



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRIESTE**

---

**CICLO XXVIII DELLA SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE DELLA RIPRODUZIONE E DELLO SVILUPPO**

**INDIRIZZO GENETICO MOLECOLARE**

---

**RUOLO DELL'IMMUNITÀ INNATA NELLA  
MALATTIA CELIACA**

Settore scientifico disciplinare: MED/38

**Dottorando**

Dott. Josef Vuch

**Coordinatore**

Proff.ssa Giuliana Decorti

**Supervisore di tesi**

Dott. Sergio Crovella

---

ANNO ACCADEMICO 2014-2015

Guardate lontano, e anche quando credete di star guardando lontano,  
guardate ancora più lontano !

B.-P.



# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>5</b>
1.1 LA CELIACHIA	6
1.2 IL GLUTINE	6
1.3 INTRODUZIONE DEL GLUTINE NELL'ALIMENTAZIONE UMANA.	7
1.4 STORIA DELLA CELIACHIA E DEI MODELLI DELLA MALATTIA	9
PRIME DESCRIZIONI DELLA CD	9
CD COME INTOLLERANZA AL GLUTINE	11
CD COME "INFEZIONE" CRONICA	12
ASSOCIAZIONE TRA CD E REAZIONI AUTOIMMUNI	12
L'IPOTESI LECTINICA	14
QUATTRO IPOTESI SULLA PATOGENESI DELLA CD	14
IDENTIFICAZIONE DELL'ANTIGENE ENDOMISIALE E MODELLO ATTUALE SULLA PATOGENESI DELLA CD	15
NON TUTTO È ANCORA CHIARO	17
<b>2. SCOPO DELLA TESI</b>	<b>19</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	<b>22</b>
3.1 QUANTIFICAZIONE DEI MONOCITI ATTIVATI DA GLUTINE DIGERITO	23
PAZIENTI	23
ISOLAMENTO DEI LINFO-MONOCITI DA SANGUE PERIFERICO	23
QUANTIFICAZIONE DEI MONOCITI ATTIVATI	24
SOSTANZE UTILIZZATE PER STIMOLARE I PBMC	24
ANALISI DEI DATI	25
3.2 STUDIO DELLA TOSSICITÀ DEL DIGESTO PEPTICO TRIPTICO DI GLUTINE SU CELLULE INTESTINALI	26

FHS74INT	26
XCELLIGENCE	26
OSSERVAZIONE DIRETTA DELLA VARIAZIONE DELLA MORFOLOGIA CELLULARE	27
<b>4. RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	<b>28</b>
<b>4.1 ANALISI QUANTITATIVA DELL'ATTIVAZIONE DI MONOCITI IN PRESENZA DI DPT-G</b>	<b>29</b>
<b>4.2 STUDIO DELLA TOSSICITÀ DEL DIGESTO PEPTICO TRIPTICO DI GLUTINE SU CELLULE INTESTINALI</b>	<b>34</b>
ANALISI QUANTITATIVA DELLA RISPOSTA DELLE CELLULE FHS74INT IN PRESENZA DI DPT-G	34
OSSERVAZIONE MICROSCOPICA DELLA RISPOSTA DELLE CELLULE FHS74INT AL DPT-G	38
<b>5. CONCLUSIONI</b>	<b>41</b>
<b>6. APPENDICE</b>	<b>44</b>
<b>6.1 ACRONIMI USATI NELLA TESI</b>	<b>45</b>
<b>6.2 TABELLE</b>	<b>46</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>47</b>

# 1. INTRODUZIONE

## **1.1 La celiachia**

La malattia celiaca (CD) è una condizione permanente in cui l'elevata sensibilità al glutine porta, nei soggetti geneticamente predisposti, ad un'inflammatione cronica dell'intestino tenue. La perpetuazione di tale insulto determina una sindrome da malassorbimento dei nutrienti che insieme all'inflammatione della mucosa intestinale possono indurre un disturbo generale dell'immunità mucosale fino allo sviluppo di malattie autoimmuni che coinvolgono altri organi ed apparati ed in alcuni casi possono favorire l'insorgenza di linfomi. [Guandalini S. 2014]

La CD si manifesta, dopo l'introduzione del glutine nella dieta, con una enteropatia infiammatoria a diversi gradi di severità dalla quasi assenza di segni e sintomi a importante malnutrizione dovuta all'appiattimento dei villi nell'intestino tenue e quindi alla forte riduzione della superficie di assorbimento di questo organo.

La CD ha una prevalenza approssimativa di 1:100 (nella popolazione italiana di 1:96 [Tommasini A. 2004], 1:99 nella popolazione finlandese [Hoffenberg E. J. 2003] e 1:105 negli USA [Fasano A. 2003]) anche se spesso è sottodiagnosticata a causa della sintomatologia molto varia e a volte lieve o assente. [Catassi C. 1995]

## **1.2 Il glutine**

La malattia celiaca è intrinsecamente legata al glutine.

I semi dei cereali come il grano, l'orzo, la segale, ed il farro contengono il

12-15% di proteine. Il glutine è la proteina maggiormente rappresentata (70-80%) che funge da riserva di aminoacidi per la pianta in germinazione. Il rimanente 20-30% è formato da albumine, globuline (proteine solubili in acqua) e enzimi specifici per il ciclo vitale della pianta.

Il glutine si può dividere in due frazioni: le glutenine, proteine polimeriche solubili in acidi e basi diluite, e le prolamine, proteine monomeriche solubili in soluzioni idroalcoliche (etanolo 60%, propanolo 50%).

Le prolamine prendono nomi diversi a seconda della specie di cereali alle quali appartengono: gliadine nel grano, seccaline nella segale, ordeine nell'orzo, zeine nel mais, avenine nell'avena, orizine nel riso e kaferine nel sorgo e nel miglio.

La gliadina ha un peso molecolare compreso tra 30 e 70 kDa e si divide in gliadina  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\omega$  in base alla mobilità elettroforetica.

La gliadina una volta digerita produce piccoli peptidi in grado di attivare una risposta da parte dell'organismo e sono distinti in:

Peptidi tossici: In grado di indurre danni tissutali indipendentemente dall'attivazione dei linfociti T *Helper* (LT<sub>H</sub>)

peptidi Immunogenici in grado di attivare LT<sub>H</sub> specifici

### **1.3 Introduzione del glutine nell'alimentazione umana.**

Circa 2,5 milioni di anni fa il genere Homo è comparso sulla terra e per gran parte della sua storia è vissuto di caccia e raccolta; soltanto nel periodo neolitico (10.000 anni fa) gli uomini hanno imparato ad addomesticare le piante e gli animali.

Le prime piante coltivate erano delle piante selvatiche che con il tempo

sono state selezionate artificialmente per avere una produzione maggiore con le caratteristiche che meglio si addicevano al loro uso alimentare.

Il glutine, che è stato per millenni una proteina sconosciuta all'uomo o poco rappresentata nella sua dieta, è diventata con il passare dei secoli una proteina ubiquitaria negli alimenti e assunta sempre in maggior quantità.

Con il passare del tempo, dopo la rivoluzione agricola del neolitico, i cereali sono stati selezionati in modo da contenere sempre più glutine. A partire dall'inizio del XX secolo la quantità di glutine negli alimenti è aumentata notevolmente sia per la creazione di nuove varietà di frumento in grado di produrre farine più forti (ricche di glutine) sia per la diminuzione di fibre nelle farine sempre più raffinate usate ogni giorno; inoltre l'industria alimentare ha introdotto il glutine come addensante in moltissimi cibi che tradizionalmente ne erano privi. [Aziz I. 2015]

Ad oggi i prodotti da forno lievitati sono sempre più digeribili e quindi nutrienti rispetto ai prodotti azzimi, il glutine ha un ruolo molto importante nella lievitazione in quanto una volta mescolato con l'acqua forma una maglia elastica e collosa che impedisce la fuoriuscita dei gas prodotti durante la lievitazione dall'impasto e quindi ne favorisce un corretto e stabile rigonfiamento. Più glutine c'è in una farina migliore sarà la lievitazione. I prodotti da forno lievitati sono sempre più digeribili e quindi più nutrienti rispetto ai prodotti azzimi.

L'aumentata esposizione al glutine potrebbe spiegare l'incremento della prevalenza della CD a livello mondiale, osservato indipendentemente dall'incremento del tasso di diagnosi che è in continuo aumento. [Lohi S. 2007] [White L. 2013] [Rubio-Tapia A. 2009] [Aziz I. 2015]

## 1.4 Storia della celiachia e dei modelli della malattia

La CD è una malattia descritta scientificamente in età contemporanea. Le teorie sulla sua patogenesi sono cambiate molto da quando è stata scoperta ad oggi, grazie alle nuove tecnologie che hanno permesso di capire sempre meglio la malattia a livello molecolare. Ad oggi la patogenesi della CD non è del tutto chiara, ripercorrere le tappe dello studio della malattia ci permette di avere un quadro più completo delle varie teorie che cercano o hanno provato a spiegarla.

### Prime descrizioni della CD

La CD è stata descritta per la prima volta dal medico greco Areteo di Cappadocia vissuto nell'impero romano nel primo secolo a.C.

Areteo osservò e descrisse una malattia intestinale con diarrea untuosa, pallore e perdita di peso. Dopo questa descrizione passarono quasi 2000 anni senza altre descrizioni della malattia.

Verso la fine del 1800 il medico inglese Samuel Gee descrisse la medesima malattia ed influenzato dagli scritti di Areteo la chiamò celiachia riprendendo la parola greca “*koiliakos*” che significa addome.

