, anche nei pazienti affetti sia da CeD sia da immunodeficienza comune variabile. Infine, il consensus di Parigi fa riferimento a due gruppi di pazienti. Il primo gruppo è quello dei pazienti che si presentano con sierologia negativa ma che, al momento del test, avevano già eliminato il glutine dalla dieta oppure facevano uso di terapie immunosoppressive. Tali pazienti, se reintroducono un quantitativo di glutine sufficiente nella dieta e/o interrompono la terapia immunosoppressiva, risulteranno nuovamente positivi al test sierologico. Il secondo gruppo 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 frequentemente riscontrate in ambito clinico e spesso conducono ad errori diagnostici [84].

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

Tabella I. *Spettro di presentazione della CeD con sierologia negativa.*

1.5.4 EGDS e biopsia duodenale

L'esecuzione dell'esame endoscopico e della biopsia duodenale sono step fondamentali per la diagnosi di CeD; tale esame è indicato negli adulti con sospetta celiachia, in presenza di positività agli anticorpi [34]. La porzione maggiormente interessata è il duodeno, che per primo entra in contatto con il glutine liberato dalla mucosa gastrica; lesioni macroscopiche altamente sensibili e specifiche per la CeD sono le fissurazioni della mucosa, la presenza di noduli a livello della mucosa (pattern a mosaico), l'atrofia del bulbo duodenale, l'evidenza di trama vascolare sottomucosa e la perdita, riduzione o scalloping (merlettatura) delle pliche di Kerckring (*figura 4*) [85].

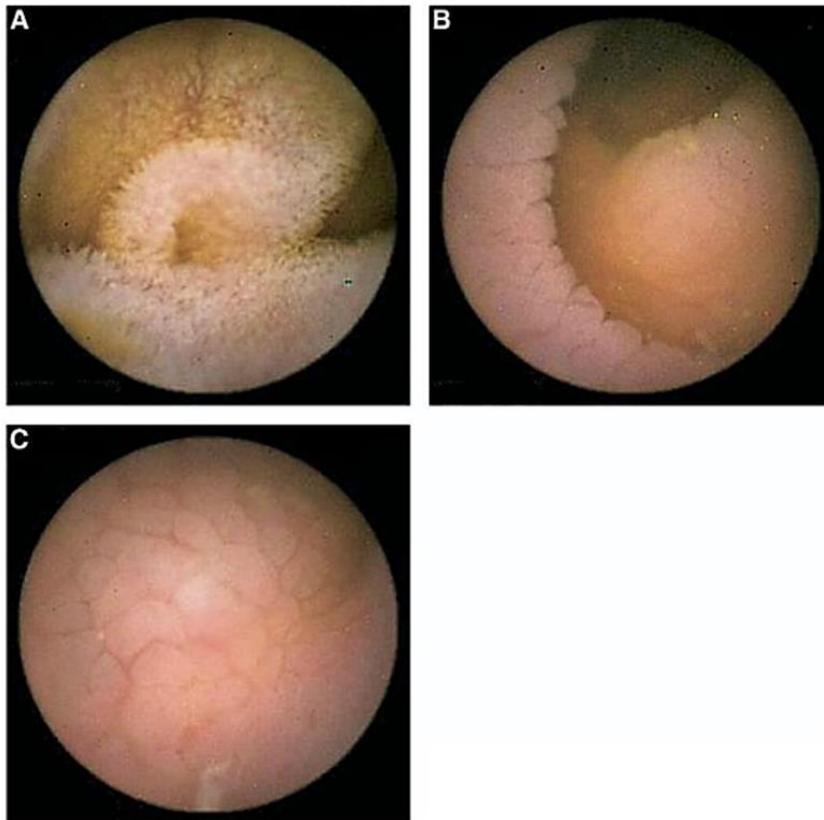


Figura 4: Aspetti endoscopici di un duodeno normale, con villi presenti (A), duodeno di paziente affetto da CeD con scalloping della mucosa a livello delle pliche di Kerckring (B), duodeno di paziente affetto da CeD con pattern a mosaico (C). Nelle immagini B e C è possibile notare l'assenza dei villi [85].

Va sottolineato che tali lesioni sono specifiche anche per altre forme di atrofia non celiaca, con cui la CeD va in diagnosi differenziale. Tuttavia, al momento della diagnosi, 1/3 dei pazienti presenta un aspetto normale, perciò è indicato, in tutti i casi in cui si sospetti la CeD, proseguire con l'esecuzione di almeno quattro biopsie a livello della seconda e terza porzione duodenale [86],[34]. Per aumentare l'accuratezza diagnostica, è suggerita l'esecuzione di ulteriori biopsie a livello del bulbo duodenale, in quanto in alcuni casi le lesioni potrebbero essere concentrate a questo livello. Oltre al numero di biopsie effettuate, è importante la metodica: le biopsie devono essere ottenute prelevando una singola biopsia alla volta e correttamente orientata in modo tale da rendere la valutazione dell'architettura dei villi più precisa. I filtri preferibili per le biopsie sono filtri Millipore in acetato di cellulosa, in grado di mantenere l'aderenza dei campioni biotici senza alterarne la qualità; ogni biopsia contiene all'incirca tre-quattro unità villo/cripta consecutive. In questa fase è di cruciale importanza la collaborazione tra endoscopista, infermiere e anatomopatologo (34),[6]. Istologicamente, la mucosa intestinale sana si caratterizza per la presenza di villi digitiformi con un rapporto tra l'altezza dei villi e delle cripte sempre a favore del villo (da 3:1 a 5:1 nella seconda parte del duodeno) e un numero di IELs minore di 25 linfociti per 100 cellule epiteliali (< 25/100). 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 con possibile metaplasia gastrica *H. Pylori* associata [87].

Le alterazioni istologiche tipiche della CeD prevedono invece un aumento di IELs (> 25/100) con incremento del numero di cellule infiammatorie a livello della lamina propria [88]; il numero di IELs CD3 e CD8 positivi viene valutato attraverso l'analisi immunistochemica con utilizzo di anticorpi monoclonali CD3, per una valutazione più accurata (118). Altre alterazioni riscontrate sono l'iperplasia delle cripte e l'atrofia dei villi fino ad una loro completa scomparsa, con alterazione del normale rapporto villo/cripta. Tuttavia, nessuna di queste lesioni è specifica di CeD e per una corretta diagnosi è quindi necessario combinare l'identificazione delle alterazioni istologiche descritte con la presentazione clinica e la positività alla sierologia [87].

In base alla presenza o meno di queste alterazioni, il quadro istologico della CeD viene suddiviso in diverse categorie secondo la classificazione di Marsh, che divide

le lesioni in tre stadi (1992), caratterizzate da lesioni istologiche via via più severe: Marsh 1, o lesioni infiltrative, Marsh 2, o lesioni iperplastiche e Marsh 3, o lesioni distruttive; successivamente Rostami e poi Oberhuber hanno suddiviso lo stadio 3 di Marsh in ulteriori tre categorie, 3A, 3B e 3C, caratterizzate da gradi crescenti di atrofia dei villi, lieve, moderata o severa. La classificazione di Marsh-Oberhuber è usata dalla maggior parte degli istopatologi sia per la diagnosi che per il follow-up [34].

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*

In seguito, per aumentare la riproducibilità e facilitare la comparazione tra diverse biopsie, è stata proposta una classificazione semplificata da Corazza e Villanacci, la quale suddivide i pazienti in 3 gruppi sulla base della morfologia dei villi: A, non atrofico, B1, con atrofia parziale e B2, con atrofia totale [87].

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 CeD. L'immunodeficienza comune variabile mimica numerosi aspetti istologici della celiachia, tra cui l'atrofia dei villi, l'iperplasia delle ghiandole nella lamina propria e un incrementato numero di IELs. Un aumentato numero di IELs è riscontrabile anche in caso di duodenite peptica secondaria all'infezione gastrica da *H. Pylori*, tuttavia questi soggetti presentano generalmente un Marsh 1. Altre condizioni che possono mimare l'istologia della CeD sono la duodenite farmaco-indotta, la quale può presentarsi in circa il 60% dei pazienti in trattamento a lungo termine con FANS [88],[89], la malattia di Crohn e le enteriti eosinofile.

1.5.5 Typing dell'HLA

Secondo le linee guida italiane 2022, il test genetico per la ricerca di HLA-DQ2 o HLA-DQ8 non viene eseguito di routine quando vi è il sospetto di CeD. La motivazione di tale indicazione risiede nel fatto che la prevalenza nella popolazione generale degli HLA tipici della CeD 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, 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 GFD al momento della diagnosi, condizione che rende inadeguato l'utilizzo della diagnostica sierologica e istologica. Infine, HLA tipici sono ricercati nei familiari di primo grado dei pazienti con CeD che desiderano essere informati dell'eventuale predisposizione genetica per la patologia [34]. L'utilità della tipizzazione genetica è data principalmente dalla possibilità di escludere la presenza della CeD qualora il test risultasse negativo mentre invece, in caso di positività, è necessario procedere con la valutazione sierologica ed istologica [31],[90].

1.6 TERAPIA

1.6.1 Dieta priva di glutine (GFD)

Ad oggi, l'unica terapia efficace per il trattamento della CeD è l'adesione stretta alla GFD, da mantenere per tutta la vita. La GFD nella maggior parte dei casi permette la regressione del danno alla mucosa duodenale, con conseguente risoluzione dei sintomi e dei segni causati dal malassorbimento [91]. La GFD prevede la rimozione di tutte le fonti di glutine dalla propria alimentazione, tra cui grano, orzo, segale e avena. È stato dimostrato che l'aderenza alla GFD è maggiore in quei pazienti correttamente istruiti su come leggere le etichette dei cibi e che sono stati meglio supportati da membri della famiglia e da figure sanitarie; per tale motivo è consigliabile che il paziente, subito dopo la diagnosi, venga seguito da un dietista con esperienza nella CeD, in modo tale che la dieta impostata non sia solo priva di glutine, ma anche nutrizionalmente adeguata [34],[92]. 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 alle 20 parti per milione (ppm), un quantitativo che viene considerato sicuro per i pazienti con CeD [91]. L'inizio della GFD conduce, generalmente, alla regressione della sintomatologia sia intestinale che extra-intestinale (entro circa un anno) riducendo inoltre il rischio di sviluppare complicanze neoplastiche. Tuttavia, nonostante la dieta aglutinata generalmente conduca ad un miglioramento sul piano clinico, ciò non sempre si verifica dal punto di vista istologico. Nello specifico, è possibile che alcune anomalie della CeD persistano a livello della mucosa duodenale. Nei pazienti pediatrici diagnosticati con CeD, la guarigione della mucosa si verifica nel 95% dei casi entro due anni dall'inizio della dieta, mentre la percentuale nei pazienti adulti è meno definita; in aggiunta, la persistenza di lesioni intestinali potrebbe aumentare il rischio di complicanze negli adulti. L'adesione alla GFD conduce anche ad una progressiva riduzione del titolo anticorpale, fino alla completa negatività. Ad ogni modo, numerosi studi hanno evidenziato che la GFD può esporre i pazienti con CeD ad una dieta sbilanciata dal punto di vista nutrizionale. Le formulazioni prive di glutine, a causa di difficoltà tecniche dovute all'utilizzo di farine differenti,

necessitano di un maggior quantitativo di carboidrati e lipidi nonché ad un minore quantitativo di fibre rispetto ai loro equivalenti contenenti glutine [93]. Per migliorare la consistenza dei prodotti privi di glutine, le formulazioni richiedono spesso l'utilizzo di additivi tensioattivi come amidi, ingredienti proteici e grassi, come le proteine del latte e dell'uovo, oppure idrocolloidi e gelatine; spesso anche il contenuto di sale e zucchero risulta maggiore nei prodotti formulati appositamente per la dieta aglutinata [91]. Negli ultimi anni, sono stati aggiunti cereali come l'amaranto e la quinoa, che contengono più alto livello di proteine, grassi, fibre e minerali rispetto a quelli a base di riso e mais [92]. Una recente review ha dimostrato come la GFD conduca ad un ridotto consumo di carboidrati e ad un aumento dei grassi, che arrivano a coprire più del 40% dell'apporto calorico giornaliero; tale fenomeno porta a una dieta sbilanciata dal punto di vista sia dei micronutrienti che dei macronutrienti [94], i cui effetti a lungo termine non sono del tutto noti. Una considerazione da fare quando si parla di dieta aglutinata è l'impatto psicologico che tale alimentazione ha sui pazienti: spesso, la poca conoscenza della patologia e di ciò che la GFD significa, espone il paziente ai rischi della contaminazione e alla successiva presentazione di sintomi, portando i pazienti a sentirsi diversi e non capiti, al punto da decidere di non partecipare ad eventi mondani. Negli anni sono state condotte diverse valutazioni della qualità di vita dei pazienti con CeD che hanno evidenziato come i pazienti, sia adulti che pediatrici, abbiano una percezione di una bassa qualità di vita, suggerendo la necessità di controllare anche questo aspetto nelle varie visite di follow-up. È inoltre necessario prevedere azioni che promuovano la conoscenza della celiachia e della GFD [95]. Va inoltre considerato l'elevato costo e la scarsa reperibilità dei prodotti senza glutine in alcuni contesti [94].

