



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia

**Celiachia: studio degli effetti
proinfiammatori degli ATIs
ottenuti da grani di specie
differenti**

Relatore Chiar.ma
Prof.ssa Francesca Fazioli

Candidato
Pietro Guacci

ANNO ACCADEMICO 2019/2020

Indice

Abbreviazioni	5
1 Introduzione	9
1.1 La celiachia	9
1.2 Epidemiologia	12
1.3 Eziopatogenesi	14
1.4 Diagnosi e Terapia	23
1.5 Ruolo dell'immunità nella patogenesi del morbo celiaco	29
1.6 Gli inibitori dell'amilasi e della tripsina (ATIs)	32
1.7 I recettori di tipo Toll	34
1.8 Interazione tra ATIs e TLR4	36
2 Scopo del lavoro	39
3 Materiali e metodi	41
3.1 Colture cellulari	41
3.2 Coltivazione di diverse specie di grani	41
3.3 Purificazione degli ATIs	42
3.4 Trattamento cellulare con gli ATIs	44
3.5 Determinazione del profilo citochinico	45
3.6 Estrazione dell'RNA	50
3.7 qRT-PCR	51
3.8 Valutazione dell'espressione genica	53
3.9 Analisi statistica	55

4	Risultati	57
4.1	Definizione delle condizioni ottimali di trattamento	57
4.2	Controllo quantitativo dell'mRNA per l'IL-6	59
4.3	Profilo citochinico indotto dagli ATIs purificati dalle diverse specie di grano coltivate a Potenza	60
4.4	Profilo citochinico indotto dagli ATIs purificati dalle diverse specie di grano coltivate nelle tre differenti regioni	66
5	Discussione	69
6	Ringraziamenti	73
	Bibliografia	79

Abbreviazioni

Abs Anticorpi

AGA Anticorpi Anti-Gliadina

AP-1 Proteina di Attivazione 1

APC Cellule Presentanti l'Antigene

ATIs Inibitori dell'Amilasi e della Tripsina

BMI Indice di Massa Corporea

BSA Albumina Bovina Sierica

CM Cloroformio e Metanolo

CTLs Linfociti T citotossici

DAMPs Profili molecolari associati al Danno

DCs Cellule dendritiche

DH Dermatite erpetiforme di Duhring

dNTPs Deossiribonucleotidi trifosfati

EALT Linfoma T Associato ad Enteropatia

EBV Epstein Barr virus

EMA Anticorpi Anti-Endomisio

FBS Siero fetale di Bovino

FODMAPs Mono-, Di- e Oligo-saccaridi e Polioli Fermentabili

FPLC Cromatografia a fase mobile liquida della proteina veloce

GAPDH Gliceraldeide 3 fosfato deidrogenasi

GTP Guanosintrifosfato

HPSs Proteine indotte dallo Shock

IBS Sindrome dell'Intestino Irritabile

IELs Linfociti intraepiteliali

IL Interleuchina

INF Interferone

IRF Fattore di Risposta all'Interferone

LFT Test di funzionalità epatica

LPS Lipopolisaccaride

MARSH Mucosal Algorithmic Rules for Scoring Histology

MCP-1 Proteina Chemoattraente i Monociti-1

MD2 Proteina della Differenziazione Mieloide 2

NAFLD Steatosi Epatica Non Alcolica

NCGS Sensibilità al glutine Non Celiaca

NF-kB Fattore Nucleare kB

NKs Cellule Natural Killer

PAMPs Profili Molecolari Associati ai Patogeni

PBMCs Cellule mononucleate del sangue periferico

PCR Reazione a Catena della Polimerasi

PDWGFs Frazioni di gliadina digerite con pepsina

PRR Recettori di Riconoscimento del Pattern

RANTES Chemochina Regolata sull'Attivazione, Espressa e Secreta sulle Normali cellule T

TCR Recettore delle Cellule T

TIR Recettore Toll – IL-1

TLRs Recettori di tipo Toll

TNF α Fattore di Necrosi Tumorale - α

TRAIL Ligando TNF-correlato Inducente Apoptosi

TSH Ormone Tireostimolante

tTG Transglutaminasi tissutale

tTGA Anticorpi Anti -Transglutaminasi tissutale

Capitolo 1

Introduzione

1.1 La celiachia

La celiachia, anche definita sprue nostrana o non tropicale, è un'enteropatia cronica autoimmune dovuta all'introduzione di glutine con la dieta unitamente ad una predisposizione genetica (Rugarli C, 2016). Dal punto di vista storico, recenti dati archeologici, in gran parte provenienti dalla regione di Gobleki Tepe della Mezzaluna fertile, indicano che la malattia celiaca è probabilmente emersa quando gli esseri umani sono passati da un tipo di società basata sulla caccia e sulla raccolta ad una stazionaria e dipendente dall'agricoltura che garantisse un approvvigionamento alimentare stabile (Freeman HJ, 2015).

La patologia è caratterizzata dalla presenza di lesioni della mucosa intestinale con conseguenti riduzione della superficie assorbente enterica e sindrome da malassorbimento. La malattia si può esprimere come *franca* qualora le tipiche lesioni siano già presenti al momento della diagnosi. Di contro una certa quota di pazienti (5-10%) può manifestare la positività anticorpale (anticorpi (Abs) anti-endomisio e anti-transglutaminasi) in assenza di lesioni: si parla allora di malattia celiaca *potenziale*.

I pazienti con la *forma potenziale* possono manifestare sia sintomi classici che non classici o essere completamente asintomatici (Rugarli C, 2016). Questa forma presenta un *pattern* sierologico tipico in unione ad un quadro istologico intestinale normale o solo leggermente alterato. Con il passare del tempo la forma potenziale può evolvere in una celiachia conclamata (Catassi C, Coppaaroni R et al., 2015).

Non si è ancora concordi sull'opportunità o meno di prescrivere una dieta aglutinata a questo tipo di pazienti (Caio G et al., 2019). Va ricordato che il glutine non necessariamente induce la comparsa di lesioni al primo contatto con l'individuo predisposto, anche se le motivazioni di questo ritardo clinico non sono state ancora chiarite. Relativamente alla patologia franca, questa può essere ulteriormente divisa in *malattia celiaca maggiore* per i pazienti presentanti i chiari segni e sintomi quali la diarrea con o senza steatorrea e il dimagrimento, ed in una *malattia celiaca minore* per i pazienti presentanti segni e sintomi atipici, transitori ed extra-intestinali quali l'anemia, l'osteoporosi, la bassa statura, l'ipoplasia dello smalto dentario (Rugarli C, 2016) ma anche sintomi del tratto gastrointestinale come dolori addominali ricorrenti, nausea, vomito, gonfiore e stomatite aftosa ricorrente (Lionetti E e Catassi C, 2011). Di fatto, le manifestazioni extra-intestinali non sono da considerarsi rare nella pratica clinica (Makovicky P et al., 2020).

La forma intestinale si rileva più comunemente nella popolazione pediatrica e nei bambini di età inferiore ai 3 anni (in particolare tra i 6 e i 24 mesi di età con crescita ridotta, feci anormali, distensione addominale, deperimento muscolare, ipotonia, scarso appetito e irritazione (Lionetti E e Catassi C, 2011)) mentre, negli adulti, la sindrome da malassorbimento con diarrea cronica, perdita di peso e astenia significativa risulta piuttosto rara. I sintomi extra-intestinali sono invece comuni sia nei bambini che negli adulti (Caio G et al., 2019). L'Indice di Massa Corporea (BMI) medio nei pazienti celiaci alla diagnosi è solitamente inferiore rispetto alla popolazione generale anche se è stato osservato che lo stato nutrizionale dei pazienti che hanno ricevuto una diagnosi di malattia celiaca negli ultimi anni è migliore rispetto a quello di pazienti diagnosticati negli anni precedenti (Valvano M et al., 2020).

Prende il nome di *malattia celiaca silente* la situazione per la quale si è riscontrata la presenza della patologia in condizioni particolari come lo screening familiare nei parenti di un paziente affetto. In ultimo, la *sensibilità al glutine non celiaca (NCGS)* è un disturbo che racchiude tutti quei casi in cui un paziente manifesta sintomi caratteristici della malattia celiaca, traendo anche beneficio da una dieta aglutinata, nonostante dagli accertamenti medici sia possibile escludere la presenza di celiachia o di allergia al grano (Rugarli C, 2016). Si stima che la frequenza della NCGS sia 6 volte maggiore rispetto a quella della celiachia e si ritiene che sia caratterizzata da un diverso tipo di reazione immuno-mediata (Jackson J et al.,

2011).