Gee osservò che la malattia si verificava in persone di qualsiasi età anche se il maggior numero dei casi si riscontrava tra i bambini con un'età compresa tra 1 e 5 anni. Le persone affette da questa malattia presentavano delle feci liquide in grande quantità e dall'aspetto chiaro, presentavano inoltre debolezza muscolare, cachessia, pallore e gonfiore. (Figura 1)

Per spiegare questa malattia Gee ipotizzò che si trattasse di un'indigestione cronica dei carboidrati, potenzialmente curabile modificando la dieta.

[Tommasini A. 2011] [Aziz I. 2015]



Figura 1

Fotografia di cinque casi di CD pubblicata da Hardwick C. nel 1939. Si può notare come i bambini presentano una riduzione della massa muscolare e un evidente gonfiore addominale. [Hardwick C. 1939]

## CD come intolleranza al glutine

Nel 1952, il medico australiano Charlotte M. Anderson, dimostrò che la CD non è da attribuirsi all'indigestione dei carboidrati ma bensì è un'intolleranza al glutine che si sviluppa dopo la sua ingestione. In questo stesso periodo vennero osservate, attraverso biopsie intestinali, le lesioni tipiche della celiachia ovvero un appiattimento dei villi intestinali inducendo una riduzione della superficie assorbente dell'intestino e favorendo infiltrazioni di linfociti nella mucosa. (Figura 2)

Le analisi istologiche condotte sulle biopsie intestinali cominciarono ad essere usate per diagnosticare la CD che iniziò ad essere considerata una malattia rara con una prevalenza di 1:5000.

[Anderson C. 1952] [Tommasini A. 2011] [Aziz I. 2015]

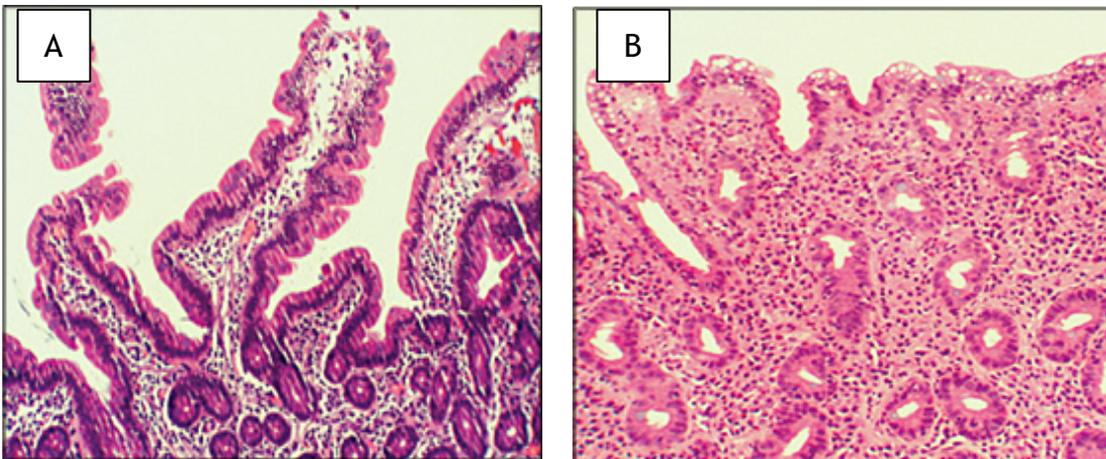


Figura 2

(A) Biopsia dell'intestino tenue normale. Si possono osservare i villi e le cripte del Lieberkühn con una morfologia normale (colorazione ematossilina/eosina, ingrandimento originale,  $\times 100$ ).

(B) Biopsia dell'intestino tenue in un paziente con malattia celiaca. Si possono osservare i villi atrofizzati e le cripte del Lieberkühn iperplastiche (colorazione ematossilina/eosina, ingrandimento originale,  $\times 100$ ).

[Presutti R. J. 2007]

### **CD come “infezione” cronica**

Negli anni '60 vennero indentificati anticorpi anti glutine nei pazienti celiaci. Si ipotizzò che il glutine potesse essere l'agente responsabile della malattia e che venisse riconosciuto dall'organismo come un patogeno verso il quale il sistema immunitario produceva anticorpi. Nello stesso periodo si capì che alcuni polimorfismi nei geni che codificano per il complesso maggiore di istocompatibilità (HLA) aumentavano il rischio di sviluppare la malattia e questo rafforzò ancora di più questa idea.

Grazie alla diagnosi sierologica vennero identificati casi di CD con sintomi molto più lievi di quella conosciuta fino ad ora. Questa forma di CD con anticorpi anti glutine, le tipiche alterazioni del lume intestinale ed una sintomatologia molto più lieve venne chiamata “celiachia silente”. Comprendendo anche questi casi più lievi nella CD, si arrivava ad avere una prevalenza di 1:250. [Tommasini A. 2011] [Aziz I. 2015] (Figura 3)

### **Associazione tra CD e reazioni autoimmuni**

Negli anni '70, grazie a nuove tecniche di immunofluorescenza, venne osservata nei soggetti celiaci la formazione di anticorpi in grado di legarsi a proteine dell'organismo. In particolare vennero individuati degli anticorpi in grado di legarsi al tessuto connettivo di sostegno del muscolo liscio e vennero chiamati anticorpi anti endomisio (EMA).

Questi vennero utilizzati per la diagnosi della CD e permisero di individuare alcuni soggetti positivi agli anticorpi anti endomisio che non presentavano i segni e i sintomi della malattia ma solo un'infiltrazione di leucociti nella mucosa intestinale con una preponderanza di linfociti.

Questa forma di CD venne chiamata “celiachia latente”. La prevalenza della malattia salì ulteriormente a 1:100. (Figura 3)

Lo sviluppo di questi autoanticorpi aprì la porta all’associazione tra la CD e l’autoimmunità. Nei soggetti predisposti il glutine è un fattore di rischio per l’insorgenza di malattie autoimmuni e il rischio aumenta all’aumentare del tempo di esposizione agli alimenti che lo contengono. [Catassi C. 1995] [Ventura A. 1999] [Tommasini A. 2011] [Aziz I. 2015]

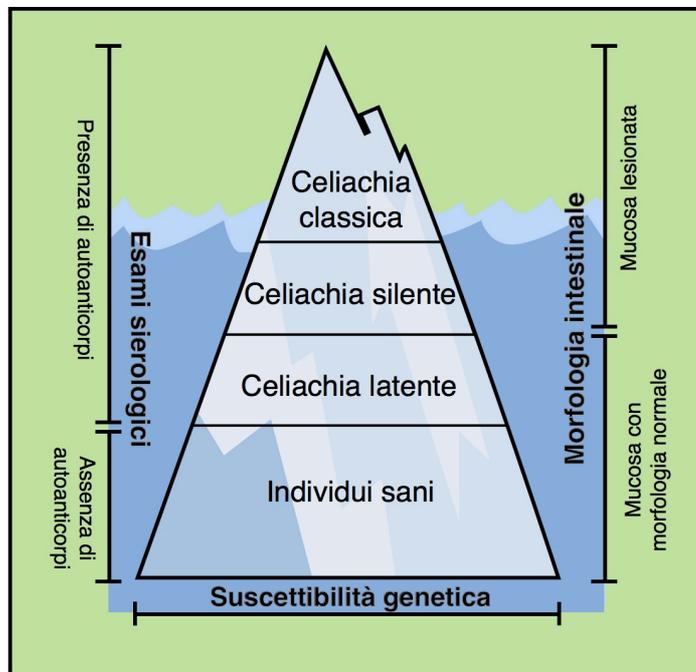


Figura 3

La figura riassume la complessità della CD.

In una grande popolazione di individui geneticamente predisposti, solo una piccola parte presenta i segni e i sintomi della celiachia classica (punta dell’iceberg), accompagnati dalle lesioni della mucosa e dalla presenza di autoanticorpi. Ci sono degli individui (in numero ancora maggiore) che non presentano le manifestazioni cliniche classiche della malattia ma hanno i danni mucosali e gli autoanticorpi e vengono chiamati celiaci silenti. I pazienti con solo autoanticorpi presentano una forma di celiachia definita latente. Ci sono infine numerosi soggetti geneticamente predisposti che non soffrono di CD.

## **L'ipotesi lectinica**

All'incirca nello stesso periodo venne osservato che una frazione del digesto peptico triptico di glutine (DPT-G) si comportava similmente alle lectine. Queste ultime sono delle proteine in grado sia di legarsi agli zuccheri presenti sui globuli rossi che ad agglutinare tra loro formando grumi di cellule. Salvatore Auricchio [Auricchio S. 1984] ed altri autori [Weiser M. M. 1976] [Kolberg J. 1985] pubblicarono diversi lavori dove osservarono l'agglutinazione di cellule in coltura in presenza delle prolamine digerite di grano, segale, avena, orzo ma non di mais e riso. Queste osservazioni suggerirono una tossicità diretta da parte del glutine e denominarono questa teoria "l'ipotesi lectinica". [Colyer J. 1986]

## **Quattro ipotesi sulla patogenesi della CD**

All'inizio degli anni '90 si cominciò ad avere le idee più chiare sulla CD, tanto che vennero formulate quattro ipotesi sulla patogenesi della malattia e si cercò di capire quale di questi quattro modelli fosse quello che la spiegava meglio.

### **1. Teoria Immunologica**

Questa teoria, la più accettata, ipotizzava che ci fosse, a livello intestinale, una proteina self non ancora identificata che fungesse d'antigene riconosciuto da autoanticorpi (EMA) prodotti solo negli individui con specifici aplotipi HLA. A seguito di questo riconoscimento il sistema immunitario si attivava inducendo il danno all'intestino tenue.

### **2. Teoria lectinica**

Questa teoria come indicato nel paragrafo precedente ipotizzava

invece, una tossicità diretta da parte del DPT-G sulle cellule dell'intestino.