1.6.2 Altri approcci terapeutici

I numerosi ostacoli e le difficoltà nel mantenere la corretta aderenza alla GFD hanno dimostrato la necessità di ricercare terapie non dietetiche [96] che permettano la reintroduzione del glutine nella dieta senza conseguenze sullo stato di salute dei pazienti [97]. Le terapie identificate possono essere raggruppate in cinque macrocategorie: strategie di modificazione del glutine, terapie intraluminari con

enzimi, terapie di immuno-modulazione, strategie di modulazione della permeabilità intestinale e della risposta adattativa [96]. Attualmente, i farmaci che risultano più promettenti sono gli inibitori dell'interleuchina-15 (IL-15) -AMG-714. L'obiettivo degli inibitori dell'IL-15 è quello di bloccare il rilascio (gliadina-mediato) di citochine, che conduce alla proliferazione degli enterociti, delle cellule dendritiche e dei linfociti intraepiteliali, tappe fondamentali nella patogenesi della CeD e nella degradazione dei villi intestinali. 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 CeD. Il loro utilizzo consente la regolazione della permeabilità intestinale risultando nel passaggio della gliadina e nell'attivazione della risposta immunitaria contro i peptidi del glutine [98]. È stata studiata la possibilità di creare un vaccino (Nexvax2) contenente gli epitopi comunemente riconosciuti dalle cellule T glutine-specifiche, al fine di aumentare la tolleranza ai peptidi del glutine e diminuire i sintomi, ma purtroppo tale effetto non è stato raggiunto [98].

Tra le nuove possibilità terapeutiche, stanno assumendo 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 problemi relativi alla sua possibile degradazione da parte dei succhi gastrici [99]. Alcune reviews hanno inoltre indicato che l'utilizzo dei probiotici potrebbe alleviare i sintomi gastrointestinali, moderando la risposta immunitaria e la disbiosi intestinale; tuttavia, è stato visto che l'utilizzo dei probiotici potrebbe giovare solo come terapia di supporto per alleviare la severità dei sintomi [98]. Negli ultimi anni, la ricerca ha puntato i riflettori sullo studio dei microRNAs (miRNAs), piccole molecole di RNA non codificante, che oltre ad essere considerati dei marker non invasivi nella diagnosi di celiachia, potrebbero essere utilizzati come target farmacologici nel follow-up [97].

1.7 FOLLOW-UP

Dopo un tempo variabile dall'inizio della GFD (6-12 mesi) i pazienti con CeD 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 adulti [100], fondamentale per comprendere se il paziente ha una buona aderenza alla GFD, se il danno istologico è in via di risoluzione e per prevenire complicanze. Le visite in corso di FU devono essere effettuate ogni 3-6 mesi nel corso del primo anno dopo la 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 CeD, come già descritto, può portare a bassa statura e scarsa crescita. Le linee guida del National Institute for Health and Care Excellence (NICE) del 2015 suggeriscono che il FU debba essere preso in carico preferibilmente da dietisti esperti in CeD. In ogni caso, le linee guida concordano nello stabilire quali siano le informazioni fondamentali da raccogliere durante le valutazioni annuali del paziente: è essenziale indagare l'eventuale presenza di sintomi e segni ed effettuare una breve intervista per comprendere eventuali difficoltà nell'aderenza alla GFD. In aggiunta, vanno effettuati test sierologici (IgA anti-TTG se il paziente non presenta deficit di IgA) e laboratoristici [91],[101],[102] con lo scopo di valutare la presenza di malassorbimento. Risulta inoltre importante sondare la presenza di altri disturbi autoimmunitari attraverso il dosaggio del TSH (per le tireopatie) e della glicemia sierica (per il DM1). La negativizzazione della sierologia specifica per CeD è un segno di buona aderenza alla GFD ma non correla necessariamente con una completa risoluzione dell'atrofia dei villi a livello duodenale, per cui vi è la necessità di avere biomarkers specifici per il monitoraggio della celiachia.

L'EGDS, generalmente eseguita solo al momento della diagnosi, va ripetuta per i pazienti non responsivi alla GFD, in caso di CeD sieronegativa e nel caso in cui vi è maggiore rischio di sviluppare complicanze. Inoltre, nei pazienti con ridotta BMD e bassa aderenza alla dieta o persistenza di atrofia è necessario effettuare la densitometria ossea (DEXA) ogni 2-3 anni. Importante è valutare la salute psicologica dei pazienti con CeD, sia alla diagnosi che al follow-up.

2. CELIACHIA NON-RESPONSIVA

2.1 DEFINIZIONE DI NRCD

Per celiachia non-reativa (Non-Responsive Celiac Disease- NRCD) si intende la persistenza di sintomi, segni o alterazioni agli esami di laboratorio nonostante l'aderenza alla GFD per almeno 6-12 mesi, condizione che si verifica nel 7-30% dei pazienti [103],[104]. Solitamente si tratta di una condizione temporanea, che si risolve dopo averne capito la causa [105]. Secondo una recente review, la NRCD è stata riportata in un numero più ampio di pazienti, in particolare nel 7-50% dei pazienti adulti e nel 15-30% dei pazienti pediatrici [106].

È di fondamentale importanza capire se la causa principale è una non sufficiente aderenza alla GFD, o se sia dovuta a complicanze, come la RCD, EATL o l'adenocarcinoma del piccolo intestino. Va sottolineato che alcuni studi epidemiologici hanno riscontrato negli adulti un'associazione tra NRCD con persistente atrofia dei villi e il rischio di sviluppare refrattarietà e linfoma intestinale [106]. Per tale motivo, è di fondamentale importanza che la diagnosi differenziale tra NRCD e RCD sia corretta, soprattutto nel caso in cui si sospetti una RCDII non reattiva alla GFD [106]. La NRCD può essere classificata in primaria, in cui il paziente non risponde alla GFD dal momento della sua introduzione, e secondaria, in cui il paziente inizialmente risponde ma in seguito sviluppa sintomi nonostante l'aderenza stretta alla dieta [103],[104]. Le linee guida Europee hanno scoraggiato l'utilizzo del termine "non reattiva" a favore del termine "slow responders": una prima motivazione del cambio di terminologia è che l'utilizzo del termine "non reattiva" rischiava di far passare il concetto che la NRCD sia una condizione che non può migliorare. Al contrario, tali pazienti, dopo un'attenta rivalutazione, migliorano grazie a una più rigida GFD o per la diagnosi di una condizione concomitante alla CeD, di cui viene iniziato il trattamento [6,107]. Secondo la review di Caio et al. un'altra ragione per evitare il termine "non reattiva" è che la causa della persistenza dei sintomi potrebbe non essere correlata alla CeD, ma semplicemente ad essa associata. Di conseguenza, secondo questo studio, le cause di mancata risposta alla GFD andrebbero suddivise in due fenotipi, quelle determinate da una malattia celiaca ancora attiva (OACD, ongoing active celiac disease) e quelle determinate da condizioni associate alla malattia celiaca (ACDC, associated celiac disease conditions) [5].

Le cause della NRCD sono, nella maggior parte dei casi, dovute all'esposizione volontaria/involontaria e costante a fonti di glutine (35-50%). La lenta risposta alla GFD, in alcuni casi potrebbe essere dovuta a patologie come la colite microscopica, la sindrome del colon irritabile (Irritable Bowel Syndrome- IBS), la sovracrescita batterica intestinale (Small Intestinal Bacterial Overgrowth- SIBO), le intolleranze al lattosio/fruttosio, la malattia diverticolare, alcune alterazioni tiroidee.

Contaminazione di glutine nella dieta
IBS
SIBO
Intolleranza a fruttosio/lattosio
Malattia diverticolare
Alterazioni tiroidee
Colite microscopica
Morbo di Crohn
Enteropatia indotta da farmaci
Immunodeficienza comune variabile
Enteropatia autoimmune

Tabella IV: *cause più frequenti di NRCD*

In altri casi, si ha la presenza di RCD. Raramente, la persistenza dei sintomi può essere spiegata dallo sviluppo di serie complicanze, quali digiunoileite ulcerativa, EATL e l'adenocarcinoma [108]. Un recente studio retrospettivo condotto su pazienti pediatrici ha descritto inoltre, tra le cause di NRCD, il reflusso gastroesofageo, la costipazione, l'esofagite eosinofila, le allergie alimentari e i disordini del comportamento alimentare [109].

Uno studio condotto all'Ospedale di Tor Vergata ha analizzato le caratteristiche demografiche e cliniche di 56 pazienti con NRCD seguiti nel loro centro: il 52% dei pazienti presentava sintomi intestinali quali diarrea, gonfiore e dolore addominale, il 24% riportava la persistenza di sintomi extraintestinali come astenia e artralgia mentre il 24% presentava una combinazione di tali sintomi [105]. In tale studio, come primo step diagnostico, i pazienti sono stati sottoposti alla ricerca degli

anticorpi anti-EmA; si è scoperto che il 23% di loro era EmA positivo e tra questi, dopo una rivalutazione delle abitudini alimentari, più della metà presentava contaminazione di glutine nella dieta, mentre i restanti erano effettivamente slow-responders. Nei pazienti EmA negativi, è stato necessario eseguire altri esami, grazie ai quali è stato dimostrato che alcuni pazienti avevano ricevuto una diagnosi iniziale errata di celiachia, mentre negli altri si sono riscontrate patologie concomitanti che spiegano la persistenza di sintomi [105]. Un recente studio osservazionale ha inoltre riscontrato che i pazienti con CeD in cui i sintomi persistono, presentano una più bassa qualità di vita, maggiore probabilità di sviluppare disturbi psichiatrici, quali ansia e depressione, e peggior stato sociale. L'analisi dei sintomi dei pazienti coinvolti ha permesso di identificare un sottogruppo con sintomatologia più severa e minore qualità di vita (Quality of Life-QoL); è stato evidenziato inoltre che tale gruppo di pazienti presentava un minore grado di educazione e condizioni sociali meno benestanti [110].

2.2 ALGORITMO DIAGNOSTICO DELLA NRCD

Il primo step dei pazienti che presentano sintomi persistenti è la rivalutazione della diagnosi iniziale di CeD, passo fondamentale dal momento che, negli ultimi anni, la conoscenza della patologia e di come questa si presenti è aumentata considerevolmente. La conferma della diagnosi iniziale prevede la revisione della sierologia e dell'istologia ottenute al momento della diagnosi. Per quanto riguarda l'istologia, inoltre, va considerato che solo il 30% dell'atrofia dei villi è ascrivibile alla CeD e che alcune condizioni, come la celiachia sieronegativa, sono talvolta over-diagnosticate [34].

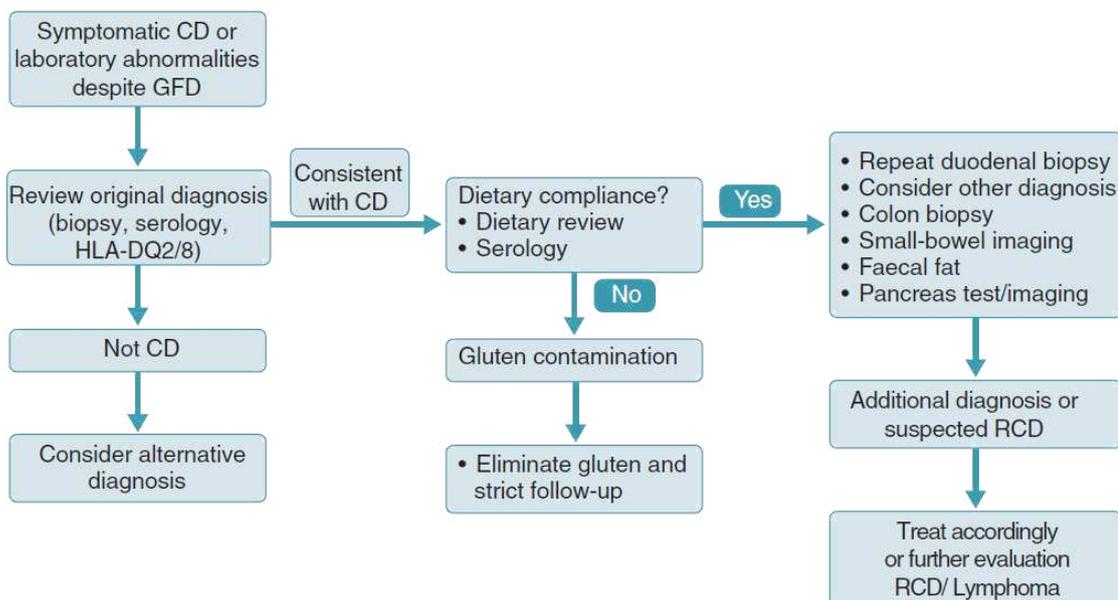


Figura 5: Algoritmo diagnostico della NRCD [5]

Nel caso in cui emergano dubbi sulla diagnosi iniziale di CeD, è necessario ripetere gli esami sierologici e istologici (Figura 5). Le biopsie devono essere prelevate dopo un periodo di “gluten challenge”, ossia di introduzione di 10 grammi di glutine per almeno 6 settimane, e analizzate da uno o due anatomopatologi esperti [108]. Visto l’elevato VPN dell’analisi genetica, è consigliato effettuare il typing dell’HLA per escludere la predisposizione alla CeD [104]. Se la diagnosi iniziale di CeD non risultasse corretta, vanno considerate diagnosi e trattamenti alternativi. Nel caso in cui si confermi la presenza di CeD, è necessaria una valutazione dietetica per escludere contaminazioni volontarie o involontarie nella dieta, tenendo

conto che l'ingestione di glutine spiega il 35-50% dei casi di NRCD. Alcuni studi hanno evidenziato come i pazienti tendano a sovrastimare la loro aderenza alla GFD [108]. Nella valutazione dell'aderenza è bene indagare potenziali esposizioni al glutine, come l'abitudine a mangiare fuori casa, il consumo di avena non certificata e l'eventuale condivisione di utensili con individui non celiaci; inoltre va valutata l'adeguata conoscenza dei prodotti contenenti glutine. Strumenti per valutare l'aderenza alla GFD sono i questionari, i test sierologici e la valutazione dei sintomi; l'assenza di anticorpi circolanti non esclude piccole ingestioni di glutine; inoltre, la persistenza di titoli anticorpali elevati si può verificare in quei rari pazienti che seguono la GFD ma hanno RCD [78]. È possibile utilizzare dei biomarker di recente introduzione, tra cui i GIPs (gluten immunogenic peptides), che oltre ad essere responsabili della reazione immunitaria che si verifica nei pazienti con CeD, possono essere riscontrati nelle feci e nelle urine, attraverso metodica ELISA o con immunocromatografia. Diversi studi clinici riportano che i GIPs presentano un'alta sensibilità e specificità per il monitoraggio dell'aderenza alla GFD [108]; questi test permettono di riscontrare l'esposizione continua al glutine in quei pazienti che riferiscono un'elevata aderenza. Altri biomarker utilizzabili ed emergenti sono i miRNA urinari [111].