I pazienti celiaci non trattati posso andare incontro a diverse complicanze, potendo sviluppare alcune condizioni croniche e sintomi non gastrointestinali come anemia, osteoporosi, affaticamento, infertilità, eczema e la cosiddetta *celiachia refrattaria* (Sharma N et al., 2020) caratterizzata da sintomi e lesioni istologiche persistenti dopo almeno 12 mesi di rigida dieta aglutinata. La malattia refrattaria può portare a complicanze come la digiunoileite ulcerosa, la sprue collagenosica e il linfoma intestinale (Caio G et al., 2019). Tuttavia, alcuni sintomi ricorrenti possono derivare da altre cause: è possibile che la diagnosi originale non fosse corretta e ci sono molte condizioni che possono causare una lesione istopatologica dell'intestino tenue praticamente identica a quella della celiachia. Inoltre, i sintomi potrebbero derivare da altri disturbi come un disturbo intestinale funzionale. In alternativa, nei pazienti che sembrano possedere sintomi "refrattari", potrebbe essersi sviluppata una complicanza (ad esempio una Sprue collagenosica, un carcinoma del piccolo intestino o un linfoma) (Freeman HJ, 2008). Sembrerebbe che circa il 40% dei pazienti presenti valori elevati ai test di funzionalità epatica (LFT) al momento della diagnosi e che la maggior parte tende a normalizzarsi al seguito di una dieta priva di glutine (Valvano M et al., 2020). Inoltre, malattie come il diabete di tipo I (con una prevalenza media tra i bambini celiaci del 4,5% (Lionetti E e Catassi C, 2011)), la tiroidite di Hashimoto, il morbo di Graves, la sindrome di Sjogren, la sindrome di Down (con una prevalenza media tra i bambini celiaci compresa tra il 3,2% e il 10,3%) (Lionetti E e Catassi C, 2011), la sindrome di Turner, la cirrosi biliare primaria e disturbi neurologici vari come la neuropatia periferica inspiegabile, l'epilessia e l'atassia sono talvolta associate alla celiachia (Sharma N et al., 2020). Di fatto, sembrerebbe che più del 22% dei pazienti con celiachia sviluppi una disfunzione neurologica o psichiatrica e ben il 57% delle persone con disfunzione neurologica di origine sconosciuta risulti positivo agli Abs anti-gliadina. Le problematiche neuro-psichiatriche sono difatti molto rappresentate in corso di celiachia: la prevalenza della malattia nei pazienti affetti da epilessia varia dallo 0,8 al 6% ed è stato verificato che le persone affette da celiachia possiedono una probabilità significativamente più alta di soffrire di stati d'ansia rispetto ai controlli. Inoltre, è stata riscontrata una maggiore prevalenza di disturbi di panico e fobia sociale in questo tipo di pazienti (Jackson J et al., 2011). Tra i vari disturbi collegati alla malattia celiaca non va dimenticata la dermatite erpetiforme di Duhring (DH), una

manifestazione cutanea caratterizzata dalla comparsa di gruppi di papule e vescicole pruriginose sulla pelle e depositi granulari di IgA nelle papille cutanee. Tali lesioni generalmente si risolvono adottando una dieta priva di glutine ma occasionalmente persistono in alcuni soggetti (Al-Toma A et al., 2019).

Recentemente, è stata identificata un'altra forma di malattia celiaca, ovvero la *forma sieronegativa*. Questa è caratterizzata dalla mancanza dei classici marcatori sierologici unitamente ai segni clinici di grave malassorbimento e atrofia della mucosa intestinale (Caio G et al., 2019).

1.2 Epidemiologia

Al seguito della disponibilità di strumenti sierologici altamente sensibili e specifici, in primo luogo gli Abs anti-gliadina (AGA) e successivamente quelli anti-endomisio (EMA) e anti-transglutaminasi (tTGA), si è riusciti a valutare la reale prevalenza della malattia celiaca (Lionetti E e Catassi C, 2011). Si tratta di uno dei disturbi autoimmuni più comuni, con una prevalenza dello 0,5-1% nella popolazione globale, ad eccezione dell'Africa sahariana e del Giappone, aree che mostrano una bassa frequenza di geni predisponenti e un basso consumo di glutine (Caio G et al., 2019). Basandosi sulla conferma istologica, la prevalenza globale si aggirerebbe intorno allo 0,7%, più alta in Europa ed Oceania (0,8%) e più bassa in Sud America (0,4%) (Singh P et al., 2018). Tassi simili sono stati segnalati nella popolazione degli Stati Uniti (1:133) e in paesi per lo più popolati da individui di origine europea, come l'Australia e la Nuova Zelanda (Lionetti E e Catassi C, 2011). I fattori responsabili di queste differenze sono probabilmente sia genetici (ivi inclusi sia geni HLA che non HLA) che ambientali quali il consumo del grano, l'età dell'introduzione dello stesso, l'alimentazione durante l'infanzia, le infezioni gastrointestinali, l'uso di antibiotici e di inibitori di pompa protonica e il taglio cesareo (Singh P et al., 2018). Tuttavia sembrerebbe che la maggior parte dei casi di celiachia rimangano misconosciuti a causa della sintomatologia eterogenea e della scarsa conoscenza della malattia da parte della popolazione generale. La prevalenza è comunque in aumento nei paesi occidentali: tra il 1975 e il 2000 è aumentata di 5 volte negli Stati Uniti. La prevalenza della malattia è più elevata nei parenti di primo grado di soggetti affetti (10-15%) e in altri gruppi a rischio, in particolare i pazienti con sindrome di Down, diabete di tipo 1 o carenza di IgA (Caio G et al., 2019). Dati recenti

suggeriscono che questa tendenza verso una maggiore incidenza della celiachia si riscontri in particolare tra gli anziani: nel 1960, solo il 4% dei pazienti con malattia celiaca di nuova diagnosi aveva più di 60 anni, ma studi successivi hanno dimostrato che il 19-34% dei nuovi casi di celiachia sono diagnosticati proprio in questa fascia di età (Rashtak S e Murray J, 2009).

In Italia, la prevalenza della celiachia risulta simile a quella di altri paesi occidentali ed è stimata essere 1 ogni 150 individui (Rugarli C, 2016). Il rapporto donna-uomo è di 1,5:1. La malattia può manifestarsi a qualsiasi età, sia nella prima infanzia che nella popolazione adulta, con due picchi di insorgenza: uno poco dopo l'introduzione del glutine durante lo svezzamento nei primi 2 anni e l'altro nel secondo o terzo decennio di vita. Di fatto, vari studi hanno suggerito che l'allattamento al seno, la modalità di somministrazione e il tempo di introduzione del glutine nella dieta dei bambini a rischio influenzano l'incidenza della malattia (Caio G et al., 2019).

In generale, il numero complessivo dei casi di malattia può essere paragonato ad un iceberg: i casi tipici vengono solitamente diagnosticati al seguito della constatazione dei sintomi sia classici che non e costituiscono la parte visibile dell'*iceberg*, espressa dall'incidenza della malattia in termini quantitativi. Nei paesi sviluppati, tuttavia, per ciascun caso diagnosticato esistono circa cinque casi che rimangono misconosciuti: la parte sommersa dell'*iceberg*. Questi casi non diagnosticati rimangono, ovviamente, privi di trattamento (Lionetti E e Catassi C, 2011) (Figura 1).

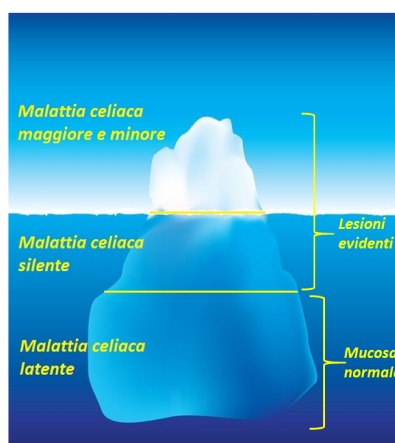


Figura 1: Modello dell'iceberg celiaco.

1.3 Eziopatogenesi

Come già accennato nel paragrafo precedente, affinché si sviluppi la malattia celiaca è necessaria una compartecipazione di fattori ambientali ed individuali (Rugarli C, 2016).

Fattori ambientali

Il principale fattore ambientale è sicuramente il glutine contenuto nel grano. Circa 10.000 anni fa, durante il passaggio dallo stile di vita nomade a quello sedentario degli insediamenti agricoli, è iniziato il consumo di cereali contenenti glutine che dunque rappresentano un'introduzione relativamente recente nella dieta umana (Caio G et al., 2019). Tra questi, il grano (anche detto frumento) è un cereale dal quale, al seguito dell'esecuzione di alcuni processi, è possibile ottenere diverse tipologie di farine, ormai alla base della dieta occidentale. Il frumento è classificato in base alle sue caratteristiche genetiche: si riconoscono il *farro piccolo vestito*, o grano duro, facente parte dei frumenti con corredo cromosomico diploide ($2n = 14$), il *farro medio vestito*, appartenente ai tetraploidi ($4n = 28$) e il *farro grande vestito*, conosciuto anche come grano tenero, avente un corredo esaploide ($6n = 42$). Il passaggio da 14 a 42 cromosomi è dovuto all'evoluzione avvenuta sia spontaneamente che ad opera dell'uomo: quest'ultimo, con il suo lavoro, ha permesso un incremento della produttività e della qualità tecnologica delle farine a discapito però di quella nutrizionale. Di fatto oggi è possibile parlare di grani antichi e grani moderni, distinguibili tra loro soprattutto dal punto di vista nutrizionale: i grani antichi sono stati selezionati agli inizi del 1900 e contengono una minor quantità di proteine ma un miglior bilanciamento tra i macronutrienti, mentre quelli moderni sono essenzialmente composti da amido e proteine del glutine. L'utilizzo di quest'ultimi sembra essere appunto collegato all'aumento di casi di intolleranza allo stesso.

La stima della produzione globale di grano nel 2016 è stata di 749,46 milioni di tonnellate. Inoltre, la domanda globale di grano è aumentata incredibilmente dopo l'industrializzazione e l'urbanizzazione a causa delle sue proprietà per la realizzazione del pane e della capacità di essere trasformato in diversi prodotti alimentari. I tipi di grano più comunemente usati sono il grano duro e quello tenero. Insieme, molte specie di grano formano il genere *Triticum*, tra cui il più utilizzato e coltivato

è il grano esaploide detto *Triticum aestivum* (*T. aestivum*) (Sharma N et al., 2020). La varietà esaploide si è formata grazie all'unione di tre genomi ancestrali: A, B e D. Il *T. aestivum* è nato circa 8000 anni fa da un'ibridazione di una specie di *Triticum* tetraploide con il donatore diploide *T. tauschii* con genoma D (Herpen T von et al., 2006).