### 3. Teoria della deficienza di peptidasi

Questa teoria presuppone una deficienza dell'enzima peptidasi e quindi una mancata digestione del glutine con un suo accumulo a livello intestinale che porta un danno all'epitelio di quest'organo. Le osservazioni sulla maggior tossicità del glutine digerito confutarono definitivamente questa ipotesi in brevissimo tempo.

### 4. Teoria virale

Questa teoria fu formulata in seguito all'osservazione che, nella gliadina e nell'Adenovirus 12 (Ad12), è presente una proteina di 54 kDa molto simile. Si ipotizzò una risposta immunitaria contro la gliadina in seguito ad una infezione da Ad12.

Anche questa teoria venne confutata in quanto non esistono a disposizione prove della correlazione tra gli anticorpi dei pazienti CD e la proteina virale così come sono assenti prove di infezioni preesistenti da Ad12 nei pazienti CD.

[Luchetti R. 1995] [Tommasini A. 2011] [Aziz I. 2015]

## **Identificazione dell'antigene endomisiale e modello attuale sulla patogenesi della CD**

La proteina *target* degli EMA non venne individuata fino al 1997 quando il gruppo di Walburga Dieterich la identificò con la transglutaminasi tissutale (tTG). [Dieterich W. 1997] [Tommasini A. 2011] [Aziz I. 2015]

L'enzima tTG è ubiquitario e svolge due ruoli molto importanti

nell'organismo: partecipa alla stabilizzazione del collagene nei tessuti connettivi ed è coinvolto nell'apoptosi.

Nella matrice dei tessuti connettivi ci sono molte fibre proteiche che creano una rete, la tTG mediante legami covalenti tra lisine e gruppi glutamminici permette l'unione delle maglie della rete.

La tTG è indotta ed attivata all'interno della cellula durante la morte cellulare per apoptosi. L'enzima permette la contrazione delle proteine intracellulari nei corpi apoptotici evitando la loro esposizione all'esterno della cellula impedendo il loro riconoscimento da parte del sistema immunitario con seguente attivazione dell'infiammazione.

La semplice identificazione di questo antigene non ha permesso di capire come mai si formano questi anticorpi. Per spiegarlo è stato preso in considerazione il fenomeno dell'"*antigen spreading*" già studiato precedentemente in altre malattie come il lupus eritematoso. Questo fenomeno consiste nella produzione di anticorpi con diverse specificità in seguito al riconoscimento di un unico antigene da parte dei linfociti T (LT).  
[Sollid L. M. 2002]

Di norma un peptide non self riconosciuto da un *B cell receptor* (BCR), viene processato dal linfocita B (LB), in seguito l'antigene viene presentato sul HLA di classe II e se sono presenti  $LT_H$  che riconoscono quell'antigene specifico si ha l'attivazione dei LB con la successiva produzione di anticorpi specifici per lo stesso.

Nella CD un peptide di gliadina si lega alla tTG che viene riconosciuta da un BCR specifico. Il complesso peptide-proteina viene processato dal LB che presenta l'antigene derivante dalla gliadina sul HLA di classe II che,

riconosciuto da un  $LT_H$  come non self, induce l'attivazione del sistema immunitario e la produzione di anticorpi anti tTG. [Tommasini A. 2011] [Fasano A. 2005] (Figura 4)

La tTG è in grado di deaminare il peptide di gliadina aumentando fortemente l'affinità per gli HLA di classe II DQ2 e DQ8. Un aplotipo HLA DQ2/DQ8 è una condizione necessaria per sviluppare la CD. [Korponay-Szabó I. R. 2008] [Abadie, V. 2011]

Inoltre un danno qualsiasi che porta ad un aumento della permeabilità della mucosa intestinale provoca un aumento del passaggio di peptidi di gliadina nella sottomucosa che, legati alla tTG e processati, attivano i linfociti che inducono l'infiammazione con ulteriore aumento della permeabilità intestinale, ingresso di altra gliadina e innescamento d'un circolo vizioso che porta all'aumento del danno tissutale. [Tommasini A. 2011]

### **Non tutto è ancora chiaro**

La scoperta del meccanismo di formazione degli anticorpi anti tTG ha fornito delle solidissime basi per la teoria immunologica della CD. Dal 1997 è notevolmente aumentato, in letteratura, la stesura di articoli che descrivono lo studio e l'analisi della risposta immunitaria adattativa ai peptide derivanti dalla digestione della gliadina nei celiaci.

La teoria immunologica per quanto efficace a spiegare la malattia non è esaustiva, ci sono degli aspetti della CD che non vengono spiegati. Non abbiamo ancora una spiegazione sul perché ci sono soggetti con aplotipo HLA-DQ2/DQ8 che non sviluppano la CD. nella popolazione sana il HLA-DQ2 è presente nel 24% dei soggetti mentre il HLA-DQ8 nel 15%. [Hoffenberg E.

J. 2003]

Inoltre non è ancora noto perché dei soggetti con HLA predisponente alla CD sono sani e non presentano anticorpi anti tTG per molti anni e poi senza un motivo preciso sviluppano la malattia.

Inoltre non conosciamo quale sia il primo insulto che porta al primo passaggio del peptide di gliadina nella sottomucosa.

La teoria lectinica al contrario della teoria immunologica è stata messa sempre più in disparte fino ad essere dimenticata. Questa teoria che si appoggia su dati validi e mai confutati, potrebbe avere ancora molto da dire e almeno in parte completare la spiegazione della teoria immunologica.

[Tommasini A. 2011] [Aziz I. 2015]

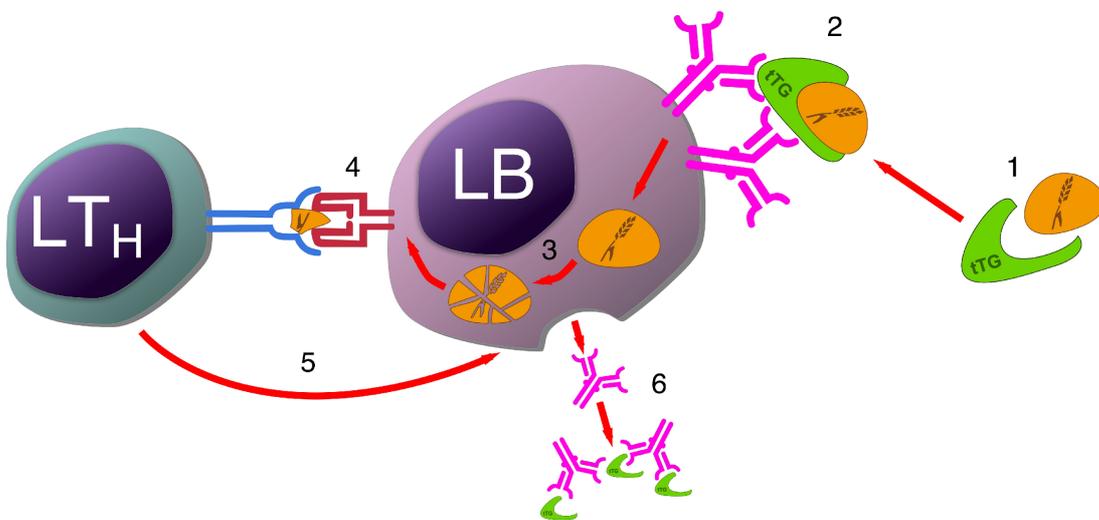


Figura 4

Nella CD un peptide di gliadina si lega alla tTG (1) che viene riconosciuta da un BCR receptor specifico (2), il complesso peptide-proteina viene processato dal LB (3) e presenta l'antigene derivante dalla gliadina sul HLA di classe II DQ2/DQ8 (4) che, riconosciuto da un L<sub>T</sub>H come non self, induce l'attivazione del sistema immunitario (5) e la produzione di anticorpi anti tTG (6). [Tommasini A. 2011] [Fasano A. 2005]

## **2. SCOPO DELLA TESI**

La malattia celiaca (CD) è una condizione permanente di sensibilità al glutine che porta ad un danno all'intestino tenue con conseguente malassorbimento di nutrienti ed infiammazione della mucosa intestinale. Il mancato assorbimento di nutrienti e la mucosa intestinale infiammata possono indurre un disturbo generale dell'immunità mucosale che può portare allo sviluppo di malattie autoimmuni che coinvolgono altri organi ed apparati ed in alcuni casi possono favorire l'insorgenza di linfomi.

Questa malattia si sviluppa esclusivamente nei soggetti che presentano HLA di classe II con aplotipo DQ2/DQ8 e dopo esposizione a cibi contenenti glutine. Questa è una condizione necessaria ma non sufficiente allo sviluppo della malattia, infatti circa il 24% dei soggetti sani presentano HLA-DQ2 e il 15% HLA-DQ8.

Il modello attuale della malattia non è in grado di spiegare questo fenomeno nonostante più di 20 studi di associazione "*genome wide associations studies*" (GWAS) hanno cercato, senza riuscirci, di identificare singoli geni responsabili di questa diversità.

Fino alla prima metà degli anni '90 sono state raccolte prove che inducono a sospettare un ruolo diretto del glutine nell'insorgenza della CD. La Teoria lectinica ipotizza un'attività citotossica della gliadina indipendente dal sistema immunitario adattativo, questa teoria potrebbe chiarire il ruolo del glutine nell'aumentare la permeabilità della mucosa intestinale e nell'attivare una risposta immunitaria innata in grado di richiamare cellule dell'immunità adattativa.

Lo scopo di questa tesi è ampliare le conoscenze sulla patogenesi della CD valutando:

1. se la gliadina ha un'azione lectinica su monociti e cellule epiteliali intestinali;
2. se questa azione è diversa tra soggetti sani e celiaci e tra i celiaci a dieta d'esclusione dal glutine e i celiaci esposti al glutine.