È fondamentale che la valutazione dietetica comprenda anche la ricerca di intolleranze alimentari, come quella per il fruttosio e il lattosio, e dell'eventuale utilizzo di farmaci [6]. Nel caso in cui venisse riscontrata una fonte di contaminazione, il paziente va rieducato alla GFD e rivalutato dopo 3-6 mesi; se la sintomatologia dovesse persistere, è necessario capire se questa sia determinata da refrattarietà o da altri processi concomitanti [112].

Nel caso in cui i sintomi e i segni persistono, è necessario procedere con l'esecuzione dell'esame endoscopico. Il riscontro di enteropatia con atrofia dei villi è compatibile con l'esposizione al glutine continuativa, ma anche con la RCD (per la cui diagnosi è necessario svolgere l'analisi immunoistochimica delle biopsie) e con altre cause di atrofia dei villi. Al contrario, il riscontro di morfologia normale o leggermente alterata (Marsh 0-1) suggerisce eziologie alternative [6].

Nei pazienti in cui persiste l'atrofia dei villi, è possibile che questa sia dovuta a una super-sensibilità al glutine, tale per cui anche minimi quantitativi (<10mg al giorno) sono sufficienti a determinare la persistenza di atrofia. Per tali pazienti è consigliata una dieta ancora più restrittiva, detta "gluten contamination elimination diet"

(GCED), in cui vengono esclusi prodotti processati in modo da prevenire anche la minima ingestione di glutine. La GCED può essere inoltre utilizzata nell'algoritmo diagnostico della NRCD per differenziare i pazienti super sensibili al glutine da quelli con RCD, oltre all'analisi delle biopsie duodenali [103],[104],[112],[107].

2.3 TERAPIA DELLA NRCD

Per i pazienti con NRCD è fondamentale impostare un controllo con dietisti esperti e un regolare FU gastroenterologico, volto a ricercare tutte le possibili fonti di contaminazione. Uno studio ha dimostrato che dopo la ri-educazione alla GDF, la sintomatologia dei pazienti si è risolta nel 63% dei casi; nel restante 37% i pazienti non hanno mantenuto un'aderenza stretta e, di questi, l'86% ne era consapevole [105]. Nell'educare tali pazienti, è importante sottolineare come la mancata aderenza alla dieta sia causa sia della persistenza della sintomatologia ma anche dell'aumentato rischio di complicanze, legate sia alla CeD ma anche ad altre patologie immuno-mediate e tumori [105]. In alcuni casi, specialmente in caso di diagnosi di RCD 1, è suggeribile di un trattamento di 12 settimane con capsule di budesonide a rilascio intestinale; è stato visto che tale terapia determina risoluzione dei sintomi e dell'atrofia dei villi in maniera duratura.

Un'altra frequente causa di persistenza dei sintomi è l'IBS. In uno studio osservazionale, la presenza di IBS nei pazienti con sintomi persistenti è stata riscontrata nel 15% dei casi [105]; l'IBS è una comune patologia cronica e funzionale con una prevalenza stimata del 4-11% nel mondo; i sintomi includono dolore addominale, diarrea, costipazione e gonfiore addominale, che determinano una minore qualità di vita, una minore produttività e un maggior ricorso alle cure ospedaliere [113]. La coesistenza della CeD con l'IBS è nota in letteratura, in quanto molto spesso i pazienti che presentano entrambe le condizioni non raggiungono una situazione di benessere clinico. Talvolta purtroppo l'aderenza alla GFD può addirittura peggiorare alcuni sintomi correlati alla IBS: ad esempio, il minore introito di fibre può peggiorare la stipsi dell'IBS-C. La sintomatologia di tali pazienti solitamente si risolve dopo aver impostato una terapia adeguata per l'IBS, ovvero probiotici per i pazienti con IBS-D, e maggior introito di fibre per i

pazienti con IBS-C [105]; un'altra terapia dietetica per l'IBS prevede l'introduzione della dieta FODMAP, una dieta a basso contenuto di oligo-, di- e monosaccaridi fermentabili; una recente review ha visto come in pazienti con CeD e IBS che lamentavano persistenza di sintomi, tale dieta, mantenuta per 4-12 settimane, abbia portato alla risoluzione della sintomatologia; per tale motivo la dieta FODMAPs deve essere considerata in quei pazienti che presentano ambedue le condizioni e in cui la bassa aderenza alla GFD e altre condizioni sono state escluse [113].

3. MiRNAs COME BIOMARKERS NELLA CeD

3.1 MiRNAs

Recentemente, i miRNA sono emersi come markers diagnostici innovativi per molte patologie. Inoltre, sono stati recentemente proposti come biomarkers specifici per i diversi stadi della CeD [114],[115]. I miRNA sono piccole molecole di RNA non codificante a doppio filamento, lunghe circa 21-25 nucleotidi e altamente conservate tra le diverse specie. Il loro ruolo fisiologico è la regolazione dell'espressione genica a livello post-trascrizionale; inoltre, una volta secreti nei fluidi extracellulari, mediano la comunicazione intercellulare in modo sia autocrino che paracrino. Si stima che il genoma umano contenga più di 700 geni codificanti per miRNA, che contano l'1-4% dei geni espressi [116]. Il loro processamento prevede diverse tappe, che culminano nel caricamento del miRNA sul RISC (RNA-induced silencing complex), un complesso ribonucleoproteico in cui 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) degli mRNA (RNA messaggero) codificanti proteine: tale legame determina l'inibizione della traduzione dell'mRNA o la sua degradazione [115]. Il legame miRNA-mRNA non è perfetto, quindi un singolo miRNA agisce potenzialmente su diverse centinaia di mRNA bersaglio (molteplicità) e allo stesso tempo un mRNA può essere target di molti miRNA (cooperatività). 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 degli mRNA e delle proteine target [117]. Recenti studi hanno dimostrato il contributo dei miRNA in un'ampia varietà di processi sia fisiologici, come la differenziazione, la proliferazione e l'apoptosi, che patologici, evidenziando un ruolo nello sviluppo di malattie autoimmuni come l'artrite reumatoide, la sclerosi multipla, il DM e diversi tipi di cancro, come il tumore allo stomaco; è probabile infatti che i miRNA partecipino alla tumorigenesi agendo come oncosoppressori o oncogeni [116],[118]. Oltre a ciò, giocano un ruolo cruciale nella regolazione della

risposta immunitaria poiché modulano sia la funzionalità che la differenziazione dell'immunità innata e adattativa [116].

I miRNA sono molecole molto stabili, sia nei fluidi biologici (siero, plasma, urina, saliva) che in condizioni di laboratorio estreme. La loro espressione è altamente tessuto-specifica e può costituire uno specifico segno di malattia [119]. Possono essere secreti all'esterno delle cellule (miRNA circolanti) dove mediano la comunicazione intercellulare. Il livello dei miRNA circolanti può correlare con quello dei miRNA presenti nel tessuto interessato da patologia e cambiamenti nei miRNA circolanti possono precedere le variazioni dei biomarkers sanguigni usati come standard [119],[120]. Queste caratteristiche, sommate alla loro stabilità nei liquidi biologici, rendono i miRNA circolanti facilmente utilizzabili come biomarkers non invasivi in diverse patologie [119].

3.2 RUOLO DEI miRNAs NELLA PATOGENESI, DIAGNOSI E FOLLOW-UP DELLA CeD

Le crescenti evidenze di un'alterazione dell'espressione dei miRNA in pazienti celiaci rispetto ai controlli sani suggeriscono un loro ruolo nella patogenesi della CeD. È stato osservato che nei pazienti con CeD il trascrittoma del piccolo intestino, ovvero la totalità degli RNA trascritti, è diverso rispetto a quello riscontrato nei controlli sani [115] e l'espressione genica è diversa, soprattutto per quanto riguarda i pathways che interessano il metabolismo e la funzionalità delle cellule B e T del sistema immunitario [114]. Inoltre, è stato dimostrato che i miRNA circolanti sono espressi diversamente nei celiaci e che il livello dei miRNA correlati con l'infiammazione è elevato nel sangue periferico [121]. In linea con tali risultati, studi sulle biopsie duodenali hanno riscontrato un diverso profilo di espressione dei miRNA nei pazienti celiaci rispetto ai controlli [116]. Per tali ragioni, i miRNA sono stati proposti come biomarkers circolanti non invasivi sia per la diagnosi che per il monitoraggio della patologia celiaca durante il FU [116],[119].

Altre patologie gastrointestinali per cui il ruolo dei miRNA è in esame sono le malattie infiammatorie intestinali (Inflammatory Bowel Diseases- IBDs), il tumore del colon-retto e il tumore dello stomaco [122].

3.2.1 miRNA nelle biopsie duodenali

Esperimenti condotti sui topi hanno dimostrato l'importanza dei miRNA nel mantenimento dell'omeostasi intestinale: topi knockout (mancanti) per il gene codificante per Dicer, l'enzima responsabile della sintesi dei miRNA in forma matura, presentano un epitelio disorganizzato dal punto di vista delle popolazioni cellulari e un'alterazione della barriera che comporta infiammazione, infiltrazione di linfociti e neutrofili [123]; il deterioramento dell'epitelio intestinale e la conseguente permeabilità che caratterizzano i pazienti con CeD potrebbero essere determinati da alterazioni dei miRNA.

Un esempio di miRNA alterato nelle biopsie duodenali è stato riscontrato in uno studio condotto su pazienti celiaci pediatrici, in cui si è rilevata una consistente up-regolazione di miR-449a, i cui target sono NOTCH1 e KLF4, coinvolti entrambi nel controllo dell'omeostasi intestinale. È probabile che la down regolazione di NOTCH1 e KLF4 conduca alla riduzione delle cellule caliciformi mucipare nell'intestino dei pazienti con CeD, rendendoli più suscettibili agli agenti dannosi presenti nel lume intestinale [116].

In altri studi è stata rilevata l'up-regolazione di miR-122a a livello degli enterociti, il cui target è il gene codificante per le occludine; a ciò consegue una deplezione di occludine a livello degli enterociti e un'aumentata permeabilità del tratto gastrointestinale [124]. È stato scoperto che il livello di miR-122a è, a sua volta, regolato dall'infiammazione a livello intestinale: nei pazienti celiaci al momento della diagnosi è stato infatti riscontrato un incremento del fattore di necrosi tumorale (TNF α), che causa un rapido e consistente aumento di miR-122a a livello degli enterociti e quindi della permeabilità intestinale. Il livello di TNF α si normalizza dopo l'inizio della GFD [125].

In aggiunta, uno studio condotto in pazienti celiaci adulti con atrofia dei villi ha riscontrato una diminuita espressione nelle biopsie di miR-192-5p, miR-31-5p, miR-338-3p, e miR-197, soprattutto nei pazienti con lesioni Marsh 3C. La down regolazione di miR-192-5p è inversamente correlata con l'aumento del livello delle proteine CXCL2 e NOD2, entrambe coinvolte nell'immunità innata. Per di più, altri 3 fattori coinvolti nella regolazione dell'immunità innata e adattativa come FOXP3, RUNX1 e IL-18 (rispettivamente target di miR-31-5p, miR-338-3p e miR-197) risultavano up-regolati nei pazienti con CeD; 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 CeD [126].

3.2.2 miRNA circolanti

Fino a poco tempo fa, la quasi totalità degli studi che analizzava i miRNA in pazienti con CeD si limitava ai miRNA tissutali, estratti da campioni di mucosa duodenale. Negli ultimi anni sono stati rilevati miRNA circolanti in diversi fluidi corporei, come siero e plasma. I miRNA circolanti, inoltre, sembrano essere correlati con i diversi stadi della CeD e con l'aderenza alla GFD [116].

Per rilevare la presenza di una corrispondenza tra i miRNA deregolati a livello tissutale e quelli presenti nella circolazione sanguigna, uno studio ha ricercato nel sangue gli stessi miRNA alterati nelle biopsie di pazienti celiaci, tra cui miR-192-5p e miR-486-5p, dimostrando che i livelli plasmatici seguono una tendenza simile a quelli tissutali. Tuttavia, è necessario un pannello più ampio di miRNA plasmatici per avere informazioni affidabili sullo stato della mucosa intestinale [127]. A tal proposito, lo studio condotto da Tan et al. ha analizzato il livello di 53 miRNA in pazienti pediatrici arruolati alla nascita, poiché ad alto rischio di sviluppare CeD per familiarità e/o per patologie associate. Tra i miRNA valutati, otto (miR-21-3p, miR-374a-5p, 144-3p, miR-500a-3p, miR-486-3p, let-7d-3p, let-7e-5p e miR-3605-3p) differivano significativamente rispetto ai controlli sani circa un anno in anticipo rispetto alla positività degli anticorpi IgA anti-tTG, e per tale motivo sono stati identificati come possibili biomarkers precoci della CeD [128]. Sei tra i miRNA studiati (tra cui miR-150-5p/-3p) che inizialmente erano down-regolati, iniziavano a normalizzarsi in seguito all'introduzione della dieta aglutinata, suggerendo una loro potenziale utilità nel FU della CeD. La problematica principale di alcuni di questi miRNA è la specificità: infatti alcuni di essi sono alterati anche in enteropatie intestinali e malattie autoimmuni [128] e sembrano essere associati ad uno stato infiammatorio più che ad una diagnosi particolare [129]. È stato perciò ipotizzato che alcuni miRNA fungano da markers di infiammazione intestinale, indipendentemente dalla patologia in corso, mentre altri potrebbero essere marker specifici della CeD [130].