Il grano è un alimento importante poiché possiede diversi macronutrienti essenziali quali carboidrati (70-75%), proteine (8-20%), fibre, lipidi, vitamine, sali minerali ed acqua. Le porzioni lipidica, proteica e vitaminica sono situate nella parte più esterna, detta crusca, mentre quella amilacea e delle proteine che formeranno il glutine è posta più all'interno (endosperma). Il cuore funzionale del seme è invece il germe che si trova a livello infero-laterale (Figura 2).

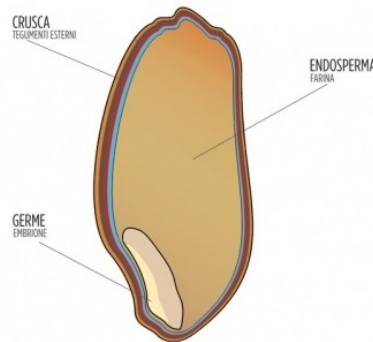


Figura 2: Rappresentazione schematica della struttura del grano.

Per quanto riguarda la porzione proteica questa può essere classificata in base alla solubilità in due componenti: la frazione solubile (20-30%), che comprende le albumine e le globuline e la frazione insolubile comprendente le gliadine (30-40%) e le glutenine (40-50%). Per quanto riguarda le globuline, esse rappresentano una famiglia eterogenea di proteine includenti, tra le tante, gli inibitori dell'amilasi e della tripsina (ATIs) che, seppur rappresentando solo una piccola parte della componente proteica totale del grano, giocano un ruolo importante nella difesa della pianta dai comuni predatori e, una volta ingeriti dall'uomo, sembrano anche implicati nella patogenesi di alcune malattie infiammatorie quali la celiachia e l'asma allergico. Le gliadine in particolare possiedono un'azione pro-infiammatoria intrinseca, soprattutto quelle derivate dal grano di tipo esaploide che sembra provocare una risposta maggiore nei pazienti celiaci rispetto al grano diploide e tetraploide a causa della presenza di genoma D (Sharma N et al., 2020); di fatto, il locus Gli-2

codificante per la gliadina che deriva dal genoma D è considerato maggiormente rilevante: la più alta presenza di epitopi stimolanti le cellule T (glia- α -2/9) è stata riscontrata proprio nelle specie aventi un genoma D rispetto a quelle con genoma A e B (Herpen T von et al., 2006). Una volta venute a contatto con un liquido durante la fase di impasto, le gliadine insieme alle glutenine formano il glutine: una rete tenace che, negli impasti, trattiene i gas derivati dalla lavorazione permettendo un notevole sviluppo del prodotto durante la cottura (Figura 3).

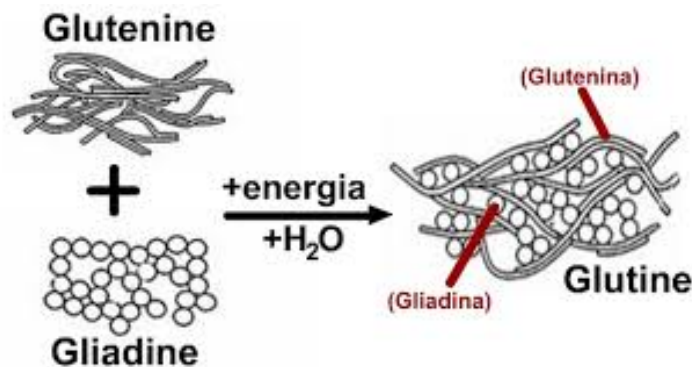


Figura 3: Formazione del glutine.

Non è stato attribuito alcun valore nutrizionale al glutine (Ciccocioppo R et al., 2005), mentre il suo ruolo nella patogenesi della malattia celiaca è stato abbondantemente verificato. La caratteristica fondamentale del glutine è l'elevata presenza degli aminoacidi glutammina e prolina, caratteristica che conferisce a tale composto spiccate proprietà antigeniche quali l'attivazione del sistema maggiore di istocompatibilità di classe II, la conformazione ad α -elica e l'impossibilità ad essere digerito da parte degli enzimi intestinali. Sembrerebbe che diversi peptidi del glutine siano coinvolti nella patogenesi della malattia anche se in modo differente: alcuni frammenti sono "tossici" e altri "immunogenici". Un frammento viene definito "tossico" se è in grado di indurre direttamente danni alla mucosa sia *in vitro* (ovvero quando aggiunto in coltura alla biopsia della mucosa duodenale), sia *in vivo* sull'intestino prossimale e distale. Al contrario un frammento è definito "immunogenico" se è in grado di stimolare in modo specifico le linee di cellule T derivati dalla mucosa digiunale o dal sangue periferico dei pazienti celiaci (Ciccocioppo R et al., 2005). Tra i vari peptidi derivati dalla digestione del glutine, il cosiddetto "33-mer" sembra possedere un ruolo cruciale: costituito da 33 aminoacidi, contiene diverse sequenze

immunodominanti in grado di dare il via alla cascata fisiopatologica della malattia (Catassi C, Copparoni R et al., 2015). Una grande quantità di persone non è in grado di tollerare il consumo di grano a causa della dannosa risposta immunitaria alle proteine del glutine. Quindi, nonostante la presenza di un così grande consumo di grano in tutto il mondo, sono stati segnalati molteplici casi di intolleranza nei suoi confronti (Sharma N et al., 2020). La perdita di tolleranza al glutine può verificarsi in qualsiasi momento della vita di un soggetto anche in conseguenza di altri fattori scatenanti oltre al glutine stesso: infezioni gastrointestinali, farmaci, l'interferone α e la chirurgia sono stati tutti riconosciuti come potenziali fattori (Al-Toma A et al., 2019). Mentre la celiachia è un disordine autoimmune causato dalle proteine del glutine, esistono altre manifestazioni patologiche correlate a componenti non prolaminici del grano, ovvero: la *NCGS*, in cui i pazienti manifestano sintomi simili a quelli della celiachia che effettivamente si risolvono quando il glutine viene rimosso dalla dieta anche se tali soggetti non risultano positivi ai test diagnostici per il morbo celiaco, e l'allergia al grano, ovvero una condizione derivante dal contatto, dall'inalazione o dall'ingestione di grano associata al glutine ed ad altre proteine e carboidrati del grano come oligo/monosaccaridi e i polioli (FODMAPs). Questa allergia al grano include l'*asma di Baker*, una risposta allergica respiratoria causata dall'esposizione alla polvere di farina di grano e basata su una risposta immunitaria IgE- mediata causata dall'ingestione di grano (Tabella I).

I FODMAPs sono uno dei principali componenti del grano implicati nell'intolleranza allo stesso: si tratta di carboidrati a catena corta composti da fruttani e galatto-oligosaccaridi presenti naturalmente in molti alimenti (come, ad esempio, il lattosio nel latte, il fruttosio libero nella frutta, i fruttani nel grano e i galatto-oligosaccaridi nei legumi). L'uomo è carente degli enzimi necessari alla scomposizione dei FODMAPs che dunque vengono assorbiti lentamente nell'intestino tenue e passano non digeriti nell'intestino crasso dove vengono rapidamente fermentati dai batteri presenti producendo gas e provocando distensione delle pareti intestinali. Tutto questo nella maggior parte degli individui si risolve in maniera asintomatica, ma nei pazienti con sindrome dell'intestino irritabile o malattia infiammatoria intestinale, può produrre invece vari sintomi come flatulenza, gonfiore, mal di stomaco, costipazione o diarrea (Sharma N et al., 2020). Di fatto, esistono diversi modi in cui i componenti alimentari possono scatenare tali sintomi: è stato dimostrato che

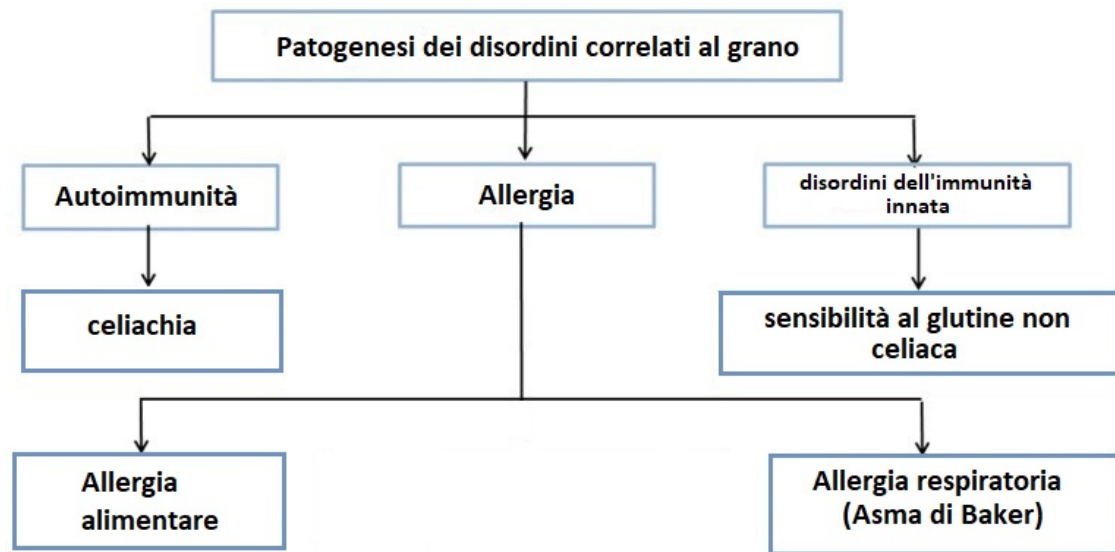


Tabella I: Principali disordini correlati al contatto con il grano e relative patogenesi.