Per rispondere a queste domande è stata valutata quantitativamente l'attivazione dell'immunità innata in soggetti sani e celiaci ed il cambiamento morfologico dell'epitelio intestinale in risposta all'esposizione al glutine digerito.

### **3. MATERIALI E METODI**

### **3.1 Quantificazione dei monociti attivati da glutine digerito**

#### **Pazienti**

In questo studio, sono stati arruolati 19 soggetti, inclusi 8 pazienti con CD diagnosticata per mezzo di biopsie intestinali e 11 controlli sani con una concentrazione di immunoglobuline A (IgA) anti tTG minore di 7 U/mL (IgA anti tTG: soggetto sano <7 U/mL; risultato equivoco 7-10 U/mL; soggetto celiaco > 10 U/mL). Il titolo anticorpale è stato eseguito con il kit Elisa Celikey IgA (Phadia GmbH, Freiburg - Germania).

Ai pazienti celiaci sono stati prelevati due campioni di sangue in tempistiche differenti, uno durante la dieta d'esclusione dal glutine, mantenuta dai pazienti prima dell'esperimento, ed uno sei giorni dopo il primo prelievo e dopo aver assunto quotidianamente per i primi tre giorni 200 g di pangrattato contenente il 10% di glutine (COOP ITALIA S.C. Casalecchio di Reno - Italia).

Gli uomini rappresentano il 62,5 % dei pazienti e 37,5 % dei controlli. L'età media dei pazienti è di 41 anni mentre quella dei controlli è di 32 anni.

#### **Isolamento dei linfo-monociti da sangue periferico**

Dal sangue periferico di pazienti CD e di volontari sani, raccolto con eparina, per evitare la coagulazione, sono stati isolati i linfo-monociti (PBMC), dopo centrifugazione in gradiente di densità con la soluzione Lympholyte (Cedarlane, Burlington - Canada). In seguito,  $2 \times 10^5$  cellule, sono state seminate in 200  $\mu$ L di terreno RPMI (EuroClone, Milano - Italia)

contenente il 10% siero fetale bovino (FBS) (EuroClone) direttamente nel tubo da citofluorimetria.

### **Quantificazione dei monociti attivati**

L'attivazione monocitaria è stata monitorata attraverso la quantificazione dei monociti che producono fattore di necrosi tumorale  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). Questa quantificazione è stata eseguita mediante il protocollo “*Detecting Intracellular Cytokines in Activated Monocytes*” Becton Dickinson (Becton Dickinson Italia, Milano - Italia). In accordo con il protocollo è stato usato l'anticorpo anti CD-14 umano coniugato alla fluorescina isotiocianato (FITC) (eBioscience, San Diego - USA) per evidenziare i monociti tra i PBMC.

La fluorescenza è stata acquisita con il citofluorimetro CyAn (Dako Cytomation - Beckman Coulter, Brea - USA) che fa uso del programma Summit 4.3 (Dako Cytomation - Beckman Coulter, Brea - USA), e i dati prodotti sono stati analizzati con il *software* FlowJo 7.6.5 (Treestar, Inc. OR - USA).

### **Sostanze utilizzate per stimolare i PBMC**

Le sostanze analizzate in questo esperimento sono:

- Digesto peptico triptico di proteine della gliadina (DPT-G)  
(Fornito gratuitamente dall' Eurospital Spa - Trieste - Italia)  
[Bernardin J. E. 1967] [De Ritis G. 1979]
- Digesto peptico triptico di proteine del latte (DPT-L).

Questo digesto è stato isolato da Althéra (Nestlé Italia S.p.A. - Milano - Italia) mediante la precipitazione delle proteine in acetone freddo (Sigma-Aldrich - Milano - Italia).

- Soluzione di glutine non digerito (Gli)

La soluzione di glutine 15 µg/µL è stata preparata usando glutine (Sigma-Aldrich) disciolto in acido acetico 0,1 M (Sigma-Aldrich) neutralizzato 1:2 con una soluzione al 7,5% di bicarbonato di sodio (Sigma-Aldrich).

- Lipopolisaccaride (LPS)

LPS da *Escherichia coli*, sierotipo 055:B5 (Sigma-Aldrich). Questa endotossina batterica in grado di attivare i monociti è stata usata come controllo positivo d'attivazione.

La contaminazione da endotossine nel DPT-G, DPT-L e Gli è inferiore a 0,01 EU/mL. La quantificazione è stata eseguita con il kit "ToxinSensor™" (GenScript Inc. Piscataway - USA).

### **Analisi dei dati**

I dati riportano la percentuale di monociti che producono TNFα in presenza di stimoli, elencati nel punto precedente, rispetto a quella del campione non trattato che viene considerato in base alla produzione di TNFα a livello basale.

I risultati sono espressi come mediana (M), primo quartile (Q1), terzo quartile (Q3). La significatività statistica è stata calcolata usando il Test di Wilcoxon-Mann-Whitney. L'analisi è stata effettuata utilizzando il *software* R versione 3.2.1 (*The R Foundation for Statistical Computing*).

### **3.2 studio della tossicità del digesto peptico triptico di glutine su cellule intestinali**

#### **FHs74Int**

La linea cellulare di enterociti fetali umani FHs74Int (ATCC *American Type Culture Collection*, Manassas, VA, USA) è stata fatta crescere a 37 °C con 5% di CO<sub>2</sub> in terreno *Hybri-Care Medium* (ATCC) con 10% FBS (EuroClone), 30 ng/mL *Epidermal Grow Factor* (Sigma-Aldrich), 1% L-Glutamina e 1% penicillina/streptomina (EuroClone).

#### **xCELLigence**

Per misurare in tempo reale la crescita, la variazione di morfologia e la vitalità di cellule FHs74Int in coltura è stato usato lo strumento xCELLigence Real-Time Cell Analyser Dual Plate (RTCA-DP) (F. Hoffmann-La Roche SA, Basilea - Svizzera) abbinato alle piastre E-plate 16 da 16 pozzetti del diametro di 5,0 mm. L'esperimento è stato condotto a 37 °C e con il 5% di CO<sub>2</sub>.

I dati prodotti sono stati analizzati con il programma RTCA software (F. Hoffmann-La Roche SA, Basilea - Svizzera).

Questo strumento si basa sull'utilizzo di piastre di coltura con micro elettrodi d'oro situati sul fondo dei pozzetti. Le cellule una volta adese a questi elettrodi permettono il passaggio d'una corrente elettrica. Lo strumento misura la variazione di impedenza e la converte in un parametro

adimensionale definito “*Cell Index*” (CI) che varia a seconda del numero di cellule adese e alla superficie che queste cellule occupano.

Un CI pari a 0 si ha in assenza di cellule adese, dopo l’adesione il CI aumenta. Una maggiore superficie occupata dalle cellule porta ad un aumento del CI.

Una diminuzione del CI può significare o un abbassamento del numero di cellule adese (per esempio in seguito a morte cellulare) o un decremento della superficie cellulare adesa (per esempio in seguito ad una contrazione delle cellule).

[Martinez-Serra J. 2014]

### **Osservazione diretta della variazione della morfologia cellulare**

Le cellule FHs74Int, dopo esser state stimulate con DPT-G sono state osservate al microscopio ottico Leica DC100. Le immagini sono state acquisite con i *software* Leica FireCam 3.2 (Leica Microsystems Ltd - Swizerland), QuickTime Player 10.4 (Apple Inc. Cupertino, Ca - USA) ed elaborate con il *software* iMovie 10.1 (Apple Inc. Cupertino, CA - USA).

## **4. RISULTATI E DISCUSSIONE**

## 4.1 Analisi quantitativa dell'attivazione di monociti in presenza di DPT-G

Durante la prima fase di questo lavoro, è stata analizzata, con un metodo specifico e ripetibile, la percentuale di monociti dei soggetti sani e CD che, attivati dopo esposizione in vitro al DPT-G, producono TNF $\alpha$ .

Il DPT-G è stato somministrato ai PBMC a due concentrazioni 0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e 0,025  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

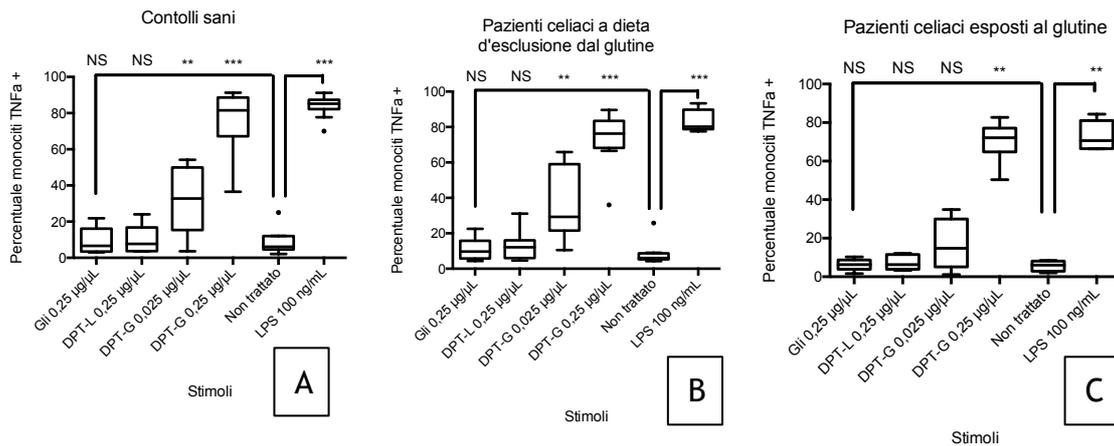
Come controllo negativo sono stati utilizzati peptidi alimentari, come proteine del latte digerite (DPT-L 0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) e il glutine non digerito (Gli 0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). Come controllo positivo è stato usato LPS 100 ng/mL che è in grado d'attivare la produzione di TNF $\alpha$  nei monociti.