I miRNA riscontrati alterati sono miR-21-3p e miR-21-5p sono fortemente up-regolati nel piccolo intestino e nella circolazione di pazienti celiaci [127]. In

particolare, è stato visto che miR-21 non si normalizza dopo l'inizio della dieta, e che quindi la sua misurazione non è utile per il monitoraggio nel FU [121]. Lo stesso studio ha inoltre rilevato una costante alterazione di miRNA correlati all'infiammazione (miRNA-146a, miRNA-155, miRNA-21, e miRNA-125b); per di più, i livelli di miRNA-146a e miRNA-155 hanno mostrato alta sensibilità e specificità per la presenza di CeD, suggerendo un loro possibile utilizzo come biomarkers indipendentemente dal trattamento dietetico in corso [121].

Un altro studio condotto da Felli et al. ha analizzato il livello di espressione di alcuni miRNA in pazienti celiaci alla diagnosi, in dieta aglutinata e in controlli sani; tale studio ha permesso di identificare tre miRNA circolanti (miR-192-5p, miR-215-5p e miR-125b-5p) che discriminano tra i tre gruppi con alta accuratezza e specificità. I suddetti miRNA circolanti potrebbero essere usati sia per la diagnosi di pazienti pediatrici con bassi livelli di IgA anti-tTG, risparmiando loro l'esecuzione di una EGDS, ma anche per monitorare l'aderenza alla GFD [117]. Inoltre, il riscontro di elevati livelli di questi miRNA prima della diagnosi, suggerisce un forte potenziale come predittori di sviluppo della CeD [130].

Nei pazienti celiaci è stata riscontrata la down-regolazione di miR-451. Studi preliminari condotti sui topi hanno dimostrato che alla down-regolazione di miR-451 è collegata una minore attività di enzimi, come glutatione-perossidasi e catalasi, a cui consegue un maggiore stress ossidativo [116]. In accordo con tali evidenze, nei pazienti celiaci è stato riscontrato un aumento dello stress ossidativo, determinato dall'esposizione al glutine e implicato nella fisiopatologia della CeD [131]. Tale studio ha dimostrato che, nei pazienti celiaci, vi è una diminuzione della capacità antiossidante totale (Total Antioxidant Capacity- TAC) rispetto ai controlli sani; la diminuzione è più spiccata specialmente nei pazienti alla diagnosi e nei pazienti non responsivi (NRCD). Ciò indica un'inadeguata risposta fisiologica ad alte produzioni di specie reattive dell'ossigeno (Reactive Oxygen Species- ROS), che nei pazienti non responsivi vengono prodotte ad alti livelli nonostante l'aderenza alla GFD. Alcuni studi hanno ipotizzato che la minore capacità antiossidante nella NRCD sia determinata dal malassorbimento di antiossidanti derivanti dalla dieta (come retinolo e acido ascorbico) a causa della persistente atrofia duodenale; nel plasma di pazienti con CeD attiva è stata infatti riscontrata una diminuzione di tali antiossidanti [132].

3.3 miRNA NELLA DIETA AGLUTINATA

Studi condotti in pazienti celiaci che seguono la GFD hanno individuato alcuni miRNA circolanti che possono fungere da affidabili marcatori di aderenza. Tra questi, lo studio di Felli et al. ha individuato miR-192-5p, miR-215-5p e miR-125b-5p, che risultano deregolati alla diagnosi e i cui livelli vengono ripristinati grazie all'adesione alla GFD. Tale studio ha dimostrato che la misurazione combinata dei suddetti miRNA permette di discriminare con adeguata sensibilità e specificità i pazienti celiaci in dieta aglutinata, permettendo di monitorare l'aderenza alla GFD in modo innovativo [119]. Lo studio di Tan et al., inoltre, ha riscontrato che i livelli miR-150-3p e miR-150-5p sono bassi alla diagnosi di CeD e aumentano durante la dieta aglutinata [114]. Tali risultati sono rilevanti, soprattutto considerando che, ad oggi, non ci sono test analitici altamente specifici che permettono di monitorare l'aderenza alla GFD [119].

Oltre ai miRNA circolanti, recenti evidenze hanno dimostrato che anche i miRNA urinari possono fornire informazioni complementari per monitorare l'aderenza [111].

3.4 miRNA NELLA CeD COMPLICATA

Un recente studio ha cercato di identificare la presenza di miRNA alterati in pazienti con CeD complicata, in particolare in presenza di RCD, in modo tale da utilizzarli come predittori di complicanze della celiachia. È stato dimostrato che miR-200 e miR-192/215 risultano altamente down-regolati nei soggetti con RCD di entrambi i tipi e con EATL [129]. In particolare, miR-200 e mir-192 sono coinvolti nell'inibizione della proliferazione cellulare, nell'adesione delle cellule tumorali, nella migrazione e nello sviluppo di metastasi, evidenziando così un loro coinvolgimento nello sviluppo di RCD e EATL [133].

È interessante notare come alcuni dei miRNA identificati in concomitanza con RCDII 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 EATL, in quanto associati all'oncogenesi. Un esempio è il miR-1226 che sembra essere implicato nella risposta al TGF- β e nei processi infiammatori; recentemente è stata osservata un'up-regolazione del miR-1226 in pazienti con linfoma intestinale [116]. I miRNA che risultano incrementati selettivamente nei pazienti con RCDII e che potrebbero essere utilizzati come markers di tale condizione sono miR-770-5p, miR-181b-2-3p, miR-1193 e miR-1226-3p [129].

Uno studio del nostro gruppo ha dimostrato, in linea con tali ritrovamenti, livelli particolarmente elevati di miR-1226 in pazienti con CeD complicata progredita in EATL [116]. Inoltre, il nostro gruppo ha operato una review che riassume le evidenze ad ora presenti riguardanti i miRNA nella CeD (*Figura 6*) [116].

First author	Year	miRNAs	Number	Tissue/blood	Pediatric/adult population	Main findings
Capuano	2011	miR-449a	Active CeD, n = 20 GFD, n = 9 Controls, n = 11	Tissue	Pediatric	miR-449a inhibits the expression of NOTCH1 and KLF4
Vaira	2014	miR-31-5p, miR-192-3p, miR-194-5p, miR-551a, miR-551b-5p, miR-638 and miR-1290	Active CeD, n = 33 GFD, n = 34 Controls, n = 17	Tissue	Adult	Downregulation of miR-194-5p and overexpression of miR-638 in CeD with anemia. Downregulation of miR-31-5p and miR-192-3p, and overexpression of miR-1290 related to CeD regardless of the clinical presentation
Magni	2014	miR-192-5p, miR-31-5p, miR-338-3p, and miR-197	Microarray: CeD, n = 6; controls, n = 5 Validation: controls, n = 10; active CeD, n = 21 (Marsh 3A-B, n = 9 and Marsh 3C, n = 12) Controls, n = 17	Tissue	Adult	Decreased expression of miR-192-5p, miR-31-5p, miR-338-3p, and miR-197 Among possible miRNAs targets, increased mRNA and protein of CXCL2 and NOD2 in Marsh 3C, and significant inverse correlation with miR-192-5p
Buoli Comani	2015	miR-192-5p, miR-31-5p, miR-338-3p, miR-21-5p	In vitro experiments, GDF, n = 9; controls, n = 5 Tissue analysis: Controls, n = 8; active CeD, n = 20 Plasma analysis: controls, n = 12; active CeD, n = 17 GFD, n = 7	Tissue and plasma	Pediatric	Alterations in CXCL2 and NOD2, FOXP3, miR-192-5p, and miR-31-5p expression were triggered by gliadin exposure Downregulation of miR-192-5p, miR-31-5p and miR-338-3p expression in CeD. Upregulation of miR-21-5p Plasma analyses demonstrated a similar trend to that observed in biopsies
Comincini	2017	miR-17, miR-30a	Tissue analysis: controls, n = 24; active CeD, n = 25 Blood analysis: controls, n = 33; active CeD, n = 23 Active CeD, n = 10 GFD, n = 10	Tissue and blood	Pediatric	Autophagy-related genes (ATG7 and BECN1) are regulated by miR-17 and miR-30a. These molecular markers may be useful to increase the accuracy in CeD diagnosis
Bascunan	2020	miRNA-146a, miRNA-155, miRNA-21, miRNA-125b	Active CeD, n = 10 GFD, n = 10 Controls, n = 10 n = 53 (n = 33 developed CeD during follow-up; controls, n = 20)	Tissue and blood	Adult	CeD versus controls in peripheral blood mononuclear cells: miRNA-146a (AUC = 0.91) and miRNA-155 (AUC 0.92)
Tun	2021	>200 miRNAs	Active CeD, n = 40 GFD, n = 40 Controls, n = 40	Serum	Pediatric	In plasma, high accuracy for miR-155 (AUC 0.98) 53 circulating miRNAs were increased (27) or decreased (26) in CeD versus controls. 8/53 miRNAs differed significantly between controls and samples taken <1 year before TGA positivity: miR-21-3p, miR-374a-5p, 144-3p, miR-486-3p, miR-486-3p let-7d-3p, let-7e-5p and miR-3605-3p. 6/26 downregulated miRNAs reconstituted upon GFD, including miR-150-5p/3p
Felli	2022	13 miRNAs (miR-192-5p, miR-215-5p, miR-125b-5p)	Active CeD, n = 40 GFD, n = 40 Controls, n = 40	Serum	Pediatric	Accurate discrimination of CeD and controls: miR-192-5p (AUC = 0.854), miR-215-5p (AUC = 0.842), miR-125b-5p (AUC = 0.803)
Domsa	2022	miR-192-5p, miR-194-5p, miR-449a and miR-638	Active CeD, n = 15 GFD, n = 33 Controls, n = 10	Blood	Adult	Among miRNAs, the closest to a statistically significant value was miR-194-5p (CeD vs. controls: p = 0.051 and GFD vs. controls: p = 0.067)

Figura 6: miRNA nella CeD [116]

SCOPO DELLO STUDIO

Ad oggi, in letteratura, non sono presenti studi che analizzano l'espressione dei miRNA nei pazienti con celiachia non-responsiva. Questo studio è stato condotto per valutare se esista una diversa espressione dei miRNA in pazienti con NRCD rispetto a pazienti con celiachia responsiva alla GFD. La finalità è quella di individuare biomarkers che possano monitorare l'aderenza alla dieta e che siano in grado di predire la non-risposta alla GFD, permettendo in questo caso di agire tempestivamente con il trattamento.

In primis, lo studio ha come obiettivo l'analisi della diversa espressione di alcuni miRNA in pazienti che rispondono alla GFD rispetto ai pazienti che non rispondono, con lo scopo di identificare possibili biomarkers predittivi della risposta o non- risposta alla GFD. L'obiettivo secondario è valutare come il pattern di espressione di tali miRNA cambi dopo l'adesione alla GFD e il confronto con soggetti di controllo.

I miRNA analizzati, riconosciuti per avere un ruolo nella patogenesi della CeD, nel monitoraggio dell'aderenza alla GFD e nello sviluppo di complicanze, sono: miR-155, miR-200, miR-125, miR-192, miR-21, miR-451, miR-146 e miR-1226 [116],[119],[121],[129],[134].

MATERIALI E METODI

Pazienti

Per questo lavoro di tesi sono stati arruolati, tra novembre 2019 e maggio 2024, pazienti celiaci a dieta senza glutine seguiti presso il centro di celiachia dell'Azienda Ospedale Università Padova. Nello stesso periodo, sono stati inclusi nello studio 10 soggetti sani, reclutati tra lo staff medico e paramedico, utilizzati come gruppo di controllo per l'analisi dei miRNA.

I pazienti sono stati suddivisi in tre diversi gruppi:

- Gruppo 0: Controlli sani;
- Gruppo 1 (CeD- resp): Pazienti con celiachia responsiva alla GFD;
- Gruppo 2 (CeD- nr): Pazienti con celiachia non-responsiva.

I pazienti sono stati arruolati secondo i seguenti criteri di inclusione

- Età 18-80 anni;
- Consenso informato scritto alla partecipazione allo studio;
- Diagnosi accertata di celiachia.

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;
- Patologie autoimmuni

Criteri di esclusione aggiuntivi per lo scopo della tesi:

- Mancata adesione alla dieta priva di glutine (gruppo 1, gruppo 2);
- Sierologia e/o istologia negativa per malattia celiaca (gruppo 1, gruppo 2).

Raccolta dati

I dati anagrafici e le informazioni relative ai sintomi e segni di malattia, sierologia, esito istologico al momento della diagnosi e al follow-up sono stati raccolti attraverso il Registro Celiachia (The paduan CELiac Disease natural HIstory REgistry: a longitudinal, retrospective and prospective study- CelDi-HiRe; codice di approvazione CE 4680/AO/19).

Tutti i pazienti che hanno fornito il proprio consenso informato scritto sono stati sottoposti, prima di procedere agli accertamenti previsti, ad un ulteriore colloquio finalizzato alla raccolta di dati specifici, in modo tale da valutare l'eventuale presenza di patologie autoimmuni, neoplastiche o di altra natura.

La compliance alla dieta è stata valutata tramite il Questionario di Biagi, distinguibile da questionari più complessi in quanto composto da sole quattro domande [135]. Tale questionario può essere somministrato da personale non medico e ha il fine di analizzare le strategie che il paziente mette in atto per evitare l'ingestione di glutine; in base alle risposte si ottiene un risultato numerico che varia da 0 a 4 e permette di classificare i pazienti in tre classi di aderenza alla GFD: non aderenti (punteggio 0-1), aderenti ma con importanti errori nella dieta (punteggio 2) e aderenti (punteggio 3-4).