nel lume intestinale la commistura dei vari fattori dietetici può diventare il substrato ottimale per una digestione mediata dal microbiota con conseguenti aumento del volume d'acqua, della produzione di gas colico, innesco del rilascio di mediatori infiammatori e l'attivazione del sistema immunitario; tutto questo comporta la stimolazione dei meccanorecettori e delle vie nervose sensoriali responsabili dell'ipersensibilità viscerale e della generazione di sintomi gastrointestinali funzionali (Calasso M et al., 2018). Si è dimostrato come la rimozione dei FODMAPs della dieta comporti un miglioramento dei sintomi gastrointestinali nei soggetti affetti da *NCGS* e sindrome dell'intestino irritabile (Biesiekierski J et al., 2013). Tra i fattori ambientali da tenere in considerazione va menzionata l'infezione da Epstein-Barr Virus (EBV) che è stato associato alla condizione di celiachia refrattaria, una rara complicanza della malattia (< 1% dei casi) caratterizzata dal mancato miglioramento istologico e clinico dopo 12 mesi di dieta aglutinata unitamente alla possibilità di evoluzione in linfoma. In particolare, EBV sembra essere implicato in alcuni casi di Linfoma T Associato ad Enteropatia (EATL) ed il virus attivo è stato ritrovato nelle biopsie intestinale di più del 70% dei pazienti con celiachia refrattaria (Kinross-Wright J et al., 2018). Un altro virus, il Rotavirus, sembrerebbe invece giocare un ruolo nella patogenesi della stessa celiachia (Sharma N et al., 2020): una sequenza peptidica riscontrata nel siero di pazienti celiaci non trattati sembra

condividere un alto grado di omologia con la proteina sierica neutralizzante VP7 (presente nel genoma del Rotavirus), ma anche con la HSP60 (*Heat-Shock Proteins*, proteine indotte dallo shock), la desmogleina, il recettore Toll-like 4 (TLR4) e con la transglutaminasi tissutale (tTG). In effetti, gli Abs per questa sequenza peptidica si legano all'endomisio; è stato dimostrato che questi autoanticorpi hanno conseguenze funzionali sull'attivazione di TLR4 e sulla permeabilità delle cellule epiteliali (Troncone R e Auricchio S, 2007). A supporto di queste osservazioni, la vaccinazione contro il Rotavirus sembra ridurre significativamente il rischio di malattia celiaca (Caio G et al., 2019).

Anche la gestione dell'alimentazione nel primo anno di vita e il momento in cui viene iniziata l'assunzione di glutine durante l'infanzia sono determinanti per la suscettibilità alla malattia: di fatto, l'introduzione di glutine prima dei 4 mesi sembra aumentare la probabilità di sviluppare la patologia mentre la somministrazione dello stesso dopo i 7 mesi comporta un rischio solo marginale (Sharma N et al., 2020).

Fattori individuali

Diversi studi hanno verificato come la predisposizione genetica occupi un ruolo rilevante nella patogenesi della malattia celiaca. E' stata infatti dimostrata una prevalenza della patologia pari al 10-15% tra i familiari di primo grado di un paziente affetto (Rugarli C, 2016); inoltre, il fatto che l'elevata concordanza tra gemelli monozigoti (75-80%) (Caio G et al., 2019) sia nettamente superiore rispetto a quella tra fratelli HLA-identici, indica come anche i geni non-HLA svolgono un ruolo importante (Caio G et al., 2019). È necessario ricordare come oltre il 90% dei pazienti celiaci presenti la variante genica HLA DQ2 (anche noto come DQ2.5) (Sollid L e Jabri B, 2011) con i relativi alleli HLA DQA1*0501 e DQB1*0201 e che la maggior parte dei pazienti rimanenti esprima invece la variante HLA DQ8 (alleli HLA DQA1*0301 e DQB1*0302). Nonostante ciò bisognerebbe tenere in considerazione il fatto che queste varianti geniche siano presenti nel 25-30% della popolazione generale ma solo il 3% di questi individui va incontro allo sviluppo della malattia (Caio G et al., 2019); pertanto, possedere queste varianti geniche rappresenterebbe un fattore necessario ma non sufficiente allo sviluppo della patologia (Rugarli C, 2016). HLA-DQ2 e HLA-DQ8 sono recettori di superficie situati

sulle cellule presentanti l'antigene (APC) e contenenti tasche cariche positivamente che dunque attraggono particelle cariche negativamente quali le molecole di glutine. In bambini aventi un parente di primo grado celiaco e portatori della variante DQ2 in omozigosi, il rischio di sviluppare precocemente la malattia sembrerebbe notevolmente aumentato (Caio G et al., 2019). La frequenza dei portatori dell'allele HLA-DQB1*0201 tra i malati sembra essere del 94,94%, il che significa che solo il 5,06% della popolazione celiaca manca completamente di questa variante allelica e se si considera solo la popolazione pediatrica, si ottengono cifre simili: il 94,69% dei bambini malati presenta l'allele HLA-DQB1*0201, mentre solo il 5,31% manca di una copia di questa variante allelica. Infine, considerando i pazienti celiaci anche affetti da diabete mellito di tipo I, la frequenza dei malati non HLA-DQB1*0201 scende a 3,65% (Poddighe D et al., 2020). I pochissimi pazienti affetti da celiachia che non presentano le varianti HLA-DQ2 o HLA-DQ8, sembrano possedere invece le varianti HLA-DQ7 o HLA-DQ2.2 con uno, ma non entrambi, gli alleli DQA1*05 o DQB1*02 normalmente presenti in HLA-DQ2. Queste varianti sembrano però comportare un rischio minore di sviluppare la malattia (Sollid L e Jabri B, 2011). La maggior parte degli individui positivi a HLA-DQ7 presentano gli alleli DQA1*05 e DQB1*0301 (DQ7.5).

In generale, la frequenza dei pazienti affetti da celiachia HLA-DQ7-positivi, unitamente a quelli presentanti altri DQ a rischio, varia dallo 0,4% al 3,6% (Rouvroye M et al., 2019). Inoltre, sembrerebbe che i pazienti con una doppia copia di HLA-DQB1*02 mostrino più spesso il fenotipo classico con atrofia dei villi rispetto a quelli con una singola copia di questo allele, mentre il numero di copie non sembra influenzare la presenza di diarrea, l'età alla diagnosi e la frequenza di associazione tra celiachia e diabete mellito di tipo 1 (Bajor J et al., 2019).

È noto che in corso di malattia celiaca si verifichi lo sviluppo di Abs diretti contro la tTG, un membro della famiglia delle transglutaminasi, enzimi calcio-dipendenti il cui compito è quello di trasportare catene peptidiche da una proteina all'altra (fenomeno noto anche come *cross-linking*). La tTG risulta fondamentale nella riparazione delle ferite, realizzando il cross-linking delle proteine della matrice extracellulare (Rugarli C, 2016). L'enzima tTG è presente sia nel citosol che nello spazio extracellulare. Nel citosol, si trova legato ad una molecola di GTP (guanositri-fosfato) e risulta cataliticamente inattivo. Una volta trasportato a livello extracellulare, l'enzima lega il calcio guadagnando una conformazione aperta

e potendo esercitare la sua azione catalitica (Sollid L e Jabri B, 2011) (Figura 4). L'enzima si attiva anche in corso di malattia celiaca, al seguito dalla risposta infiammatoria e al crearsi di condizioni riducenti (Sharma N et al., 2020). L'enzima ha come bersaglio specifici residui di glutammina. Come primo passo nella reazione enzimatica, il residuo di glutammina crea un legame tioestere con la cisteina del sito attivo della tTG. Si viene così a formare un intermedio che a sua volta reagisce con un gruppo amminico primario, come un residuo di lisina, comportando la formazione di un reticolato covalente di isopeptidi attraverso un processo denominato transamidazione. In alternativa, l'intermedio può reagire con acqua: il residuo di glutammina viene convertito in glutammato in un processo chiamato deamidazione (Sollid L e Jabri B, 2011).

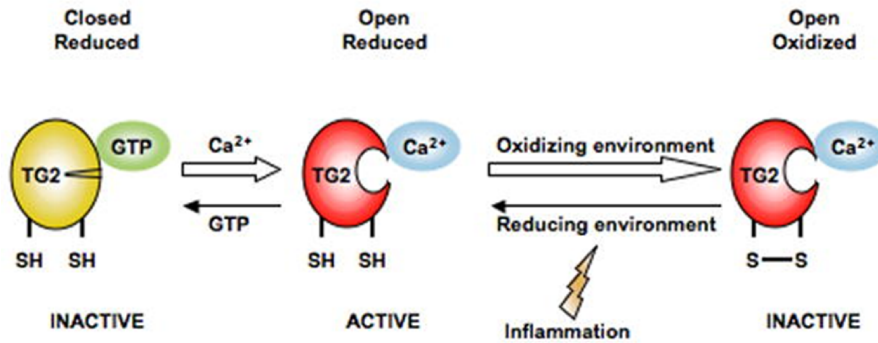


Figura 4: Attivazione della tTG (la spiegazione è data nel testo).