L'attivazione dei monociti è stata valutata mediante citometria a flusso analizzando le percentuali di cellule che si presentavano positive all'CD-14, al TNF $\alpha$  o a entrambi.

Come si può vedere nei grafici della Figura 5, il DPT-G è in grado di attivare la produzione di TNF $\alpha$  in maniera significativa analogamente allo stimolo con LPS, questo si osserva per i soggetti di controllo (Tabella 1) (DPT-G 0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  M=81,50% Q1=70,70% Q3=86,10%; non trattato M=6,12% Q1=4,95% Q3=11,70%; Wilcoxon-Mann-Whitney  $p=2,835 \cdot 10^{-6}$ ; DPT-G 0,025  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  M=32,80% Q1=16,40% Q3=46,20% Wilcoxon-Mann-Whitney  $p=3,144 \cdot 10^{-3}$ ), per i pazienti celiaci a dieta d'esclusione (DPT-G 0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  M=76,25% Q1=71,53% Q3=80,48%; non trattato M=6,01% Q1=5,37% Q3=8,13%; Wilcoxon-Mann-Whitney  $p=1,554 \cdot 10^{-4}$ ; DPT-G 0,025  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  M=29,30% Q1=23,65% Q3=46,90% Wilcoxon-Mann-Whitney  $p=3,782 \cdot 10^{-3}$ ) e per i pazienti celiaci dopo esposizione a glutine (DPT-G 0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  M=72,15% Q1=70,13% Q3=74,63%;

non trattato M=5,93% Q1=3,43% Q3=7,80%; Wilcoxon-Mann-Whitney  $p=2,165 \cdot 10^{-3}$ ).

I monociti stimolati con Gli o DPT-L presentano un'attivazione simile ai monociti non stimolati (Sani: Gli 0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  M=6,62% Q1=3,91% Q3=13,10% Wilcoxon-Mann-Whitney  $p=0,9177$ ; DPT-L 0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  M=7,69% Q1=3,97% Q3=14,33% Wilcoxon-Mann-Whitney  $p=0,8094$ ) (Pazienti celiaci a dieta d'esclusione dal glutine: Gli 0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  M=9,73% Q1=5,82% Q3=13,93% Wilcoxon-Mann-Whitney  $p=0,3823$ ; DPT-L 0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  M=12,10% Q1=6,42% Q3=15,23% Wilcoxon-Mann-Whitney  $p=0,1605$ ) (Pazienti celiaci esposti al glutine: Gli 0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  M=6,28% Q1=6,08% Q3=7,13% Wilcoxon-Mann-Whitney  $p=1$ ; DPT-L 0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  M=6,28% Q1=4,65% Q3=10,12% Wilcoxon-Mann-Whitney  $p=0,5745$ ).



**Figura 5**

Percentuale di monociti TNFα+ trattati con Gliadina, DPT-L, DPT-G o LPS.

Le cellule sono state incubate per 4 ore con Gliadina, DPT-L, DPT-G o LPS.

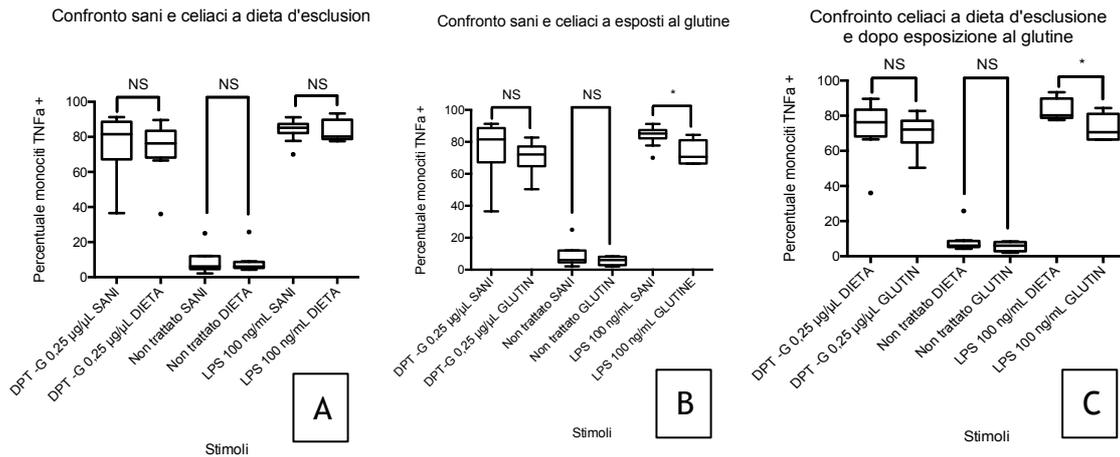
- I boxplot rappresentano il valore minimo, il primo quartile, la mediana, il terzo quartile ed il valore massimo della percentuale di monociti TNFα+ dei controlli.
- I boxplot rappresentano il valore minimo, il primo quartile, la mediana, il terzo quartile ed il valore massimo della percentuale di monociti TNFα+ dei pazienti celiaci a dieta d'esclusione dal glutine
- I boxplot rappresentano il valore minimo, il primo quartile, la mediana, il terzo quartile ed il valore massimo della percentuale di monociti TNFα+ dei pazienti celiaci esposti al glutine

Gli asterischi indicano una differenza significativa rispetto le cellule non trattate (\*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001), NS indica un valore non significativo.

Dal confronto delle mediane dei monociti positivi al TNFα di soggetti sani e dei celiaci a dieta e dopo esposizione al glutine non si osservano differenze significative allo stimolo con DPT-G ed LPS. (Figura 6 A e B)

Si osserva invece una differenza significativa, dopo stimolo con LPS, tra le mediane dei monociti attivati dei controlli sani (LPS 100 ng/mL M=85,20% Q1=83,00% Q3=86,90% ) e dei celiaci dopo esposizione al glutine (LPS 100 ng/mL M=70,60% Q1=67,13% Q3=77,98% Wilcoxon-Mann-Whitney p=0,01034). (Figura 6 B e 7)

Analogamente si osserva una differenza significativa tra le mediane dei monociti attivati dei pazienti prima dell'esposizione al glutine (LPS 100 ng/mL M=80,20% Q1=78,88% Q3=87,40%) e dopo la stimolazione con LPS (Wilcoxon-Mann-Whitney  $p=0,04262$ ). (Figura 6 C e 7)

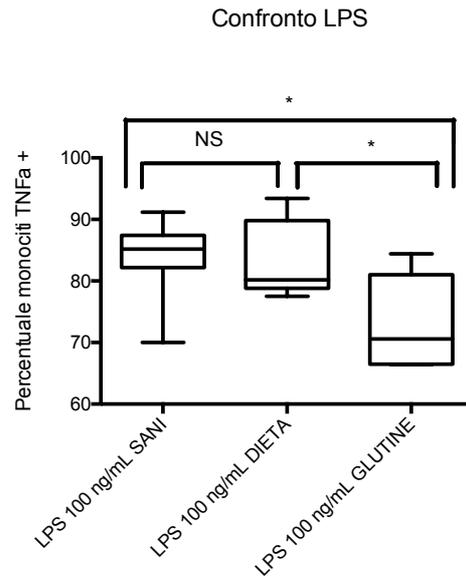


**Figura 6**

Confronto delle mediane della percentuale di monociti TNFα+ trattati con DPT-G o LPS nei tre gruppi di soggetti analizzati

- I boxplot rappresentano il valore minimo, il primo quartile, la mediana, il terzo quartile ed il valore massimo della percentuale di monociti TNFα+ dei controlli sani e dei pazienti celiaci a dieta d'esclusione dal glutine
- I boxplot rappresentano il valore minimo, il primo quartile, la mediana, il terzo quartile ed il valore massimo della percentuale di monociti TNFα+ dei controlli sani e dei pazienti celiaci esposti al glutine
- I boxplot rappresentano il valore minimo, il primo quartile, la mediana, il terzo quartile ed il valore massimo della percentuale di monociti TNFα+ dei pazienti celiaci a dieta d'esclusione dal glutine e dei pazienti celiaci esposti al glutine

Gli asterischi indicano una differenza significativa rispetto le cellule non trattate (\* $P<0.05$ ), NS indica un valore non significativo.



**Figura 7**

Confronto delle mediane della percentuale di monociti TNF $\alpha$ + dopo trattamento con LPS nei tre gruppi di soggetti analizzati

I boxplot rappresentano il valore minimo, il primo quartile, la mediana, il terzo quartile ed il valore massimo della percentuale di monociti TNF $\alpha$ + dei controlli e dei pazienti celiaci a dieta d'esclusione dal glutine

Gli asterischi indicano una differenza significativa rispetto le cellule non trattate (\*P<0.05), NS indica un valore non significativo.