Estrazione e quantificazione dei miRNA dai prelievi ematici

Tutti i soggetti inclusi nello studio sono stati sottoposti ad un prelievo ematico per la raccolta di un campione di siero, un campione di plasma e un campione di sangue intero; successivamente, nel plasma sono stati analizzati i livelli di miR-155, miR-200, miR-125, miR-192, miR-21, miR-451, miR-146 e miR-1226 sia alla diagnosi che al follow-up.

Per la separazione del siero e del plasma dai campioni ematici raccolti si è proceduto con una prima centrifuga a 3000 giri per minuto (rpm) per 15 minuti e successivamente con una seconda centrifuga a 4000 rpm per 15 minuti per rimuovere eventuali residui cellulari. 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 DNA copia (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

Per questo studio, sono stati arruolati 51 soggetti, tra cui 41 celiaci e 10 controlli sani. Tra i soggetti celiaci, 26 sono risultati responsivi alla GFD (CeD- resp), mentre 15 hanno continuato a presentare sintomi e segni nonostante l'aderenza alla GFD, come persistenza di sintomi classici della celiachia, aumentati livelli di IgA anti-tTG o atrofia dei villi (CeD- nr). Tutti i 41 pazienti celiaci sono stati seguiti nel FU (CeD- FU), in modo da poter fare un confronto di espressione dei miRNA tra pazienti responsivi alla GFD e non- responsivi.

La tabella V descrive la popolazione inclusa.

	CeD-FU	HC
Numero di pazienti, n	41	10
Maschi, n (%)	16 (39%)	4 (40%)
Femmine, n (%)	25 (61%)	6 (60%)
Età al FU \pm DS	41.1 \pm (16.7)	36.5 \pm 11.6 anni
Presentazione clinica al FU		-
Presenza di sintomi n, (%)	15 (36.6%)	
Assenza di sintomi n, (%)	26 (63.4%)	
Aderenza alla GFD:		-
Stretta n, (%)	36 (92.3%)	
Non aderenza n, (%)	0 (0%)	
Possibili contaminazioni n, (%)	3 (7.7%)	

Tabella V: caratteristiche della popolazione studiata: n, numero dei soggetti; Media \pm DS, deviazione standard, compliance stimata con questionario di Biagi.

L'età media della popolazione CeD-FU \pm deviazione standard (DS) è 41.1 \pm 16.7 anni. L'aderenza alla GFD, valutata con questionario di Biagi, è risultata massima in 36 pazienti (94.3%), mentre 3 pazienti hanno probabilmente avuto contaminazioni (7.7%).

Alle visite di FU, 26 pazienti (63.4%) non presentavano più i sintomi associati alla celiachia, risultando così responsivi alla GFD (CeD-resp). Al contrario, 16 pazienti (36.6%) sono stati classificati come non responsivi alla GFD, in quanto continuavano a manifestare sintomi e segni associati alla patologia (CeD- nr).

Le caratteristiche della popolazione CeD-nr sono riassunte nella *Tabella VI*.

	CeD- nr
N di pazienti	15
Maschi, n (%)	7, (47%)
Femmine, n (%)	8, (53%)
Età (\pm DS)	35.9 (\pm 15.4)
Aderenza alla GFD:	
Stretta n, (%)	14, (93.3%)
Non aderenza n, (%)	0, (0%)
Possibili contaminazioni n, (%)	1, (6.7%)

Tabella VI: *descrizione della popolazione CeD- nr; n, numero dei soggetti; Media \pm DS, deviazione standard, compliance stimata con questionario di Biagi.*

La popolazione CeD-nr è composta prevalentemente da pazienti di sesso maschile (53%), con età media di 35.9 ± 15.4 anni, di cui il 93.3% ha dichiarato di avere una stretta aderenza alla GFD.

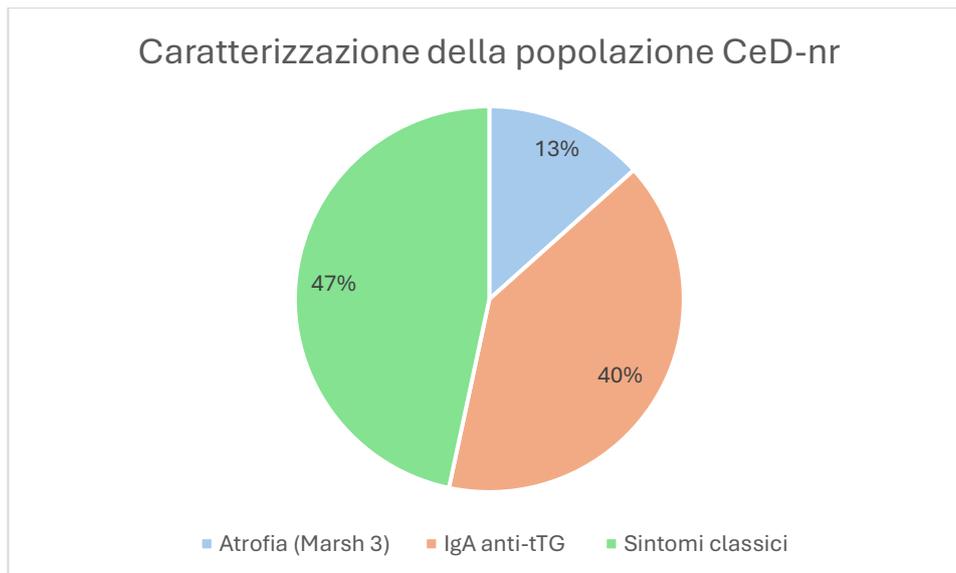


Grafico 1: *classificazione dei sintomi e segni dei pazienti non responders.*

Nel grafico 1 sono rappresentati i pazienti CeD-nr, classificati in base ai segni e sintomi manifestati, nonostante almeno un anno di GFD. Il 13% dei pazienti presentava persistenza di atrofia di grado Marsh 3, il 40% aveva un titolo anticorpale IgA anti-tTG elevato e il 47% dei pazienti manifestava persistenza di sintomi classici gastrointestinali, tra i quali diarrea, dolore e gonfiore addominale, mentre nessun paziente aveva sviluppato complicanze.

Determinazione dei miRNA circolanti

Per valutare se esiste una diversa espressione dei miRNA in pazienti CeD- nr rispetto a pazienti CeD- resp, sono stati confrontati i valori medi \pm DS dei miRNA dei due gruppi (*Tabella VII*).

	CeD- nr (15)	CeD- resp (26)	P
miR-155 (\pm DS)	2.06 (\pm 2.27)	2.11 (\pm 1.34)	0.93
miR-200 (\pm DS)	1.43 (\pm 2.54)	1.43 (\pm 0.93)	0.99
miR-125 (\pm DS)	1.16 (\pm 0.99)	0.93 (\pm 0.68)	0.36
miR-192 (\pm DS)	0.88 (\pm 0.41)	1.15 (\pm 0.43)	0.05*
miR-21 (\pm DS)	1.14 (\pm 0.51)	1.14 (\pm 0.52)	0.99
miR-451 (\pm DS)	0.75 (\pm 0.18)	0.72 (\pm 0.23)	0.75
miR-146 (\pm DS)	2.24 (\pm 1.45)	2.26 (\pm 0.99)	0.96
miR-1226 (\pm DS)	0.97 (\pm 1.32)	3.45 (\pm 6.65)	0.16

Tabella VII: paragone del valore medio dei miRNA analizzati nei pazienti CeD-nr rispetto ai CeD-resp. DS, deviazione standard; P, p value; $p^* = p < 0.05$. CeD-nr: CeD non responsiva, CeD-resp: CeD responsiva alla GFD.

Nel gruppo CeD-nr si sono riscontrati valori minori di miR-192 ($p = 0.05$). È stato dimostrato che miR-192 è down-regolato nei pazienti con anemia e lesioni istologiche severe [134] e, insieme a miR-200, è coinvolto nello sviluppo di RCD e EATL, condizioni in cui è risultato down-regolato [133].

Per quanto riguarda gli altri miRNA, non ci sono differenze di espressione statisticamente significative tra le due popolazioni di celiaci.

Si riportano nel *Grafico 2* i dati relativi ai valori dei miRNA nei pazienti CeD-FU.

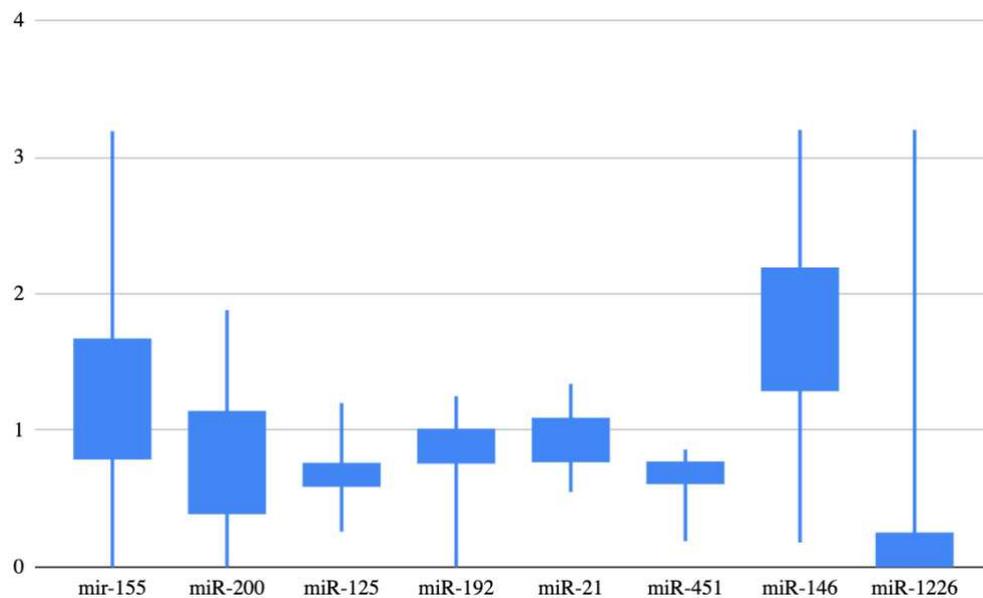


Grafico 2: box-plot dei valori dei miRNA nei pazienti CeD-FU.

Il confronto dei valori medi dei miRNA analizzati nella popolazione CeD-FU, comprensiva sia dei pazienti responsivi che dei non-responsivi, rispetto ai controlli sani (HC) è descritto in *Tabella VIII*.

	CeD-FU (41)	HC (10)	P
miR-155 ± DS	2.09 (± 1.72)	2.09 (± 1.88)	0.99
miR-200 ± DS	1.43 (± 1.67)	1.11 (± 1.07)	0.56
miR-125 ± DS	1.01 (± 0.81)	1.14 (± 0.39)	0.65
miR-192 ± DS	1.05 (± 0.44)	1.06 (± 0.26)	0.97
miR-21 ± DS	1.15 (± 0.50)	1.18 (± 0.33)	0.85
miR-451 ± DS	0.74 (± 0.21)	0.96 (± 0.21)	0.004*
miR-146 ± DS	2.25 (± 1.16)	1.79 (± 1.15)	0.26
miR-1226 ± DS	2.54 (± 5.45)	5.90 (± 8.70)	0.48

Tabella VIII: paragone del valore medio dei miRNA analizzati nei pazienti CeD-FU rispetto alla popolazione HC. DS, deviazione standard; p, p value; p* = p value < 0.05.

Da tale paragone, si evince come miR-451 sia down-regolato nei pazienti celiaci rispetto ai controlli sani (p = 0.004). Inoltre, il valore di miR-146, emerso in

letteratura come marker di malattia, è aumentato nei CeD-FU, pur non raggiungendo valori statisticamente significativi ($p = 0.26$). Per gli altri miRNA non si sono riscontrate differenze significative.

Come ulteriore analisi si è deciso di valutare prospetticamente i miRNA alla diagnosi e al FU. La valutazione dei miRNA è stata effettuata in 10 pazienti arruolati al momento della diagnosi e successivamente nel FU (dopo almeno 6-12 mesi dall'inizio della GFD); il confronto è descritto in *Tabella IX*.

	CeD-T ₀	CeD-T ₁	P
miR-155 ± DS	3.04 (± 3.25)	1.90 (± 0.89)	0.53
miR-200 ± DS	2.98 (± 1.91)	1.20 (± 1.12)	0.12
miR-125 ± DS	3.2 (± 2.76)	0.74 (± 0.33)	0.07
miR-192 ± DS	2.78 (± 3.60)	0.95 (± 0.29)	0.26
miR-21 ± DS	1.43 (± 0.31)	0.98 (± 0.32)	0.03*
miR-451 ± DS	0.95 (± 0.34)	0.77 (± 0.21)	0.34
miR-146 ± DS	2.19 (± 1.26)	1.99 (± 1.88)	0.85
miR-1226 ± DS	9.85 (± 10.41)	2.74 (± 4.30)	0.10

Tabella IX: valutazione prospettica dei miRNA alla diagnosi (CeD-T₀) e al FU (CeD-T₁). DS, deviazione standard; p, p value; p*, p value < 0.05.

L'espressione di miR-21 è risultata significativamente superiore alla diagnosi rispetto al FU ($p = 0.03$); in aggiunta, si è visto che miR-125 è up-regolato alla diagnosi, seppur non raggiungendo significatività statistica ($p = 0.07$).

Inoltre, i miRNA miR-155, miR-200, miR-146 e miR-1226 sono aumentati nel gruppo CeD-T₀.

DISCUSSIONE

La CeD è una condizione immuno-mediata multifattoriale scatenata dall'ingestione di glutine, che coinvolge soggetti geneticamente predisposti. Solitamente, la CeD è caratterizzata da una buona prognosi e da un'ottima risposta alla GFD; tuttavia, in un limitato numero di pazienti, la mancata risposta alla GFD può comportare persistenza dei sintomi e sviluppo di complicanze severe.