L'attività deaminante trasforma i residui di glutammina neutri in acido glutammico caricato negativamente. L'introduzione di cariche negative nei peptidi del glutine in posizioni specifiche favorisce la loro interazione con gli aminoacidi basici situati nelle posizioni di ancoraggio delle molecole HLA-DQ2 e DQ8, migliorando il legame peptidico e la stimolazione delle cellule T. (Ciccocioppo R et al., 2005) (Figura 5).

Sono stati identificati più di 15 diversi epitopi del glutine che possono essere riconosciuti nel contesto di HLA-DQ2 o HLA-DQ8. Recentemente sono stati caratterizzati anche epitopi derivanti dall'orzo e dalla segale: come precedentemente detto, la maggioranza di questi epitopi contiene residui di glutammina presi di mira dalla tTG e quindi convertiti in residui di glutammato da una reazione di deaminazione (Sollid L e Jabri B, 2011). In corso di malattia celiaca la zonulina, una proteina modulatore delle giunzioni tra gli enterociti coinvolta nella regolazione

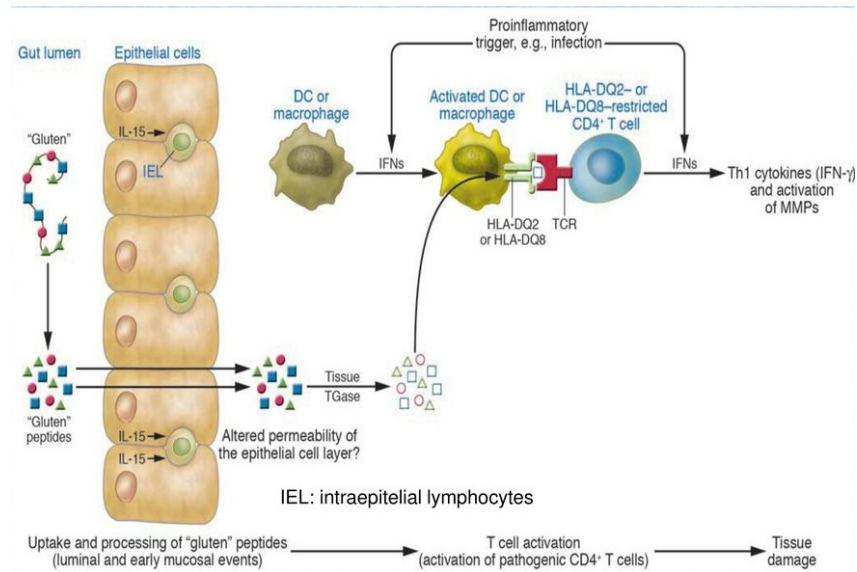


Figura 5: Patogenesi della malattia celiaca.

della permeabilità intestinale, subisce una deregolazione interrompendo l'integrità delle giunzioni tra le cellule e aumentando il movimento paracellulare dei frammenti di glutine resistenti alle proteasi (Sharma N et al., 2020). Inoltre, il recettore della transferrina CD71, normalmente espresso sul lato basolaterale degli enterociti, viene iper-espresso sul lato luminale durante la fase acuta della malattia, portando a una transitosi inversa dei complessi gliadina-IgA proteggendo i frammenti di gliadina dalla degradazione lisosomiale e promuovendo l'ingresso di peptidi dannosi nella lamina propria intestinale (Caio G et al., 2019). Sembrerebbe che le cellule epiteliali intestinali abbiano la capacità di rilasciare vescicole non dissimili dagli esosomi e morfologicamente comparabili a quelle secrete dalle APC: è stato infatti dimostrato che gli esosomi derivati da cellule epiteliali intestinali esprimono molecole HLA di classe II e complessi peptidici (Ciccocioppo R et al., 2005).

Un ulteriore fattore individuale da tenere in considerazione è il microbiota intestinale: alcuni studi hanno dimostrato che i pazienti con malattia attiva presentano alterazioni delle composizioni di microbiota fecale e duodenale rispetto agli individui sani, alterazioni parzialmente ripristinate dopo il trattamento con una dieta priva di glutine. In particolare, sono stati rilevati cambiamenti nella quantità di *Firmicutes* e *Proteobacteria* sia nei bambini che negli adulti con celiachia attiva. Altri studi hanno riportato una riduzione della percentuale di batteri protettivi e

antinfiammatori come il *Bifidobacterium* e un aumento nella proporzione di batteri Gram-negativi come *Bacteroides* ed *E. Coli*. Nei bambini, è stato verificato un aumento di *Staphylococcus* e *Clostridium*, unitamente ad una diminuzione in *Lactobacillus* (Verdu EF et al., 2015).

1.4 Diagnosi e Terapia

La diagnosi di malattia celiaca si basa fundamentalmente sull'impiego di due tecniche: test sierologici di ricerca anticorpale e biopsie duodenali in corso di endoscopia. Il test sierologico viene eseguito su pazienti con alcuni sintomi specifici quali diarrea cronica, malassorbimento dei nutrienti, anemia da carenza di ferro, folati, vitamine E, D e K che si traducono in perdita di peso, osteoporosi, ipocalcemia e aumento inspiegabile delle transaminasi (Sharma N et al., 2020). Nei bambini, un ritardo della crescita e una bassa statura dovrebbero porre il sospetto di malattia. Negli adulti, invece, a far sorgere il sospetto sono i cambiamenti della funzione riproduttiva quali menarca tardivo, amenorrea, aborti ricorrenti, parto prematuro, menopausa precoce o variazioni nel numero e nella mobilità degli spermatozoi (Caio G. et al., 2019). Non è consigliabile, in presenza di tali sintomi, iniziare primariamente una dieta aglutinata: a causa di una crescente consapevolezza riguardo questa malattia, le persone spesso scelgono di adottare una dieta priva di glutine prima dei test diagnostici, ma la risposta sintomatica a tale dieta è un cattivo previsore della diagnosi di celiachia, come mostrato da studi in doppio cieco controllati con placebo (Silvester J e Duerksen D, 2013). Gli Abs specifici per la celiachia sono i tTGA, gli AGA e gli EMA. Sebbene siano stati i primi ad essere utilizzati, gli AGA hanno dimostrato di possedere bassi livelli di specificità e sensibilità e dunque sono sempre meno utilizzati nei tests diagnostici. Tuttavia gli Abs contro la gliadina deaminata sono risultati di particolare aiuto per la diagnosi di celiachia in bambini al di sotto dei due anni di età e sono dunque ampiamente utilizzati in questa popolazione pediatrica. I tTGA e gli EMA sono ricercati applicando due metodologie differenti e più precisamente i primi indagati tramite ELISA ed i secondi attraverso immunofluorescenza indiretta. Esistono entrambi sotto forma di Abs IgA ed IgG, sebbene questi ultimi vengono indagati solo in caso di appurato deficit selettivo di IgA.

La biopsia duodenale viene proposta come test di conferma e, affinché risulti affidabile, devono essere fornite almeno quattro biopsie correttamente orientate (Rugarli C, 2016). Per una corretta esecuzione andrebbero prelevati almeno 4 frammenti dalla seconda/terza porzione del duodeno e almeno uno dal bulbo (Catassi C, Copparoni R et al., 2015). Anche gli individui sieronegativi devono sottoporsi a biopsia se presentano segni e sintomi altamente sospetti poiché, nonostante i progressi tecnologici, nessun test anticorpale attualmente utilizzabile presenta specificità e sensibilità pari al 100%. Pazienti pediatrici con titoli elevati (oltre 10 volte il limite) di Abs tTGA ed EMA, con positività HLA-DQ2/HLA-DQ8 e presenza di segni o sintomi indicativi di malattia possono evitare la biopsia duodenale come raccomandato dalle linee guida della Società Europea di Gastroenterologia Pediatrica Epatologia e Nutrizione (Caio G et al., 2019). Le classiche lesioni istologiche riscontrabili sono l'atrofia dei villi, l'iperplasia delle cripte e l'aumento dei linfociti intraepiteliali (IELs). L'analisi istologica viene eseguita utilizzando la classificazione MARSH (*Mucosal Algorithmic Rules for Scoring Histology*) (Sharma N et al., 2020), passando da un grado 0, ovvero una mucosa normale, al grado 3, ovvero una mucosa completamente alterata che si declina in tre sfumature di atrofia (vedi Tabella II e Figura 6):

Grado MARSH	IELs/100 enterociti	Iperplasia delle cripte	Villi
0	< 30	Normale	Normali
1	> 30	Normale	Normali
2	> 30	Aumentata	Normale
3a	> 30	Aumentata	Leggera atrofia
3a	> 30	Aumentata	Marcata atrofia
3a	> 30	Aumentata	Totale atrofia

Tabella II: Criteri di classificazione MARSH

La classificazione MARSH articola lo spettro immunopatologico dei cambiamenti della mucosa indotti dal glutine andando a riconoscere sia delle risposte immuni di tipo innato che adattative basate sulle cellule T. Attraverso questa classificazione gli obiettivi diagnostici sono stati notevolmente ampliati nel corso degli anni consentendo a innumerevoli pazienti di accedere ad una dieta priva di glutine quando, sulla base dei criteri precedenti, sarebbe stato negato loro un trattamento così vitale (Ensari A e Marsh MN, 2019).