## 4.2 studio della tossicità del digesto peptico triptico di glutine su cellule intestinali

### Analisi quantitativa della risposta delle cellule FHs74Int in presenza di DPT-G

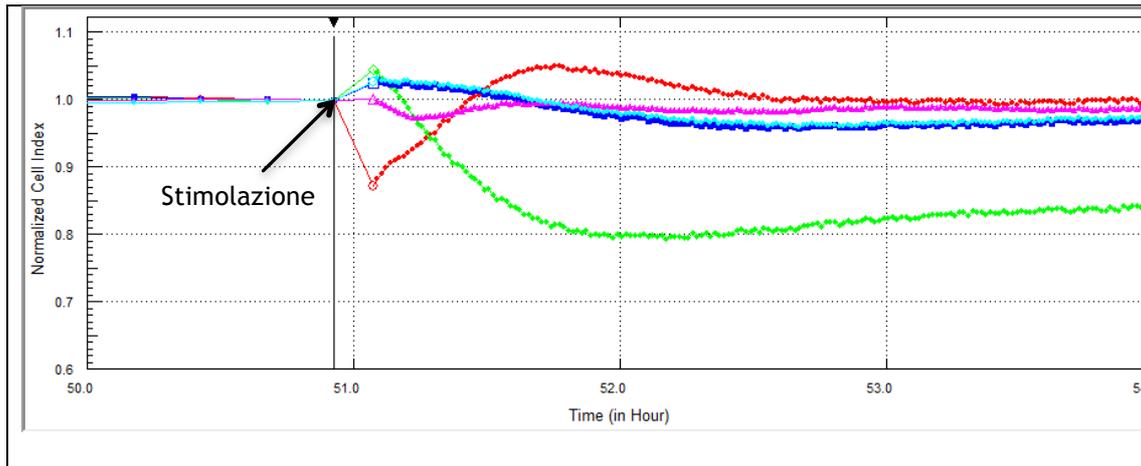
A seguito dei risultati ottenuti dall'analisi dell'attivazione dei monociti, è stata studiata in tempo reale l'attività del DPT-G sulla linea cellulare di enterociti fetali umani FHs74Int per mezzo dello strumento xCELLigence Real-Time Cell Analyser Dual Plate (RTCA-DP).

5000 cellule sono state seminate per ogni pozzetto della piastra E-plate 16 e fatte crescere fino a ricoprirne la superficie (plateau della curva di crescita, CI massimo).

Il DPT-G è stato somministrato alle cellule FHs74Int alla concentrazione di 0,25 µg/µL . Le cellule sono state stimolate anche con DPT-L 0,25 µg/µL; Gli 0,25 µg/µL e LPS 100 ng/mL.

L'esperimento è stato ripetuto tre volte e in ogni esperimento i diversi stimoli sono stati riprodotti in tre pozzetti.

Come si osserva nel grafico in Figura 8, il CI delle cellule stimolate con DPT-G diminuisce, il CI delle cellule stimolate con DPT-L, Gli e LPS, si mantiene su valori paragonabili al CI delle cellule non trattate.



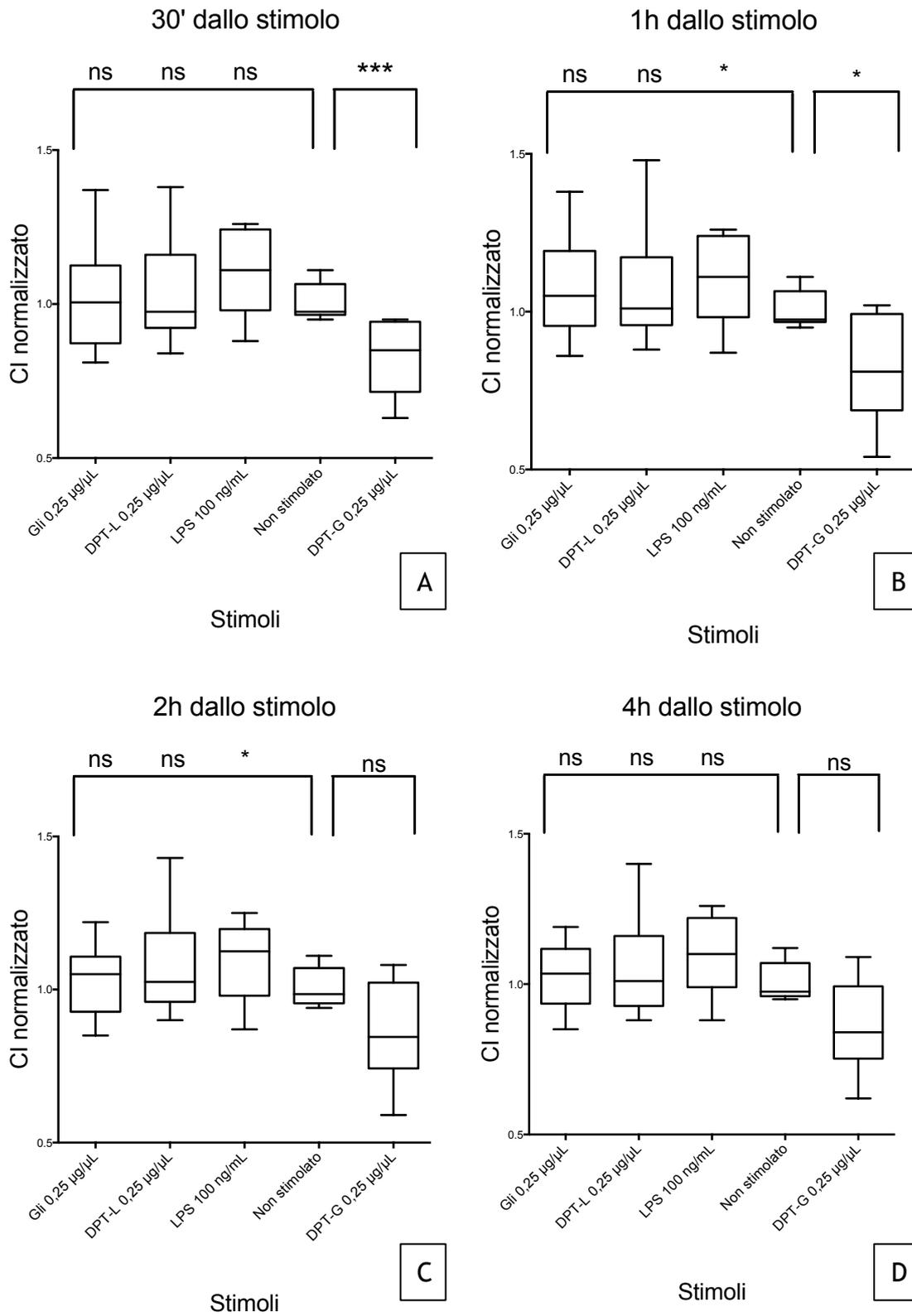
**Figura 8**

Grafico della variazione di CI in cellule FHs74Int dopo stimolo

Variatione di CI dopo stimolo con: ● DPT-G 0,25 µg/µL; ● DPT-L 0,25 µg/µL; ● Gli 0,25 µg/µL; ● LPS 100 ng/mL. Cellule non trattate ●.

Come si può osservare nei grafici della Figura 9, il DPT-G è in grado di diminuire il CI in maniera significativa dopo 30 minuti dallo stimolo (Figura 9 A) se confrontato con il campione non trattato (DPT-G 0,25 µg/µL  $M=0,85$   $Q1=0,75$   $Q3=0,94$ , Non trattato  $M=0,98$   $Q1=0,97$   $Q3=1,06$  Wilcoxon-Mann-Whitney  $p=3,033 \cdot 10^{-4}$ ). Dopo un'ora (Figura 9 B) la differenza tra le mediane del campione trattato con DPT-G e del non trattato è diminuita ma ancora significativa (DPT-G 0,25 µg/µL  $M=0,81$   $Q1=0,72$   $Q3=0,98$ , Non trattato  $M=0,98$   $Q1=0,97$   $Q3=1,06$  Wilcoxon-Mann-Whitney  $p=1,709 \cdot 10^{-2}$ ).

Dopo 2 ore dallo stimolo, (Figura 9 C) la differenza si è ridotta ulteriormente e non è più significativa (DPT-G 0,25 µg/µL  $M=0,85$   $Q1=0,79$   $Q3=1,02$ ; Non trattato  $M=0,99$   $Q1=0,96$   $Q3=1,07$ ), dopo 4 ore (Figura 9 D) la riduzione è ancora più pronunciata (DPT-G 0,25 µg/µL  $M=0,84$   $Q1=0,80$   $Q3=0,99$ ; Non trattato  $M=0,98$   $Q1=0,96$   $Q3=1,07$ ).



**Figura 9**

Confronto delle mediane del CI dopo stimolo con DPT-G 0,25 µg/µL; DPT-L 0,25 µg/µL; Gli 0,25 µg/µL; LPS 100 ng/mL a 30 minuti, 1 ora, 2 ore e 4 ore.

I boxplot rappresentano il valore minimo, il primo quartile, la mediana, il terzo

quartile ed il valore massimo del CI di tre esperimenti indipendenti.

- A. Valori di CI dopo 30 minuti dallo stimolo.
- B. Valori di CI dopo 1 ora dallo stimolo.
- C. Valori di CI dopo 2 ore dallo stimolo.
- D. Valori di CI dopo 4 ore dallo stimolo.

Gli asterischi indicano una differenza significativa rispetto le cellule non trattate (\* $P < 0.05$  \*\*\* $P < 0.001$ ), NS indica un valore non significativo.

Il CI è correlato al numero ed alla superficie delle cellule adese alla piastra. xCELLigence non è in grado di discriminare a quale dei due casi è da attribuire l'abbassamento del CI osservato durante questo esperimento.

Il fatto che l'abbassamento del CI è transiente e ritorna ai valori del non trattato in poco tempo induce a escludere che sia dovuto a morte cellulare o distaccamento delle cellule. L'ipotesi più probabile è che ci sia un cambiamento della morfologia, una contrazione cellulare.

### **Osservazione microscopica della risposta delle cellule FHs74Int al DPT-G**

Per confermare i dati ottenuti dall'esperimento con xCELLigence e per verificare l'ipotesi che ci sia un cambiamento morfologico delle cellule FHs74Int, abbiamo fatto un ulteriore esperimento.