Studi precedenti hanno dimostrato una down-regolazione dei miRNA 192/215 in pazienti con CeD attiva nonostante la GFD [136]. Inoltre, si è visto che, in complicanze come la RCDII e l'EATL, i miRNA miR-200 e miR-192/215 sono progressivamente down-regolati, fino a scomparire, soprattutto nella RCDII [129]. In aggiunta, lo studio condotto da Felli et al. [119] ha dimostrato la deregolazione di miR-192, miR-215 e miR-125 alla diagnosi; i livelli di tali miRNA vengono successivamente ripristinati grazie all'adesione alla GFD. Tale studio ha evidenziato come la misurazione combinata di questi tre miRNA permetta di discriminare con adeguata sensibilità e specificità i pazienti celiaci che seguono una stretta dieta aglutinata, consentendo di monitorare l'aderenza alla GFD in modo innovativo [119]. Altri studi hanno mostrato una down-regolazione di miR-192-3p e miR192-5p, rispettivamente nei pazienti celiaci con anemia e con lesioni istologiche severe; dopo l'inizio della GFD, i valori di 192-3p e miR192-5p e le condizioni della mucosa duodenale si normalizzano [134], mentre altri hanno dimostrato che, insieme a miR-200, è coinvolto nello sviluppo di RCD e EATL, condizioni in cui miR-192 è down-regolato [133].

Nel nostro studio, sono stati riscontrati nel gruppo CeD-nr valori minori di miR-192 ($p = 0.05$). Il riscontro della down-regolazione di miR-192 nei pazienti CeD-nr è in accordo con i dati trovati in letteratura, secondo cui questo miRNA è down-regolato nei pazienti con anemia e lesioni istologiche severe [134]. Nel gruppo CeD-nr da noi esaminato, infatti, sono presenti pazienti con persistenza di atrofia del piccolo intestino e con anemia microcitica.

Un altro studio ha dimostrato che miR-1226 promuove la tumorigenesi in diversi tipi di cancro, come il cancro del colon-retto e il cistoadenoma sieroso dell'ovaio. Questo miRNA risulta essere up-regolato selettivamente nei pazienti con RCDII [129]. L'analisi dei miRNA effettuata nel nostro studio, al contrario, ha riscontrato

nel gruppo CeD-nr una down-regolazione di miR-1226, che potrebbe indicare che la persistenza dei sintomi non correli necessariamente con lo sviluppo di complicanze severe della CeD.

È stato inoltre dimostrato che i miRNA miR-155, miR-146, miR-125 e miR-21 sono correlati con l'infiammazione e la risposta immunitaria [121] e risultano up-regolati nei celiaci. I loro livelli non si normalizzano durante la GFD, suggerendo che l'assunzione di glutine non comporti differenze rilevanti nella loro espressione.

Nel nostro studio, al contrario di ciò che ci si aspettava, i valori di miR-155, miR-146, miR-125 e miR-21 sono risultati sovrapponibili nei gruppi di pazienti CeD-nr e CeD-resp. Di conseguenza, non si è identificato un pattern peculiare di espressione dei miRNA infiammatori che spieghi la persistenza dei sintomi nel gruppo CeD-nr. È verosimile che il mancato riscontro di differenze tra i gruppi CeD-nr e CeD-resp, per quanto riguarda i miRNA correlati con l'infiammazione, sia dovuto alla limitata numerosità del campione in esame e all'assenza, nel gruppo CeD-nr, di pazienti complicati. Un'altra interpretazione di questi risultati potrebbe essere la mancanza di un vero e proprio pattern di espressione specifica dei miRNA nel gruppo CeD-nr, probabilmente dovuto al fatto che, nella NRCD, la persistenza dei sintomi è dovuta ad eziologie diverse, che spaziano dall'assunzione continuativa e involontaria di glutine a patologie concomitanti quali l'IBS, la SIBO e altre [5].

Dal momento che nei pazienti CeD-nr la causa principale della persistenza dei sintomi e segni è l'ingestione di glutine occulta e continuativa [5], in questi pazienti potrebbe essere vantaggioso analizzare i miRNA che hanno dimostrato utilità nel monitoraggio dell'aderenza alla GFD (miR-192, miR-215, miR-125). In aggiunta, sarebbe interessante implementare la misurazione dei miRNA urinari per monitorare l'aderenza. Va ricordato che, nei pazienti con NRCD, oltre alla rivalutazione dell'aderenza alla dieta, è necessario escludere la presenza di patologie concomitanti che potrebbero spiegare la persistenza dei sintomi.

Per gli altri miRNA analizzati non si è riscontrata differenza significativa tra le due popolazioni CeD-nr e CeD-resp.

Come analisi secondaria, è stato fatto un confronto tra i pazienti CeD-FU e gli HC, con lo scopo di verificare se vi fossero delle differenze significative nell'espressione dei miRNA tra i due gruppi. Nei pazienti celiaci è stata riscontrata

la down-regolazione di miR-451 ($p = 0.004$). Studi preliminari hanno dimostrato che alla down-regolazione di miR-451 è collegata una minore attività di enzimi come glutatione-perossidasi e catalasi, a cui consegue un maggiore stress ossidativo [116]. Infatti, in accordo con tali evidenze, nei pazienti celiaci è stato riscontrato un aumento dello stress ossidativo, determinato dall'esposizione al glutine e implicato nella fisiopatologia della CeD [131]. Altri studi hanno evidenziato che miR-451 è down-regolato in diversi tipi di cancro, ad esempio nei tumori della via digestiva (esofago, gastrico, colon-retto), nel carcinoma epato-cellulare, nel carcinoma polmonare e molti altri. In questi studi è stato dimostrato il ruolo di miR-451 come oncosoppressore; la sua down-regolazione è correlata a un fenotipo tumorale più aggressivo e per questo è in discussione il suo utilizzo come biomarker diagnostico e prognostico in alcuni tipi di cancro [137].

Dalla nostra analisi è risultato che, in accordo con la letteratura, miR-451 è down-regolato in maniera statisticamente significativa nei pazienti CeD-FU ($p = 0.004$). Inoltre, il valore di miR-146, emerso in letteratura come marker di malattia e di infiammazione, è aumentato nel gruppo CeD-FU, pur non raggiungendo valori statisticamente significativi ($p = 0.26$).

Per gli altri miRNA non si sono riscontrate differenze significative tra pazienti celiaci e controlli. Probabilmente, dal momento che i pazienti celiaci analizzati seguono la GFD, i pattern di espressione dei miRNA analizzati sono tornati simili a quelli dei controlli sani.

Come ulteriore analisi prospettica, sono stati confrontati i valori medi dei miRNA in pazienti celiaci arruolati alla diagnosi e al successivo FU. L'espressione di miR-21 è risultata superiore alla diagnosi rispetto al FU ($p = 0.03$). Secondo alcune evidenze presenti in letteratura, i valori di miR-21 sono up-regolati alla diagnosi e l'inizio della GFD sembra non influire sulla sua espressione, per cui secondo tali studi il miR-21 non è un buon candidato come biomarker nel monitoraggio dell'aderenza alla dieta [121]. Tuttavia, miR-21 è un forte marker di infiammazione, perciò la diminuzione dei livelli di quest'ultimo, riscontrata nei CeD-FU del nostro studio, potrebbe correlare con la diminuzione dell'infiammazione che avviene nei pazienti celiaci dopo l'introduzione della GFD. MiR-21, inoltre, è definibile come un onco-miRNA [138], poiché controlla il ciclo

cellulare e la tumorigenesi. I suoi livelli sono significativamente maggiori in pazienti con alcuni tipi di tumore rispetto agli HC, e recenti studi hanno dimostrato il suo ruolo come onco-miRNA nel carcinoma epatocellulare [138]. Alcuni studi, inoltre, hanno dimostrato che i livelli di miR-21 sono già elevati più di due anni prima della positività degli anticorpi anti-tTG e della diagnosi di CeD; tali osservazioni sollevano la questione se questo miRNA sia correlato allo sviluppo della CeD o se rifletta piuttosto differenze intrinseche tra i celiaci e i controlli, indipendenti dall'infiammazione e dal danno intestinale. Se così fosse, sarebbe possibile predire quali individui sono a maggior rischio di sviluppare la CeD e quelli che non la svilupperanno [114].

Inoltre, dal nostro studio è emersa un'up-regolazione di miR-125 alla diagnosi ($p = 0.07$) che diminuisce al successivo FU. MiR-125 è correlato con l'infiammazione, e tale esito potrebbe indicare che, dopo l'adesione alla GFD, lo stato infiammatorio tipico dei pazienti con CeD diminuisce.

Infine, dall'analisi è emerso che miR-1226 è up-regolato alla diagnosi, seppur in modo non statisticamente significativo ($p = 0.1$), e diminuisce durante la GFD; in letteratura miR-1226 risulta essere up-regolato selettivamente nei pazienti con RCDII e promuove la tumorigenesi in diversi tipi di cancro, come il cancro del colon-retto e il cistoadenoma sieroso dell'ovaio [129]. La sua diminuzione potrebbe denotare che una buona e costante aderenza alla GFD permette una diminuzione del rischio di incorrere in complicanze.

CONCLUSIONI

Negli ultimi anni sta emergendo sempre più il ruolo dei miRNA come biomarkers innovativi e poco invasivi in diverse patologie, tra cui la CeD. Diversi studi in letteratura hanno dimostrato come i miRNA influenzino non solo la patogenesi della CeD, ma anche il decorso della patologia.

In questo studio, che ha analizzato l'espressione dei miRNA in diversi gruppi di pazienti, è stato evidenziato un pattern di espressione differente in pazienti CeD-FU rispetto ai HC, e in pazienti CeD-T₀ e CeD-T₁. In particolare, è stato evidenziato che miR-451, miRNA che regola l'omeostasi ossidativa, è down-regolato nei pazienti CeD-FU rispetto ai controlli sani, favorendo nei pazienti celiaci un aumento dello stress ossidativo. Inoltre, nei pazienti CeD-T₀, dopo l'adesione alla GFD, si è verificata una diminuzione del livello di miR-21, forte marker di infiammazione, di miR-125 e di miR-1226, miRNA correlato con le complicanze della CeD e con la tumorigenesi.

Il confronto tra pazienti CeD-resp e CeD-nr, al contrario di ciò che ci si aspettava, non ha evidenziato particolari differenze dei miRNA infiammatori nei pazienti sintomatici. L'unica differenza che si è riscontrata nei pazienti CeD-nr è la down-regolazione di miR-192, miRNA noto in letteratura per essere down-regolato in pazienti celiaci con anemia e con lesioni istologiche severe, presenti nella popolazione CeD-nr da noi esaminata. Inoltre, insieme a miR-200, miR-192 è coinvolto nello sviluppo di RCD e EATL, che però non sono state riscontrate nei nostri pazienti.

È probabile che la bassa numerosità del gruppo in esame e la mancanza di pazienti complicati abbia impedito di riscontrare differenze significative dei miRNA correlati con l'infiammazione tra i gruppi CeD-nr e CeD-resp. Inoltre, è verosimile che i miRNA analizzati non siano marker ottimali nei pazienti CeD-nr che presentano quadri clinici lievi; tuttavia, non è da escludere una loro utilità nello studio di pazienti non-responders complicati.

È probabile che, ampliando la coorte di pazienti CeD-nr dal punto di vista numerico e dal punto di vista della gravità del quadro clinico, possano riscontrarsi disregolazioni nell'espressione dei miRNA.

Purtroppo, in letteratura ci sono ancora pochissimi dati che valutano l'espressione dei miRNA tra i pazienti CeD-resp e CeD-nr. Per tale motivo, saranno necessari ulteriori studi che mirano, in primis, ad ampliare il numero di pazienti, in particolare per quanto riguarda quei pazienti che non rispondono correttamente alla GFD e/o sviluppano complicanze. Analisi ulteriori dovranno essere prese in considerazione, sia per quanto riguarda la specificità e la sensibilità dei miRNA che per quanto riguarda il monitoraggio nel FU e l'adesione corretta alla GFD.

BIBLIOGRAFIA

1. Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A, Green PHR, Hadjivassiliou M, Kaukinen K, Kelly CP, Leonard JN, Lundin KEA, Murray JA, Sanders DS, Walker MM, Zingone F, Ciacci C. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut*. gennaio 2013;62(1):43–52.
2. Rauhavirta T, Hietikko M, Salmi T, Lindfors K. Transglutaminase 2 and Transglutaminase 2 Autoantibodies in Celiac Disease: a Review. *Clin Rev Allergy Immunol*. agosto 2019;57(1):23–38.
3. Kagnoff MF. Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *J Clin Invest*. gennaio 2007;117(1):41–9.
4. Jafari E, Soleymani N, Hamidi M, Rahi A, Rezaei A, Azizian R. Celiac Disease: A Review from Genetic to Treatment. *Iran Biomed J*. gennaio 2024;28(1):8–14.
5. Caio G, Volta U, Sapone A, Leffler DA, De Giorgio R, Catassi C, Fasano A. Celiac disease: a comprehensive current review. *BMC Med*. 23 luglio 2019;17(1):142.
6. Al-Toma A, Volta U, Auricchio R, Castillejo G, Sanders DS, Cellier C, Mulder CJ, Lundin KEA. European Society for the Study of Coeliac Disease (ESsCD) guideline for coeliac disease and other gluten-related disorders. *United Eur Gastroenterol J*. giugno 2019;7(5):583–613.
7. Leffler DA, Dennis M, Hyett B, Kelly E, Schuppan D, Kelly CP. Etiologies and predictors of diagnosis in nonresponsive celiac disease. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc*. aprile 2007;5(4):445–50.
8. Laurikka P, Kivelä L, Kurppa K, Kaukinen K. Review article: Systemic consequences of coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther*. luglio 2022;56 Suppl 1(Suppl 1):S64–72.
9. Iversen R, Sollid LM. The Immunobiology and Pathogenesis of Celiac Disease. *Annu Rev Pathol*. 24 gennaio 2023;18:47–70.
10. Losowsky MS. A history of coeliac disease. *Dig Dis Basel Switz*. 2008;26(2):112–20.
11. Burki TK. Samuel Gee: the modern era for coeliac disease. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. febbraio 2019;4(2):100.
12. Pinto-Sanchez MI, Silvester JA, Lebwohl B, Leffler DA, Anderson RP, Therrien A, Kelly CP, Verdu EF. Society for the Study of Celiac Disease position statement on gaps and opportunities in coeliac disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. dicembre 2021;18(12):875–84.