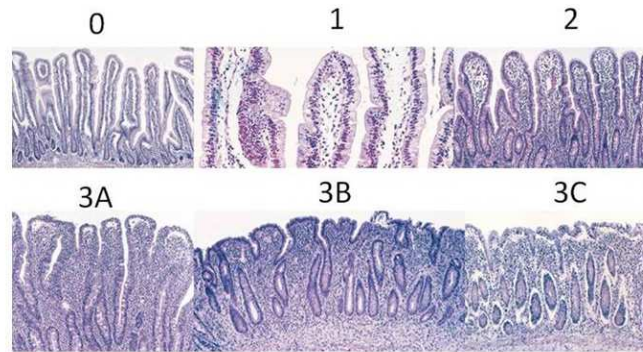


Figura 6: Classificazione istologia MARSH

Una seconda biopsia va considerata nel caso di pazienti che, pur seguendo una dieta senza glutine, rimangono sintomatici (Catassi C, Copparoni R et al., 2015). Va ricordato che la ricerca della predisposizione tramite tipizzazione HLA non può essere utilizzata come conferma diagnostica vista l'elevata prevalenza che i geni DQ2/8 mantengono nella popolazione generale (Rugarli C, 2016).

Come aiuto al processo diagnostico può essere utilizzata la cosiddetta "regola quattro su cinque" che indica come quattro su cinque dei seguenti criteri siano sufficienti a stabilire la diagnosi di malattia celiaca: (1) segni e sintomi tipici (diarrea e malassorbimento); (2) positività anticorpale; (3) positività HLA-DQ2 e/o HLA-DQ8; (4) danno intestinale (cioè atrofia dei villi e lesioni minori); (5) risposta clinica alla dieta aglutinata (Caio G et al., 2019).

Le tempistiche della diagnosi sono essenziali: prima della stessa, la qualità della vita delle persone celiache è molto più bassa rispetto a quella della popolazione generale. Dopo la diagnosi, tuttavia, la qualità della vita migliora sostanzialmente a livelli simili rispetto alla popolazione generale. Questi miglioramenti sono riconosciuti da numerosi studi e sono presenti dati che mostrano come la qualità della vita di chi ha ricevuto la diagnosi nel 2015 risultava nettamente superiore rispetto a chi l'aveva ricevuta nel 2006, suggerendo che la diagnosi stessa venga sempre più spesso raggiunta quando la gravità dei sintomi e delle condizioni mediche associate alla celiachia risulti meno grave (Violato M e Gray A, 2019).

Per quanto riguarda la terapia, essa si basa fundamentalmente sul seguire una rigorosa dieta priva di glutine per tutta la vita e questo, nella maggior parte dei pazienti, porta alla scomparsa o alla significativa riduzione del titolo anticorpale entro 12 mesi (18-24 mesi se molto elevato) insieme alla ripresa dei villi intestinali.

Va comunque ricordato che questi risultati cruciali sono accompagnati da alcuni svantaggi, tra cui un impatto negativo sulla qualità della vita, problemi psicologici, paura della contaminazione involontaria con il glutine (Caio G et al., 2019). Dunque, si tratta in realtà di una terapia molto complessa: circa il 40% dei pazienti non è soddisfatto del proprio regime alimentare e vorrebbe esplorare trattamenti alternativi (Caio G et al., 2019).

Negli anni '70 -'80, la celiachia era considerata una malattia dei bambini piuttosto rara e la restrizione nei confronti del glutine veniva relativamente ignorata sia dai professionisti che dalla popolazione generale. Fortunatamente, con la comprensione dell'importanza di questa terapia anche la società si è adattata: ristoranti, hotel, mense scolastiche e persino compagnie aeree hanno iniziato a offrire pasti cosiddetti "*gluten free*" e le informazioni sugli allergeni sono regolarmente elencate nei menu (Makovsky P et al., 2020). Esistono cereali che possono essere utilizzati dai pazienti: il grano saraceno, il miglio, il riso e la quinoa sono cereali naturalmente privi di glutine dunque sicuri da mangiare, a condizione che non vi sia stata contaminazione incrociata con glutine durante la produzione o la preparazione (Silvester J e Duerksen D, 2013). In ogni caso, esistono cereali diversi dal grano che però presentano comunque glutine e dunque devono essere evitati, come la segale e l'orzo. Diversi studi hanno recentemente dimostrato che l'avena può essere tollerata da molti pazienti celiaci (Bold J e Rostami K, 2011). La maggior parte dei pazienti con celiachia è di fatto in grado di tollerare l'avena. Tuttavia, è necessario prestare attenzione poiché è stato suggerito che l'avena potrebbe esercitare un effetto latente, andando a sconvolgere i campioni biotici solamente dopo diversi anni di consumo. Sarebbe quindi prudente suggerire ai pazienti che desiderano includere l'avena nella loro dieta l'esecuzione di biopsie annuali per garantire che non si siano verificati cambiamenti subclinici. I pazienti con celiachia o dermatite erpetiforme che desiderano includere l'avena nella loro dieta devono anche assicurarsi che il prodotto consumato non sia contaminato con glutine durante la crescita o durante il processo di macinazione (Haboubi N et al., 2006). I pazienti devono porre particolare attenzione nella scelta degli alimenti poiché ad oggi molti di questi contengono farina utilizzata come addensante o eccipiente (cosa che accade ad esempio per affettati ed insaccati, gelati confezionati e molti cibi in scatola) (Rugarli C, 2016). L'indiscrezione alimentare intenzionale è spesso una certezza, tuttavia, può esserci

una consapevolezza limitata riguardo le fonti alimentari contenenti glutine. Il glutine può essere ritrovato in un'elevatissima quantità di prodotti, presente addirittura nelle capsule di alcune pillole e nelle ostie della comunione, nonché in una miriade di prodotti alimentari industriali (Freeman HJ, 2008). Di fatto, una dieta totalmente priva di glutine risulta quasi impossibile a causa della frequente presenza di tracce dello stesso: si stima che il contenuto di glutine assunto da alimenti *gluten free* sia compreso tra 5 e 50 mg. I livelli consentiti di glutine variano in diverse aree del globo: l'Organizzazione Mondiale della Sanità e la Commissione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura raccomandano che siano presenti ≤ 200 parti per milione (ppm) di glutine negli alimenti *gluten free*. Un'assunzione di glutine inferiore a 10 mg al giorno è generalmente considerata sicura per la maggior parte dei pazienti celiaci e non si ritiene che possa causare anomalie istologiche (Bold J e Rostami K, 2011). Uno studio effettuato da C. Catassi e collaboratori ha dimostrato che l'effetto dell'ingestione cronica di una piccola quantità di gliadina in bambini celiaci è strettamente dose dipendente: confrontando i cambiamenti morfologici tra le mucose digiunali di bambini alimentati per quattro settimane con una dose di 100 mg al giorno di gliadina con quelli ottenuti sulle mucose di bambini alimentati per lo stesso periodo di tempo con una dose di 500 mg al giorno, quest'ultimi hanno mostrato alterazioni morfologiche decisamente più marcate (Catassi C, Rossini M et al., 1993). Risulta sicuramente necessaria una costante valutazione dell'aderenza dei pazienti a questa particolare terapia: secondo alcuni autori, i fattori che contribuiscono ad una maggiore aderenza sono una buona conoscenza della malattia e del suo trattamento, un alto livello di istruzione, un elevato stato economico, il sesso femminile, la giovane età, possedere un'elevata autostima, i buoni voti a scuola, una buona disponibilità ed etichettatura dei prodotti, un buon contatto con un medico ed un dietista e infine l'appartenenza alla *Celiac Society*. Al contrario, i fattori responsabili di una scarsa aderenza sono il cattivo gusto dei prodotti senza glutine, l'alto prezzo e la scarsa disponibilità degli stessi, l'età adolescenziale, l'assenza di sintomi immediati a seguito dell'assunzione di piccole quantità di glutine e la scarsa consapevolezza della malattia (Elli L e Marinoni B, 2019). Di fatto gli alimenti senza glutine possono essere piuttosto costosi, limitati nella loro appetibilità e, soprattutto in alcuni paesi in via di sviluppo, difficili da ottenere. Inoltre, a volte i gruppi di supporto e Internet rappresentano tutti potenziali fonti di informazioni inesatte (Freeman HJ, 2008).

Attualmente anche molti individui sani stanno adottando una dieta priva di glutine: effettivamente questa tipologia di regime alimentare è diventata di moda tra la popolazione generale per i suoi presunti effetti benefici sulla salute umana ed è anche la dieta più frequentemente suggerita nei pazienti che soffrono di sindrome dell'intestino irritabile (IBS) (Elli L e Marinoni B, 2019). Tuttavia questa particolare dieta può comportare diversi problemi: di fatto, la restrizione al glutine a lungo termine, se non viene sostenuta da una dieta varia e bilanciata, può comportare rischi per la salute tra cui carenze nutrizionali e problemi cardiovascolari. Pertanto, tutti coloro che seguono una dieta aglutinata (pazienti celiaci e soggetti sani) devono essere informati riguardo tali rischi. Le diete senza glutine sono infatti solitamente ricche di lipidi, zuccheri e sale, fornendo un apporto energetico più elevato rispetto a una dieta normale e contribuendo dunque ad aumentare il rischio di insorgenza di obesità, dislipoproteinemia, insulino-resistenza, sindrome metabolica o aterosclerosi (Makovicky P et al., 2020). Diversi studi hanno dimostrato come in particolare le pazienti celiache di sesso femminile abbiano un apporto energetico maggiore rispetto alla popolazione non celiaca e questo viene attribuito ad un aumento del consumo di *snacks* dolci, ricchi di grassi saturi. Queste donne celiache presentano anche un apporto significativamente più basso di fibre. Sono stati infatti verificati un aumento dell'incidenza di steatosi epatica non alcolica (NAFLD), aumento di peso, un peggior profilo lipidico e livelli elevati di glucosio nel sangue in corso di dieta aglutinata. Tutto questo potrebbe essere dovuto ad una regressione dell'infiammazione e dell'atrofia della mucosa indotta dalla dieta che comporti un netto miglioramento dell'assorbimento intestinale di nutrienti durante uno stato iperfagico compensativo (Valvano M et al., 2020). Non è comunque necessario assumere integratori di particolari nutrienti, se si segue una dieta aglutinata varia ed equilibrata (Catassi C, Copparoni R et al., 2015). Per quanto riguarda il follow-up, la prima visita è solitamente pianificata entro 6 mesi dalla diagnosi e dall'impostazione della terapia e successivamente ogni 12-24 mesi o ogni 3-6 mesi in caso di complicanze. Gli scopi della visita sono confermare l'aderenza alla dieta aglutinata, escludere l'insorgenza di malattie autoimmuni e metaboliche e consentire la diagnosi precoce di eventuali complicanze. I pazienti devono sottoporsi a un consulto con un dietologo ed eseguire esami del sangue che includano un emocromo completo, IgA anti-tTGA (o IgG in caso di carenza di IgA), ormone stimolante la tiroide (TSH), anti-tiroidperossidasi, anti-tiroglobulina, ferritina, acido folico,