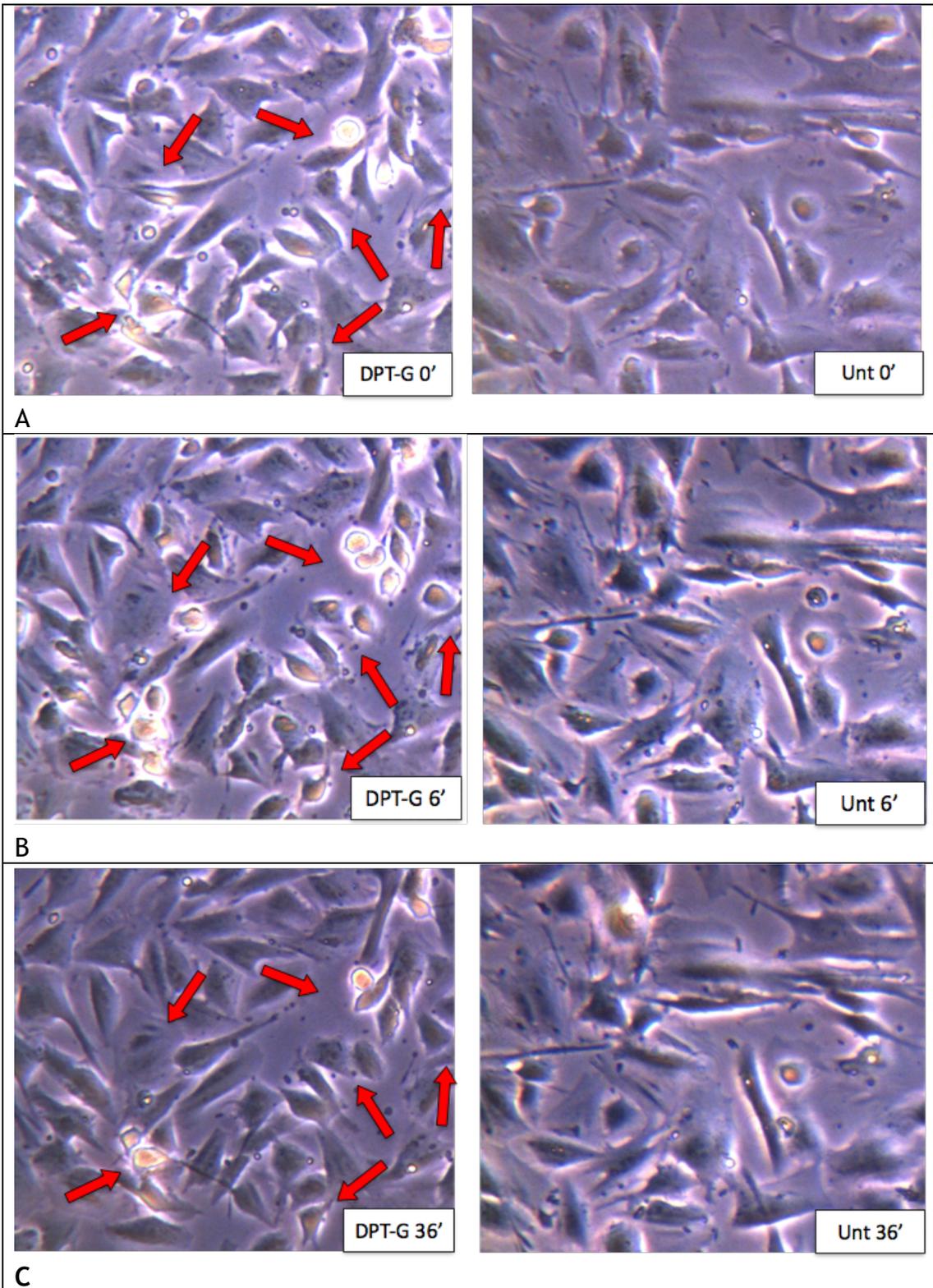
Le cellule FHs74Int sono state seminate su due piastra petri  $\varnothing$  35 mm e fatte crescere fino a ricoprire la superficie, il DPT-G è stato somministrato ad una delle due piastre alla concentrazione di 0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e l'altra piastra non è stata trattata.

Le cellule sono state filmate e fotografate a partire da 3 minuti prima dello stimolo ed in seguito ogni 3 minuti fino a 45 minuti.

Il video e le foto sono state montate in modo da poter osservare il cambiamento morfologico nel tempo confrontato con il controllo.

Al momento dello stimolo, le cellule si presentano uniformemente distribuite sulla superficie della piastra e non si osservano differenze tra le cellule non trattate e le cellule stimulate con DPT-G. (Figura 10 A)

Dopo 6 minuti dallo stimolo si osserva una evidente contrazione di numerose cellule (Figura 10 B) che con il passare del tempo ritornano allo stato non contratto precedente allo stimolo. (Figura 10 C)



### Figura 10

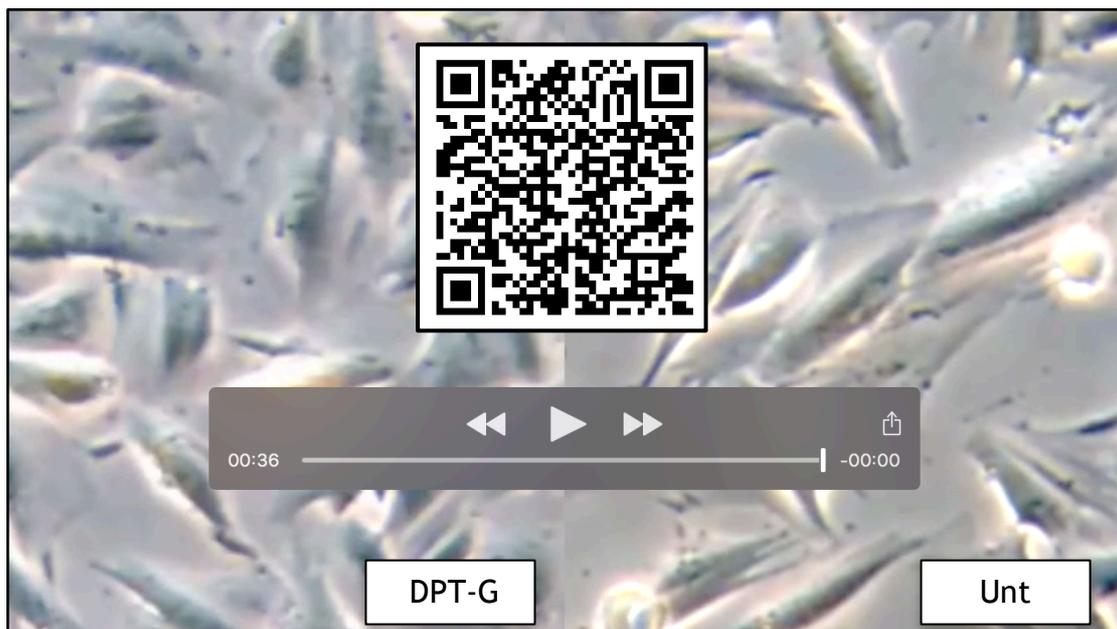
Cambiamento della morfologia delle cellule FHs74Int stimulate con DPT-G.

Nella colonna di sinistra si trovano le immagini delle cellule stimulate con DPT-G e nella colonna di destra si possono osservare le cellule non trattate (Unt).

- A. Cellule dopo 0' dallo stimolo.
- B. Cellule dopo 6' dallo stimolo.
- C. Cellule dopo 36' dallo stimolo.

Le frecce rosse evidenziano alcune cellule che hanno modificato la loro morfologia durante l'esperimento.

Queste osservazioni confermano l'ipotesi che l'abbassamento del CI è dovuto ad una contrazione cellulare in risposta alla somministrazione di DPT-G. Questa contrazione è ancora più evidente se si osservano le cellule filmate, aumentando la velocità del video. (Video 1)



### Video 1

Cambiamento della morfologia delle cellule FHs74Int stimulate con DPT-G.

Il filmato è riprodotto 6 volte di seguito ad una velocità 400x.

Il video è visibile al link:

[https://www.dropbox.com/s/v7lqsb2skabr50v/Video\\_FHs74Int\\_stimolate\\_con\\_DPTG.mp4?dl=0](https://www.dropbox.com/s/v7lqsb2skabr50v/Video_FHs74Int_stimolate_con_DPTG.mp4?dl=0)

o scansionando con uno smartphone il codice QR presente nell'immagine sopra.

## **5. CONCLUSIONI**

Gli studi sulla celiachia degli ultimi vent'anni, hanno focalizzato l'attenzione della comunità scientifica sulla genetica e sul ruolo della risposta immunitaria adattativa indotta nell'organismo in seguito all'assunzione del glutine nei pazienti CD.

Il modello attuale della celiachia, derivato da questi studi, è in grado di spiegare molti aspetti della CD ma non è completo, non è infatti ancora in grado di chiarire perché molte persone geneticamente predisposte non sviluppano mai la malattia.

La differente risposta tra individuo sano e malato (CD) potrebbe trovarsi negli aspetti poco indagati della patologia, come il ruolo del glutine nel determinare un aumento della permeabilità della mucosa intestinale e nell'attivare la risposta immunitaria innata in grado di richiamare cellule dell'immunità adattativa.

La "Teoria lectinica" ipotizza un'attività citotossica della gliadina indipendente dal sistema immunitario adattativo.

Questa teoria potrebbe fornire una spiegazione sul ruolo del glutine nelle prime fasi della malattia.

In questo campo d'indagine si inserisce il lavoro discusso in questa tesi.

Gli esperimenti condotti sui monociti e sulla linea di enterociti FHs74Int hanno dimostrato che il glutine digerito ha un effetto lectinico, svolge un'azione diretta nell'attivazione dei monociti e le cellule dell'epitelio che ricoprono l'intestino si contraggono in maniera transiente rendendo probabilmente più permeabile l'intestino al passaggio di molecole come il DPT-G stesso.