13. 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.* gennaio 1953;42(1):34–42.
14. Makharia GK, Singh P, Catassi C, Sanders DS, Leffler D, Ali RAR, Bai JC. The global burden of coeliac disease: opportunities and challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* maggio 2022;19(5):313–27.
15. Popp A, Mäki M. Changing Pattern of Childhood Celiac Disease Epidemiology: Contributing Factors. *Front Pediatr.* 2019;7:357.
16. Mustalahti K, Catassi C, Reunanen A, Fabiani E, Heier M, McMillan S, Murray L, Metzger MH, Gasparin M, Bravi E, Mäki M, Coeliac EU Cluster, Project Epidemiology. The prevalence of celiac disease in Europe: results of a centralized, international mass screening project. *Ann Med.* dicembre 2010;42(8):587–95.
17. Catassi C, Verdu EF, Bai JC, Lionetti E. Coeliac disease. *Lancet Lond Engl.* 25 giugno 2022;399(10344):2413–26.
18. Singh P, Arora A, Strand TA, Leffler DA, Catassi C, Green PH, Kelly CP, Ahuja V, Makharia GK. Global Prevalence of Celiac Disease: Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc.* giugno 2018;16(6):823-836.e2.
19. Kujawowicz K, Mirończuk-Chodakowska I, Witkowska AM. Dietary Behavior and Risk of Orthorexia in Women with Celiac Disease. *Nutrients.* 21 febbraio 2022;14(4):904.
20. Ciacci C, Cirillo M, Sollazzo R, Savino G, Sabbatini F, Mazzacca G. Gender and clinical presentation in adult celiac disease. *Scand J Gastroenterol.* novembre 1995;30(11):1077–81.
21. Lima RF, Maria da Silva Kotze L, Kotze LR, Chrisostomo KR, Nisihara R. Gender-Related Differences in Celiac Patients at Diagnosis. *Arch Med Res.* ottobre 2019;50(7):437–41.
22. 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.* gennaio 2018;63(1):184–92.
23. Dixit R, Lebwohl B, Ludvigsson JF, Lewis SK, Rizkalla-Reilly N, Green PHR. Celiac disease is diagnosed less frequently in young adult males. *Dig Dis Sci.* luglio 2014;59(7):1509–12.
24. Conrad N, Misra S, Verbakel JY, Verbeke G, Molenberghs G, Taylor PN, Mason J, Sattar N, McMurray JJV, McInnes IB, Khunti K, Cambridge G. Incidence, prevalence, and co-occurrence of autoimmune disorders over time and by age, sex, and socioeconomic status: a population-based cohort study of 22 million individuals in the UK. *Lancet Lond Engl.* 3 giugno 2023;401(10391):1878–90.

25. Catassi C, Räscher IM, Fabiani E, Rossini M, Bordicchia F, Candela F, Coppa GV, Giorgi PL. Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg. *Lancet Lond Engl.* 22 gennaio 1994;343(8891):200–3.
26. Rubio-Tapia A, Kyle RA, Kaplan EL, Johnson DR, Page W, Erdtmann F, Brantner TL, Kim WR, Phelps TK, Lahr BD, Zinsmeister AR, Melton LJ, Murray JA. Increased prevalence and mortality in undiagnosed celiac disease. *Gastroenterology.* luglio 2009;137(1):88–93.
27. Tonutti E, Bizzaro N. Diagnosis and classification of celiac disease and gluten sensitivity. *Autoimmun Rev.* 2014;13(4–5):472–6.
28. Greco L, Romino R, Coto I, Di Cosmo N, Percopo S, Maglio M, Paparo F, Gasperi V, Limongelli MG, Cotichini R, D'Agate C, Tinto N, Sacchetti L, Tosi R, Stazi MA. The first large population based twin study of coeliac disease. *Gut.* maggio 2002;50(5):624–8.
29. Kuja-Halkola R, Lebowitz B, Halfvarson J, Wijmenga C, Magnusson PKE, Ludvigsson JF. Heritability of non-HLA genetics in coeliac disease: a population-based study in 107 000 twins. *Gut.* novembre 2016;65(11):1793–8.
30. Espino L, Núñez C. The HLA complex and coeliac disease. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2021;358:47–83.
31. 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.* 7 gennaio 2023;24(2):1188.
32. Byrne G, Feighery CF. Celiac Disease: Diagnosis. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2015;1326:15–22.
33. Turner GD, Dunne MR, Ryan AW. Celiac Disease: Background and Historical Context. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2015;1326:3–14.
34. 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 Off J Ital Soc Gastroenterol Ital Assoc Study Liver.* ottobre 2022;54(10):1304–19.
35. Lammers KM, Lu R, Brownley J, Lu B, Gerard C, Thomas K, Rallabhandi P, Shea-Donohue T, Tamiz A, Alkan S, Netzel-Arnett S, Antalis T, Vogel SN, Fasano A. Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3. *Gastroenterology.* luglio 2008;135(1):194–204.e3.
36. Herrera MG, Amundarain MJ, Dörfler PW, Dodero VI. The Celiac-Disease Superantigen Oligomerizes and Increases Permeability in an Enterocyte Cell Model. *Angew Chem Int Ed Engl.* 21 maggio 2024;63(21):e202317552.
37. Lebowitz B, Green PHR, Murray JA, Ludvigsson JF. Season of birth in a

nationwide cohort of coeliac disease patients. *Arch Dis Child*. gennaio 2013;98(1):48–51.

38. Andrén Aronsson C, Agardh D. Intervention strategies in early childhood to prevent celiac disease—a mini-review. *Front Immunol*. 2023;14:1106564.

39. Barone MV, Auricchio S. A Cumulative Effect of Food and Viruses to Trigger Celiac Disease (CD): A Commentary on the Recent Literature. *Int J Mol Sci*. 18 febbraio 2021;22(4):2027.

40. Auricchio R, Calabrese I, Galatola M, Cielo D, Carbone F, Mancuso M, Matarese G, Troncone R, Auricchio S, Greco L. Gluten consumption and inflammation affect the development of celiac disease in at-risk children. *Sci Rep*. 30 marzo 2022;12(1):5396.

41. Pinto-Sánchez MI, Verdu EF, Liu E, Bercik P, Green PH, Murray JA, Guandalini S, Moayyedi P. Gluten Introduction to Infant Feeding and Risk of Celiac Disease: Systematic Review and Meta-Analysis. *J Pediatr*. gennaio 2016;168:132-143.e3.

42. Kempainen KM, Lynch KF, Liu E, Lönnrot M, Simell V, Briese T, Koletzko S, Hagopian W, Rewers M, She JX, Simell O, Toppari J, Ziegler AG, Akolkar B, Krischer JP, Lernmark Å, Hyöty H, Triplett EW, Agardh D, TEDDY Study Group. Factors That Increase Risk of Celiac Disease Autoimmunity After a Gastrointestinal Infection in Early Life. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc*. maggio 2017;15(5):694-702.e5.

43. Mårild K, Kahrs CR, Tapia G, Stene LC, Størdal K. Infections and risk of celiac disease in childhood: a prospective nationwide cohort study. *Am J Gastroenterol*. ottobre 2015;110(10):1475–84.

44. Caminero A, Verdu EF. Celiac disease: should we care about microbes? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 1 agosto 2019;317(2):G161–70.

45. Kahrs CR, Chuda K, Tapia G, Stene LC, Mårild K, Rasmussen T, Rønningen KS, Lundin KEA, Kramna L, Cinek O, Størdal K. Enterovirus as trigger of coeliac disease: nested case-control study within prospective birth cohort. *BMJ*. 13 febbraio 2019;364:l231.

46. Giorgi A, Cerrone R, Capobianco D, Filardo S, Mancini P, Zanni F, Fanelli S, Mastromarino P, Mosca L. A Probiotic Preparation Hydrolyzes Gliadin and Protects Intestinal Cells from the Toxicity of Pro-Inflammatory Peptides. *Nutrients*. 14 febbraio 2020;12(2):495.

47. Sjöberg V, Sandström O, Hedberg M, Hammarström S, Hernell O, Hammarström ML. Intestinal T-cell responses in celiac disease - impact of celiac disease associated bacteria. *PLoS One*. 2013;8(1):e53414.

48. 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;18(3):e0282739.

49. 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*. 2022;9:1054089.

50. Lebowohl B, Rubio-Tapia A. Epidemiology, Presentation, and Diagnosis of Celiac Disease. *Gastroenterology*. gennaio 2021;160(1):63–75.

51. 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*. aprile 2018;16(2):288–92.

52. 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*. 4 gennaio 2023;23(1):8.

53. Mauro A, Casini F, Talenti A, Di Mari C, Benincaso AR, Di Nardo G, Bernardo L. Celiac crisis as the life-threatening onset of celiac disease in children: a case report. *Front Pediatr*. 2023;11:1163765.

54. Guarino M, Gambuti E, Alfano F, Strada A, Ciccocioppo R, Lungaro L, Zoli G, Volta U, De Giorgio R, Caio G. Life-threatening onset of coeliac disease: a case report and literature review. *BMJ Open Gastroenterol*. maggio 2020;7(1):e000406.

55. 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*. 6 febbraio 2019;7(3):311–9.

56. Therrien A, Kelly CP, Silvester JA. Celiac Disease: Extraintestinal Manifestations and Associated Conditions. *J Clin Gastroenterol*. gennaio 2020;54(1):8–21.

57. Talarico V, Giancotti L, Mazza GA, Miniero R, Bertini M. Iron Deficiency Anemia in Celiac Disease. *Nutrients*. 17 maggio 2021;13(5):1695.

58. 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*. 26 settembre 2022;12(10):1582.

59. Leffler DA, Green PHR, Fasano A. Extraintestinal manifestations of coeliac disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. ottobre 2015;12(10):561–71.

60. Montoro-Huguet MA, Santolaria-Piedrafita S, Cañamares-Orbis P, García-Erce JA. Iron Deficiency in Celiac Disease: Prevalence, Health Impact, and Clinical Management. *Nutrients*. 28 settembre 2021;13(10):3437.

61. Kamycheva E, Goto T, Camargo CA. Celiac disease is associated with reduced bone mineral density and increased FRAX scores in the US National Health and Nutrition Examination Survey. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA*. marzo 2017;28(3):781–90.
62. 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*. 22 febbraio 2023;15(5):1089.
63. Alkhiari R. Psychiatric and Neurological Manifestations of Celiac Disease in Adults. *Cureus*. marzo 2023;15(3):e35712.
64. Giuffrè M, Gazzin S, Zoratti C, Llido JP, Lanza G, Tiribelli C, Moretti R. Celiac Disease and Neurological Manifestations: From Gluten to Neuroinflammation. *Int J Mol Sci*. 8 dicembre 2022;23(24):15564.
65. Singh P, Singh AD, Ahuja V, Makharia GK. Who to screen and how to screen for celiac disease. *World J Gastroenterol*. 28 agosto 2022;28(32):4493–507.
66. 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 N Y N 1989*. aprile 2021;85(4):e13334.
67. 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 N Y N 1989*. aprile 2021;85(4):e13334.
68. Tata LJ, Card TR, Logan RFA, Hubbard RB, Smith CJP, West J. Fertility and pregnancy-related events in women with celiac disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology*. aprile 2005;128(4):849–55.
69. Dhalwani NN, West J, Sultan AA, Ban L, Tata LJ. Women with celiac disease present with fertility problems no more often than women in the general population. *Gastroenterology*. dicembre 2014;147(6):1267-1274.e1; quiz e13-14.
70. Laurikka P, Nurminen S, Kivelä L, Kurppa K. Extraintestinal Manifestations of Celiac Disease: Early Detection for Better Long-Term Outcomes. *Nutrients*. 3 agosto 2018;10(8):1015.
71. Reunala TL. Dermatitis herpetiformis. *Clin Dermatol*. 2001;19(6):728–36.
72. Popp A, Mäki M. Gluten-Induced Extra-Intestinal Manifestations in Potential Celiac Disease-Celiac Trait. *Nutrients*. 1 febbraio 2019;11(2):320.
73. Sárdy M, Kárpáti S, Merkl B, Paulsson M, Smyth N. Epidermal transglutaminase (TGase 3) is the autoantigen of dermatitis herpetiformis. *J Exp Med*. 18 marzo 2002;195(6):747–57.
74. Volta U, Caio G, Stanghellini V, De Giorgio R. The changing clinical profile of celiac disease: a 15-year experience (1998-2012) in an Italian referral

center. *BMC Gastroenterol.* 18 novembre 2014;14:194.

75. Rostami Nejad M, Hogg-Kollars S, Ishaq S, Rostami K. Subclinical celiac disease and gluten sensitivity. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* 2011;4(3):102–8.

76. Volta U, Caio G, Giancola F, Rhoden KJ, Ruggeri E, Boschetti E, Stanghellini V, De Giorgio R. Features and Progression of Potential Celiac Disease in Adults. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc.* maggio 2016;14(5):686-693.e1.

77. Mandile R, Discepolo V, Scapaticci S, Del Vecchio MR, Maglio MA, Greco L, Troncone R, Auricchio R. The Effect of Gluten-free Diet on Clinical Symptoms and the Intestinal Mucosa of Patients With Potential Celiac Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* aprile 2018;66(4):654–6.