vitamina D3, transaminasi e profilo metabolico completo (Caio G et al., 2019).

È doveroso ricordare il caso della donna in gravidanza: in questa tipologia di pazienti una malattia non diagnosticata aumenta il rischio relativo di aborti multipli e bambini a basso peso alla nascita di 8,9 volte rispetto alle pazienti trattate che, seguendo una dieta priva di glutine, beneficiano di una riduzione di 9,18 volte nel tasso di aborto e di una riduzione pressoché totale della prevalenza di bambini a basso peso alla nascita. La celiachia non diagnosticata è più comune della maggior parte delle condizioni ampiamente sottoposte a screening che possono portare a un risultato sfavorevole della gravidanza ed anche molto più facilmente curabile: il trattamento dietetico è semplice ed efficace e riduce il numero di gravidanze ad esito negativo (Martinelli P et al., 2000).

1.5 Ruolo dell'immunità nella patogenesi del morbo celiaco

Essendo la celiachia una patologia autoimmune, il sistema immunitario è ovviamente coinvolto nella patogenesi di tale condizione. Il grande stato infiammatorio che viene a crearsi al seguito dei vari processi precedentemente descritti è il frutto di una tempesta citochinica che può essere anche rilevata perifericamente: di fatto, la concentrazione di varie citochine è risultata significativamente elevata nel siero di bambini celiaci rispetto ai controlli, suggerendo l'esistenza di una risposta immunologica rilevabile sistemicamente anche in quei pazienti senza segni evidenti di malattia cronica (Björck S et al., 2014). Il sistema immunitario si divide in due componenti principali: l'immunità innata e quella specifica. La prima consiste in meccanismi di difesa cellulari e biochimici pronti a reagire con rapidi ed in maniera stereotipata mentre la seconda è caratterizzata da una spiccata specificità per diverse molecole, dalla capacità di “memorizzare” e di rispondere più vigorosamente a esposizioni ripetute ad uno stesso antigene (Abbas A et al., 2010). Entrambe giocano un ruolo nella patogenesi del morbo celiaco.

Immunità specifica

Una volta penetrata nella parete intestinale, la gliadina viene riconosciuta dall'enzima tTG formando così un complesso gliadina-tTG che funge da nuovo epitopo. La

deaminazione prodotta dalla tTG sulla gliadina ne aumenta enormemente l'affinità per le molecole HLA-DQ2 e -DQ8 comportando così una più diretta attivazione dei linfociti T (Th1). Di fatto, la risposta immunitaria adattativa inizia con la presentazione di peptidi di glutine non digeriti tramite molecole HLA da parte di APC professionali ai linfociti T CD4 + nella lamina propria. Il riconoscimento e il legame dei recettori delle cellule T (TCR) con specifici complessi HLA-gliadina portano alla produzione di elevati livelli di citochine e molecole pro-infiammatorie quali l'interferone γ (IFN $-\gamma$), IL-21 e il fattore di crescita dei cheratinociti. Quest'ultimo induce iperplasia criptica e smussatura dei villi al seguito della morte delle cellule intestinali indotta dai linfociti citotossici (CTLs) intraepiteliali attivati dalla tempesta citochinica. Inoltre, l'iperproduzione di IL-15 in corso di malattia attiva causa una iper-espressione dei recettori CD94 e NKG2D sulle cellule Natural Killer (NKs) (Caio G et al., 2019). È noto che sotto gli stimoli infiammatori e/o di stress, gli enterociti esprimono non solo molecole HLA di classe I, ma anche molecole MHC di classe II e molecole HLA E che sono riconosciute dai suddetti recettori presenti sulle NK, ma anche sugli IELs (Ciccocioppo R et al., 2005). Tutto questo contribuisce alla formazione delle lesioni intestinali, all'infiammazione e alla differenziazione dei linfociti B mediata dalle cellule T-helper 2 esitando nella secrezione di Abs AGA, tGTA ed EMA considerati caratteristiche chiave del morbo celiaco (Sharma N et al., 2020). Tutto questo porta alla sublimazione dei processi di apoptosi enterocitaria con conseguenti atrofia dei villi, iper-proliferazione cellulare e iperplasia delle cripte. È quindi evidente il ruolo fondamentale svolto dall'immunità specifica nella patogenesi della malattia celiaca.

Immunità innata

L'immunità innata riconosce precisi schemi stereotipati di attivazione cellulare in risposta a diversi stimoli biologici e chimici. Attori principali di questa risposta sono i macrofagi, i monociti, le cellule dendritiche (DCs) e i polimorfonucleati. Queste cellule presentano sulla loro superficie dei recettori in grado di riconoscere profili molecolari (PRRs, *Pattern Recognition Receptors*) di molecole comunemente patogene (PAMPs, *Pathogen Associated Molecular Patterns*, profili molecolari associati ai patogeni) o pro-infiammatorie (DAMPs, *Damage Associated Molecular Patterns*, profili molecolari associati al danno). Tra i PRR, i Toll-like receptors

(TLRs) sono tra i più rappresentati e mediano la produzione di citochine e chemochine pro-infiammatorie che culminano nel reclutamento e nell'attivazione dell'immunità specifica (Abbas A et al., 2010). Sebbene siano stati pubblicati numerosi studi sull'azione svolta dalle cellule T in corso di malattia celiaca, poco si sa circa le prime fasi in cui il glutine inizia l'intero processo (Ciccocioppo R et al., 2005) anche se sembrerebbero esserci prove che la gliadina sia in grado di attivare l'immunità innata: in culture cellulari di monociti umani THP-1 esposti a gliadina digerita con pepsina e tripsina è stato riscontrato un aumento di produzione dose dipendente dell' IL-8, assente invece in culture in cui le cellule sono state sfidate con una miscela di proteine del grano funzionalmente omologhe alla gliadina ma private della componente immunogenica. Inoltre, dopo esposizione a gliadina, le DCs sembrano rispondere in modo simile all'LPS (lipopolisaccaride) batterico, aumentando oltre tutto la produzione di molecole costimolatorie. Ulteriori studi hanno verificato l'induzione, da parte di alcuni peptidi specifici della gliadina (più precisamente i peptidi p31-43 e p31-49), della produzione di IL-15 e Cox-2 nelle biopsie di pazienti affetti da celiachia. Anche il recettore per le chemochine CXCR3 sembra implicato nella risposta dell'immunità innata, amplificando la permeabilità intestinale attraverso l'attivazione di una *pathway* MyD88 mediata. Di fatto, l'attività svolta dalla gliadina a livello dell'immunità innata sembra essere legata alla stimolazione dei TLRs, di cui MyD88 è una proteina trasduttrice chiave (Junker Y et al., 2012). È stato dimostrato che le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs) e i monociti di pazienti celiaci rispondano a frazioni di gliadina digerite con pepsina (PDWGFs) attraverso un'importante secrezione di IL-1 β e IL-1 α e, seppur leggermente, IL-18. Sembrerebbe che le PDWGFs comportino la sintesi *de novo* della pro-IL-1 β , seguita da processi caspasi-1-dipendenti e dalla secrezione di IL-1 β matura. Tutto questo viene promosso dall'efflusso di ioni K⁺ e dallo stress ossidativo. In più, studiando PBMC MyD88^{-/-} e TRIF (TIR domain-containing adaptator inducing INF- β)^{-/-}, si evince che prima ancora dell'attivazione della caspasi-1, il segnale innescato dalle PDWGFs promuove un percorso del tipo MyD88/TRIF/NF- κ B (fattore nucleare KB) (Palova Jelinkova L et al., 2013). Lo studio di cellule murine naturalmente mancate del TLR4 per mutazione spontanea trattate con gliadina, paragonate alla controparte presentante il gene, ha dimostrato una netta discrepanza tra la produzione di IL-8 e TNF (*Tumor Necrosis Factor*, fattore di necrosi tumorale), ridotta al minimo nelle prime e aumentata nelle seconde. A riprova dell'impegno

della via del TLR4, culture cellulari di DCs primariamente trattate con anti-TLR4 e poi trattate con gliadina non hanno dimostrato alcun aumento di IL-8. Separando la gliadina in frazioni si è constatato che solo una di queste sembra possedere un'attività pro-infiammatoria: si tratta di una proteina di circa 15 KD che alla spettrometria di massa risulta appartenere al gruppo degli inibitori dell'amilasi e della tripsina (ATIs) (Junker Y et al., 2012). Queste molecole sembrano dunque svolgere un ruolo chiave nella risposta immunitaria innata in corso di malattia celiaca coinvolgendo il complesso recettoriale TLR4–MD2–CD14 con successiva up-regolazione dei marcatori di maturazione e rilascio di citochine pro-infiammatorie (Caio G et al., 2019). Sta emergendo quindi, nella collettività scientifica, una visione di quello che potrebbe essere il ruolo giocato dall'immunità innata in corso di malattia celiaca.