Non sono state individuate differenze significative nella risposta all'esposizione al glutine tra soggetti CD e controlli sani. L'unica differenza riscontrata è una minor produzione di TNF $\alpha$  nei soggetti CD esposti al glutine. Ipotizziamo che questa differenza sia da attribuirsi ad una stimolazione cronica da parte dei peptidi tossici della gliadina, ipotizziamo inoltre che la ridotta risposta immunitaria innata possa portare ad una maggior disponibilità di peptidi di gliadina nel sottomucosa in grado di attivare la risposta immunitaria adattativa.

Questa tesi ha avuto come obiettivo l'ampliamento delle conoscenze sulla patogenesi della CD ma i risultati qui esposti hanno permesso di chiarire ulteriormente il ruolo del glutine non solo nei celiaci ma nell'intera popolazione.

Il glutine ha dimostrato avere una tossicità sulle cellule ed essere riconosciuto come un patogeno.

Il nostro organismo è adattato alla vita da cacciatori raccoglitori dei nostri antenati nelle savane del pleistocene, l'introduzione dei cereali e con essi il glutine nella dieta è stata una forzatura che ha portato con se la celiachia oltre ad aver introdotto il benessere associato ad una abbondante e regolare alimentazione.

## **6. APPENDICE**

## 6.1 Acronimi usati nella tesi

CD	Malattia celiaca
LT <sub>H</sub>	Linfociti T <i>Helper</i>
HLA	Complesso maggiore di istocompatibilità
EMA	Anticorpi anti endomisio
DPT-G	Digesto peptico triptico di glutine
Ad12	Adenovirus 12
tTG	Transglutaminasi tissutale
LT	Linfociti T
BCR	<i>B cell receptor</i>
LB	Linfociti B
GWAS	<i>Genome wide associations studies</i>
IgA	Immunoglobuline A
PBMC	Linfo-monociti
FBS	Siero fetale bovino
TNF $\alpha$	Fattore di necrosi tumorale $\alpha$
FITC	Fluoresceina isotiocianato
DPT-L	Digesto peptico triptico di proteine del latte
Gli	Soluzione di glutine non digerito
LPS	Lipopolisaccaride
M	Mediana
Q1	Primo quartile
Q3	Terzo quartile
CI	<i>Cell Index</i>
Unt	Non trattate

## 6.2 Tabelle

	<b>Gli 0,25 µg/µL</b>	<b>DPT-L 0,25 µg/µL</b>	<b>DPT-G 0,025 µg/µL</b>	<b>DPT-G 0,25 µg/µL</b>	<b>Unt</b>	<b>LPS 100 ng/mL</b>
<b>M</b> controlli sani	6,62	7,69	32,80	81,50	6,12	85,20
<b>Q1</b> controlli sani	3,91	3,97	16,40	70,70	4,95	83,00
<b>Q3</b> controlli sani	13,10	14,33	46,20	86,10	11,70	86,90
Test Wilcoxon-Mann-Whitney stimoli vs Unt controlli sani	2,165·10 <sup>-3</sup>	0,8094	** 3,144·10 <sup>-3</sup>	*** 2,835·10 <sup>-6</sup>		*** 2,835·10 <sup>-6</sup>
<b>M</b> pazienti celiaci a dieta d'esclusione dal glutine	9,73	12,10	29,30	76,25	6,01	80,20
<b>Q1</b> pazienti celiaci a dieta d'esclusione dal glutine	5,82	6,42	23,65	71,53	5,37	78,88
<b>Q3</b> pazienti celiaci a dieta d'esclusione dal glutine	13,93	15,23	46,90	80,48	8,13	87,40
Test Wilcoxon-Mann-Whitney stimoli vs Unt pazienti celiaci a dieta d'esclusione dal glutine	0,3823	0,1605	** 3,782·10 <sup>-3</sup>	*** 1,554·10 <sup>-4</sup>		*** 1,554·10 <sup>-4</sup>
<b>M</b> pazienti celiaci esposti al glutine	6,28	6,28	14,80	72,15	5,93	70,60
<b>Q1</b> pazienti celiaci esposti al glutine	6,08	4,65	9,04	70,13	3,43	67,13
<b>Q3</b> pazienti celiaci esposti al glutine	7,13	10,12	25,00	74,63	7,80	77,98
Test Wilcoxon-Mann-Whitney stimoli vs Unt pazienti celiaci esposti al glutine	1	0,5745	0,1255	** 2,165·10 <sup>-3</sup>		** 2,165·10 <sup>-3</sup>

**Tabella 1**

Mediana (M), primo quartile (Q1), terzo quartile (Q3) e p-value del test Wilcoxon-Mann-Whitney per la differenza tra le mediane dei monociti stimolati con Gli, DPT-L, DPT-G, LPS ed i monociti non trattati.

Gli asterischi indicano una differenza significativa rispetto le cellule non trattate (\*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001), NS indica un valore non significativo.

## **7. BIBLIOGRAFIA**

[Abadie, Valérie, et al. "Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis." *Annual review of immunology* 29 (2011): 493-525.]

[Anderson, CharlotteM, et al. "Coeliac disease: gastro-intestinal studies and the effect of dietary wheat flour." *The Lancet* 259.6713 (1952): 836-842.]

[Auricchio, S., et al. "Agglutinating activity of gliadin-derived peptides from bread wheat: implications for coeliac disease pathogenesis." *Biochemical and biophysical research communications* 121.2 (1984): 428-433.]

[Aziz, Imran, Federica Branchi, and David S. Sanders. "The rise and fall of gluten!." *The Proceedings of the Nutrition Society* (2015): 1-6.]

[Bernardin, J. E., D. D. Kasarda, and D. K. Mecham. "Preparation and characterization of  $\alpha$ -gliadin." *Journal of Biological Chemistry* 242.3 (1967): 445-450.]

[Catassi, C., et al. "High prevalence of undiagnosed coeliac disease in 5280 Italian students screened by antigliadin antibodies." *Acta Paediatrica* 84.6 (1995): 672-676.]

[Colyer, J., et al. "Reappraisal of the 'lectin hypothesis' in the aetiopathogenesis of coeliac disease." *Clin Sci* 71 (1986): 105-110.]

[De Ritis, G., et al. "Toxicity of wheat flour proteins and protein-derived peptides for in vitro developing intestine from rat fetus." *Pediatric research* 13.11 (1979): 1255-1261.)]

[Dieterich, Walburga, et al. "Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease." *Nature medicine* 3.7 (1997): 797-801.]

[Fasano, Alessio, and Carlo Catassi. "Coeliac disease in children." *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 19.3 (2005): 467-478.]

[Fasano A, Berti I, Gerarduzzi T, et al. "Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: A large multicenter study" *Arch Intern Med.* 2003;163:286-292]

[Guandalini, Stefano, and Asaad Assiri. "Celiac disease: a review." *JAMA pediatrics* 168.3 (2014): 272-278.]

[Hardwick, Christopher. "Prognosis in coeliac disease A Review of Seventy-Three Cases." *Archives of disease in childhood* 14.80 (1939): 279-294.]

[Hoffenberg E J "A prospective study of the incidence of childhood celiac disease" *J Pediatr* (2003);143:308-14]

[Kolberg, J., and L. Sollid. "Lectin activity of gluten identified as wheat germ agglutinin." *Biochemical and biophysical research communications* 130.2 (1985): 867-872.]

[Korponay-Szabó, Ilma R., et al. "Deamidated gliadin peptides form epitopes that transglutaminase antibodies recognize." *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 46.3 (2008): 253-261.]

[Lohi, S., et al. "Increasing prevalence of coeliac disease over time." *Alimentary pharmacology & therapeutics* 26.9 (2007): 1217-1225.]

[Luchetti, Roberto, and Massimo De Vincenzi. "Gluten-sensitive enteropathy." *ANNALI-ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ* 31 (1995): 323-336.]

[Martinez-Serra, Jordi, et al. "xCELLigence system for real-time label-free monitoring of growth and viability of cell lines from hematological malignancies." *OncoTargets and therapy* 7 (2014): 985.]

[Presutti, J. R. et al. "Celiac Disease." *Am Fam Physician*. 2007 Dec 15;76(12):1795-1802.]

[Rubio-Tapia, Alberto, et al. "Increased prevalence and mortality in undiagnosed celiac disease." *Gastroenterology* 137.1 (2009): 88-93.]

[Sollid, Ludvig M. "Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder." *Nature Reviews Immunology* 2.9 (2002): 647-655.]

[Tommasini, A., et al. "Mass screening for coeliac disease using antihuman transglutaminase antibody assay." *Archives of disease in childhood* 89.6 (2004): 512-515.]

[Tommasini, Alberto, Tarcisio Not, and Alessandro Ventura. "Ages of celiac disease: from changing environment to improved diagnostics." *World journal of gastroenterology: WJG* 17.32 (2011): 3665.]

[Ventura, Alessandro, Giuseppe Magazzù, and Luigi Greco. "Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease." *Gastroenterology* 117.2 (1999): 297-303.]

[Weiser, M. M., and A. P. Douglas. "An alternative mechanism for gluten toxicity in coeliac disease." *The Lancet* 307.7959 (1976): 567-569.]

[White, Lois E., et al. "The rising incidence of celiac disease in Scotland." *Pediatrics* 132.4 (2013): e924-e931.]



Arrivato alla fine di questi tre anni di dottorato, voglio ringraziare la mia famiglia che da sempre mi ha sostenuto nel cercare e nel seguire la mia strada.

Un grazie enorme va agli amici e colleghi del Burlo che in questi anni mi hanno aiutato a superare le difficoltà e mi hanno fatto crescere.