78. Al-toma A, Verbeek WHM, Mulder CJJ. The management of complicated celiac disease. *Dig Dis Basel Switz.* 2007;25(3):230–6.

79. Demiroren K. Possible relationship between refractory celiac disease and malignancies. *World J Clin Oncol.* 24 marzo 2022;13(3):200–8.

80. Rajagopal A, Thompson CA, Chorzempa AK, Ryu AJ. Advanced enteropathy-associated T cell lymphoma (EATL) presenting with severe malabsorption and concomitantly diagnosed coeliac disease (CD). *BMJ Case Rep.* 23 dicembre 2023;16(12):e258265.

81. Accomando S, Rita Piazza I, Cacciatore F, Notarbartolo V, Corsello G, Giuffrè M. New and old criteria for diagnosing celiac disease: do they really differ? A retrospective observational study. *Ital J Pediatr.* 1 aprile 2024;50(1):59.

82. Rubio-Tapia A, Hill ID, Semrad C, Kelly CP, Greer KB, Limketkai BN, Lebowl B. American College of Gastroenterology Guidelines Update: Diagnosis and Management of Celiac Disease. *Am J Gastroenterol.* 1 gennaio 2023;118(1):59–76.

83. Sheppard AL, Elwenspoek MMC, Scott LJ, Corfield V, Everitt H, Gillett PM, Hay AD, Jones HE, Mallett S, Watson J, Whiting PF. Systematic review with meta-analysis: the accuracy of serological tests to support the diagnosis of coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther.* marzo 2022;55(5):514–27.

84. Schiapatti A, Sanders DS, Baiardi P, Caio G, Ciacci C, Kaukinen K, Lebowl 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.* novembre 2022;71(11):2218–25.

85. 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 Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc.*

febbraio 2008;6(2):186–93; quiz 125.

86. Lebowhl B, Kapel RC, Neugut AI, Green PHR, Genta RM. Adherence to biopsy guidelines increases celiac disease diagnosis. *Gastrointest Endosc.* luglio 2011;74(1):103–9.

87. 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.* settembre 2020;112(3):186–96.

88. Owen DR, Owen DA. Celiac Disease and Other Causes of Duodenitis. *Arch Pathol Lab Med.* gennaio 2018;142(1):35–43.

89. 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.* febbraio 2022;114(1):22–31.

90. 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.* 9 luglio 2022;11(4):351–9.

91. Melini V, Melini F. Gluten-Free Diet: Gaps and Needs for a Healthier Diet. *Nutrients.* 15 gennaio 2019;11(1):170.

92. Bascuñán KA, Vespa MC, Araya M. Celiac disease: understanding the gluten-free diet. *Eur J Nutr.* marzo 2017;56(2):449–59.

93. 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.* agosto 2023;77(8):784–93.

94. Chaudhry NA, Jacobs C, Green PHR, Rampertab SD. All Things Gluten: A Review. *Gastroenterol Clin North Am.* marzo 2021;50(1):29–40.

95. Perez-Junkera G, Ruiz de Azua L, Vázquez-Polo M, Lasa A, Fernandez Gil MP, Txurruka I, Navarro V, Larretxi I. Global Approach to Follow-Up of Celiac Disease. *Foods Basel Switz.* 8 maggio 2024;13(10):1449.

96. 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.* ottobre 2019;14(10):957–68.

97. Singh RS, Singh A, Batra G, Kaur H, Medhi B. Novel targets for drug discovery in celiac disease. *Indian J Pharmacol.* 2019;51(5):359–65.

98. Skoracka K, Hryhorowicz S, Tovoli F, Raiteri A, Rychter AM, Słomski R, Dobrowolska A, Granito A, Krela-Kaźmierczak I. From an understanding of

etiopathogenesis to novel therapies-what is new in the treatment of celiac disease? *Front Pharmacol.* 2024;15:1378172.

99. Dieckman T, Koning F, Bouma G. Celiac disease: New therapies on the horizon. *Curr Opin Pharmacol.* ottobre 2022;66:102268.

100. Husby S, Bai JC. Follow-up of Celiac Disease. *Gastroenterol Clin North Am.* marzo 2019;48(1):127–36.

101. Itzlinger A, Branchi F, Elli L, Schumann M. Gluten-Free Diet in Celiac Disease-Forever and for All? *Nutrients.* 18 novembre 2018;10(11):1796.

102. 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.* 7 gennaio 2022;28(1):154–75.

103. Penny HA, Baggus EMR, Rej A, Snowden JA, Sanders DS. Non-Responsive Coeliac Disease: A Comprehensive Review from the NHS England National Centre for Refractory Coeliac Disease. *Nutrients.* 14 gennaio 2020;12(1):216.

104. Baggus EMR, Hadjivassiliou M, Cross S, Penny H, Urwin H, Watson S, Woodward JM, Sanders DS. How to manage adult coeliac disease: perspective from the NHS England Rare Diseases Collaborative Network for Non-Responsive and Refractory Coeliac Disease. *Frontline Gastroenterol.* 2020;11(3):235–42.

105. Stasi E, Marafini I, Caruso R, Soderino F, Angelucci E, Del Vecchio Blanco G, Paoluzi OA, Calabrese E, Sedda S, Zorzi F, Pallone F, Monteleone G. Frequency and Cause of Persistent Symptoms in Celiac Disease Patients on a Long-term Gluten-free Diet. *J Clin Gastroenterol.* marzo 2016;50(3):239–43.

106. Malamut G, Soderquist CR, Bhagat G, Cerf-Bensussan N. Advances in Nonresponsive and Refractory Celiac Disease. *Gastroenterology.* 29 marzo 2024;S0016-5085(24)00360-3.

107. Galli G, Carabotti M, Piloizzi E, Lahner E, Annibale B, Conti L. Relationship between Persistent Gastrointestinal Symptoms and Duodenal Histological Findings after Adequate Gluten-Free Diet: A Gray Area of Celiac Disease Management in Adult Patients. *Nutrients.* 12 febbraio 2021;13(2):600.

108. Simón E, Molero-Luis M, Fueyo-Díaz R, Costas-Batlle C, Crespo-Escobar P, Montoro-Huguet MA. The Gluten-Free Diet for Celiac Disease: Critical Insights to Better Understand Clinical Outcomes. *Nutrients.* 16 settembre 2023;15(18):4013.

109. Veeraraghavan G, Therrien A, Degroote M, McKeown A, Mitchell PD, Silvester JA, Leffler DA, Leichtner AM, Kelly CP, Weir DC. Non-responsive celiac disease in children on a gluten free diet. *World J Gastroenterol.* 7 aprile 2021;27(13):1311–20.

110. Dochat C, Afari N, Satherley RM, Coburn S, McBeth JF. Celiac disease symptom profiles and their relationship to gluten-free diet adherence, mental health, and quality of life. *BMC Gastroenterol.* 2 gennaio 2024;24(1):9.
111. Paolini A, Sarshar M, Felli C, Bruno SP, Rostami-Nejad M, Ferretti F, Masotti A, Baldassarre A. Biomarkers to Monitor Adherence to Gluten-Free Diet by Celiac Disease Patients: Gluten Immunogenic Peptides and Urinary miRNAs. *Foods Basel Switz.* 10 maggio 2022;11(10):1380.
112. Leonard MM, Cureton P, Fasano A. Indications and Use of the Gluten Contamination Elimination Diet for Patients with Non-Responsive Celiac Disease. *Nutrients.* 18 ottobre 2017;9(10):1129.
113. Lusetti F, Schiepatti A, Scalvini D, Maimaris S, Biagi F. Efficacy of a Low-FODMAP Diet for Coeliac Patients with Persistent IBS-like Symptoms despite a Gluten-Free Diet: A Systematic Review. *Nutrients.* 8 aprile 2024;16(7):1094.
114. Tan IL, Barisani D, Panceri R, Modderman R, Visschedijk M, Weersma RK, Wijmenga C, Jonkers I, Coutinho de Almeida R, Withoff S. A Combined mRNA- and miRNA-Sequencing Approach Reveals miRNAs as Potential Regulators of the Small Intestinal Transcriptome in Celiac Disease. *Int J Mol Sci.* 21 ottobre 2021;22(21):11382.
115. Ramírez-Sánchez AD, Tan IL, Gonera-de Jong BC, Visschedijk MC, Jonkers I, Withoff S. Molecular Biomarkers for Celiac Disease: Past, Present and Future. *Int J Mol Sci.* 12 novembre 2020;21(22):8528.
116. Pelizzaro F, Cardin R, Sarasini G, Minotto M, Carlotto C, Fassan M, Palo M, Farinati F, Zingone F. Crosstalk between MicroRNAs and Oxidative Stress in Coeliac Disease. *Inflamm Intest Dis.* 2024;9(1):11–21.
117. Felli C, Baldassarre A, Masotti A. Intestinal and Circulating MicroRNAs in Coeliac Disease. *Int J Mol Sci.* 6 settembre 2017;18(9):1907.
118. 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;13:930989.
119. 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.* febbraio 2022;76:103851.
120. Zahm AM, Thayu M, Hand NJ, Horner A, Leonard MB, Friedman JR. Circulating microRNA is a biomarker of pediatric Crohn disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* luglio 2011;53(1):26–33.
121. 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.* luglio 2020;65(7):1982–91.

122. Giuffrida P, Di Sabatino A. MicroRNAs in Celiac Disease Diagnosis: A miR Curiosity or Game-Changer? *Dig Dis Sci.* luglio 2020;65(7):1877–9.

123. McKenna LB, Schug J, Vourekas A, McKenna JB, Bramswig NC, Friedman JR, Kaestner KH. MicroRNAs control intestinal epithelial differentiation, architecture, and barrier function. *Gastroenterology.* novembre 2010;139(5):1654–64, 1664.e1.

124. Ye D, Guo S, Al-Sadi R, Ma TY. MicroRNA regulation of intestinal epithelial tight junction permeability. *Gastroenterology.* ottobre 2011;141(4):1323–33.

125. 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. *Med Kaunas Lith.* 25 gennaio 2022;58(2):180.

126. 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.* ottobre 2014;109(10):1662–74.

127. Buoli Comani G, Panceri R, Dinelli M, Biondi A, Mancuso C, Meneveri R, Barisani D. miRNA-regulated gene expression differs in celiac disease patients according to the age of presentation. *Genes Nutr.* settembre 2015;10(5):482.

128. Tan IL, Coutinho de Almeida R, Modderman R, Stachurska A, Dekens J, Barisani D, Meijer CR, Roca M, Martinez-Ojinaga E, Shamir R, Auricchio R, Korponay-Szabó IR, Castillejo G, Szajewska H, Koletzko S, Zhernakova A, Kumar V, Li Y, Visschedijk MC, Weersma RK, Troncone R, Mearin ML, Wijmenga C, Jonkers I, Withoff S. Circulating miRNAs as Potential Biomarkers for Celiac Disease Development. *Front Immunol.* 2021;12:734763.

129. 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.* 14 giugno 2022;10(6):1408.

130. Mazzola AM, Zammarchi I, Valerii MC, Spisni E, Saracino IM, Lanzarotto F, Ricci C. Gluten-Free Diet and Other Celiac Disease Therapies: Current Understanding and Emerging Strategies. *Nutrients.* 29 marzo 2024;16(7):1006.

131. Moretti S, Mrakic-Sposta S, Roncoroni L, Vezzoli A, Dellanoce C, Monguzzi E, Branchi F, Ferretti F, Lombardo V, Doneda L, Scricciolo A, Elli L. Oxidative stress as a biomarker for monitoring treated celiac disease. *Clin Transl Gastroenterol.* 8 giugno 2018;9(6):157.

132. 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 Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol.* agosto 2010;19(8):1960–5.
133. Vaira V, Gaudio G, Laginestra MA, Terrasi A, Agostinelli C, Bosari S, Di Sabatino A, Vanoli A, Paulli M, Ferrero S, Roncoroni L, Lombardo V, Perera LP, Fabris S, Vecchi M, Pileri S, Elli L. Deregulation of miRNAs-cMYC circuits is a key event in refractory celiac disease type-2 lymphomagenesis. *Clin Sci Lond Engl 1979.* 29 maggio 2020;134(10):1151–66.
134. Gnodi E, Meneveri R, Barisani D. Celiac disease: From genetics to epigenetics. *World J Gastroenterol.* 28 gennaio 2022;28(4):449–63.
135. Biagi F, Bianchi PI, Marchese A, Trotta L, Vattiato C, Balduzzi D, Brusco G, Andrealli A, Cisarò F, Astegiano M, Pellegrino S, Magazzù G, Klersy C, Corazza GR. A score that verifies adherence to a gluten-free diet: a cross-sectional, multicentre validation in real clinical life. *Br J Nutr.* 28 novembre 2012;108(10):1884–8.
136. Vaira V, Roncoroni L, Barisani D, Gaudio G, Bosari S, Bulfamante G, Doneda L, Conte D, Tomba C, Bardella MT, Ferrero S, Locatelli M, Elli L. microRNA profiles in coeliac patients distinguish different clinical phenotypes and are modulated by gliadin peptides in primary duodenal fibroblasts. *Clin Sci Lond Engl 1979.* marzo 2014;126(6):417–23.
137. Bai H, Wu S. miR-451: A Novel Biomarker and Potential Therapeutic Target for Cancer. *OncoTargets Ther.* 2019;12:11069–82.
138. Ratnasari N, Lestari P, Renovaldi D, Raditya Ningsih J, Qoriansas N, Wardana T, Hakim S, Signa Aini Gumilas N, Indrarti F, Triwikatmani C, Bayupurnama P, Setyo Heriyanto D, Astuti I, Mubarika Harjana S. Potential plasma biomarkers: miRNA-29c, miRNA-21, and miRNA-155 in clinical progression of Hepatocellular Carcinoma patients. *PloS One.* 2022;17(2):e0263298.