1.6 Gli inibitori dell'amilasi e della tripsina (ATIs)

Gli ATIs appartengono a una famiglia contenente più di 17 globuline solubili in acqua stabilizzate da legami disolfuro inter-molecolari e resistenti all'idrolisi contenute nel grano (Zevallos V et al., 2016; Bellinghausen I et al., 2018). Sappiamo che il glutine è costituito da una complessa miscela di gliadine monomeriche, glutenine polimeriche, albumine e globuline e proprio quest'ultime comprendono diverse famiglie proteiche come le β -amilasi, le perossidasi e, appunto, gli ATIs. Questi si trovano nell'endosperma dei semi delle piante dove giocano un ruolo nella regolazione del metabolismo dell'amido e nella germinazione dei semi nonché nella difesa naturale contro i parassiti e gli insetti (Cuccioloni M et al., 2017). Sono infatti sostanze biologiche bifunzionali che si legano all' α -amilasi e alla tripsina rendendole inattive, inibendo così le amilasi batteriche, quelle degli insetti e, sembrerebbe, anche quelle dei mammiferi (Tchewonpi S et al., 2019). Rispetto ad altri costituenti proteici, gli ATIs rappresentano una parte minore, ma comunque significativa, delle proteine totali del grano (2-4%) e, in media, una persona adulta viene esposta fino a 1 g di ATIs al giorno. Una volta ingeriti possono parzialmente sfuggire, grazie alla resistenza offerta dai ponti disolfuro, alla digestione proteolitica mediata dalla pepsina e dalla tripsina endogene, preservando le loro proprietà biologiche (Cuccioloni M et al., 2017). Analizzando le molecole queste mantengono importanti analogie a livello della struttura secondaria che, dunque, appare estremamente conservata

(Junker Y et al., 2012). Al loro interno infatti si riscontrano generalmente cinque catene ad α -elica e ricchi residui di cisteina formanti ponti disolfuro (Cuccioloni M et al., 2017). Gli ATIs sono caratterizzati dall'essere solubili in miscele di cloroformio e metanolo (CM) e per questo motivo sono stati chiamati “proteine CM” (Tchewonpi S et al., 2019). In base al loro peso molecolare possono essere ulteriormente suddivisi in monomeri (con un peso molecolare compreso tra 12 e 15 Kd), dimeri (24-30 Kd) e tetrameri (50-60 Kd) (Zevallos V et al., 2016). Le frazioni 0.19, appartenente al gruppo dei dimeri e CM3, appartenente a quello dei tetrameri, sono le più rappresentate (> 50% del totale) nonché quelle maggiormente implicate nell'attivazione del sistema immunitario, possedendo un'attività biologica cinque volte superiore alle frazioni monomeriche (Zevallos V et al., 2016). Importante è sottolineare come solo gli ATIs presenti nei cereali contenenti glutine risultino possedere questa azione poiché anche piante diverse dal grano, come segale e orzo, presentano inibitori bi-funzionali simili, ma questi mostrano solo una minima attività nei confronti delle vie implicate nella patogenesi della malattia celiaca (Bellinghausen I et al., 2018). L'azione svolta sul sistema immunitario è di fatto in fase di studio. Ci sono prove del potere allergizzante di queste molecole: in topi ai quali sono stati iniettati monociti e linfociti umani (PBMCs) da donatori sia allergici (ad erbe e pollini) che non, sfidati poi con una dieta contenente ATIs, è stato dimostrato un aumento delle IgE sia totali che specifiche nei primi, ma non nei secondi. Tale aumento non è stato riscontrato neanche in topi ai quali è stata somministrata una dieta priva di glutine (e quindi di ATIs). Questo aumento delle IgE è oltretutto affiancato da un correlato anatomico: l'ultimo tratto gastrointestinale dei topi, osservato tramite endoscopia, ha verificato la presenza di ipertrofia della muscosa ed ispessimento della parete IgE mediata (Bellinghausen I et al., 2018). Inoltre, alcune frazioni proteiche, in particolare CM3, hanno dimostrato la capacità di indurre la degranolazione dei basofili in soggetti allergici alle farine (Tundo S et al., 2018). In vari modelli animali l'ingestione di ATIs favorisce l'infiammazione intestinale e peggiora le allergie sia nutrizionali che respiratorie. In particolare, l'attivazione delle cellule dell'immunità innata in questi modelli risulta maggiore a livello dei linfonodi mesenterici rispetto alla lamina propria dell'intestino, suggerendo una rapida propagazione del segnale infiammatorio verso la periferia, probabilmente per migrazione delle cellule dendritiche e dei macrofagi intestinali poco dopo il loro contatto con gli ATIs. La semplice alimentazione con ATIs in quantità irrilevante dal punto

di vista calorico ed equivalente all'ingestione giornaliera media di grano nell'uomo promuove in questi modelli l'aumento di peso, la steatosi epatica, l'infiammazione e la fibrosi, nonché l'insulino-resistenza, insieme all'espansione della massa viscerale del tessuto adiposo e all'infiammazione (Ashfaq-Khan M et al., 2019).

Diversi studi stanno quindi verificando il ruolo di centralità che gli ATIs sembrano possedere nell'attivare una risposta immunitaria stimolando le cellule dell'immunità innata.

1.7 I recettori di tipo Toll

I recettori di tipo Toll (TLRs) rappresentano una famiglia di nove diversi recettori (TLR1- TLR9) espressi da molti tipi cellulari. Il loro ruolo principale, filogeneticamente conservato, è quello di riconoscere profili molecolari associati a patogeni o a danni apportati alle cellule dell'organismo. I TLR-1, -2, -4, -5 e -6 sono espressi sulla membrana esterna per sondare l'ambiente extracellulare mentre i TLR-3, -7, -8 e -9 sono intracellulari, esposti soprattutto sugli endosomi e sono in grado di riconoscere acidi nucleici a singolo o a doppio filamento. Strutturalmente parlando, i TLRs sono glicoproteine integrali di membrana contenenti residui ricchi in leucina e cisteina in grado di riconoscere i vari ligandi. Nella porzione interna invece è presente il cosiddetto dominio TIR (Toll- IL-1 receptor) essenziale per la trasduzione del segnale. La principale funzione di tali recettori è dunque quella di riconoscere e rispondere ad un'ampia varietà di molecole espresse da microrganismi (dall' LPS, alla flagellina, all' RNA virale solo per citare alcuni esempi) ma non dalle cellule sane dell'organismo, a meno che queste non abbiano subito un danno: ad esempio, le HPS che si liberano a seguito di uno stato di stress cellulare hanno la capacità di attivare i TLRs. Affinché tali recettori rispondano in modo più specifico in base al tipo di stimolo, vengono accompagnati da molecole accessorie in grado di riconoscere determinati ligandi, come la proteina MD2 (*Myeloid Differentiation Protein 2*) e la proteina CD14: la prima è in grado di legare un frammento dell'LPS detto lipide A e solo a quel punto l'antigene batterico può essere riconosciuto dal TLR4 (Figura 7a). Stesso compito per la seconda, che è ubiquitaria e può trovarsi sia in forma solubile che ancorata alla membrana cellulare tramite un'ancora di glicosilfosfatidilinositolo.

Funzionalmente parlando, quando i TLRs riconoscono i propri ligandi vengono innescate cascate di trasduzione del segnale che culminano nell'attivazione di fattori di trascrizione inducenti a loro volta l'espressione di geni legati alle risposte infiammatoria e antivirale. In seguito al riconoscimento dei rispettivi ligandi, si promuove l'aggregazione dei TLRs e ciò determina l'avvicinamento di due domini TIR. A questo punto vengono reclutate alcune proteine adattatrici che a loro volta avviano una trasduzione del segnale che comporta attivazione di proteine chinasi con conseguente modifica di diversi fattori di trascrizione, i più importanti dei quali sono l'NF- κ B, la proteina di attivazione 1 (AP-1) e il fattore di risposta all'interferone di tipo 3 e 7 (IRF-3 e IRF-7). Mentre l'IRF-3 e -7 promuovono la produzione di interferoni di tipo I a scopo antivirale, l'NF- κ B ed AP-1 sono responsabili dell'attivazione di vie infiammatorie che terminano con la produzione di citochine quali TNF e IL-1, chemochine (per esempio, CXCL8) e proteine di adesione endoteliale (per esempio, E-selectina). Ovviamente, affinché si attivi la via infiammatoria o quella antivirale devono essere reclutate molecole differenti: se viene ingaggiato l'adattatore TRIF verrà attivata la risposta IRF-3 e -7 mediata, se invece viene reclutato l'adattatore MyD88 verrà attivato l'NF- κ B. Tutti i TLRs, tranne il TLR-3, possono reclutare MyD88. Il TLR4 è in grado di attivare entrambe le vie. Per quanto riguarda il pathway infiammatorio questo si estrinseca, soprattutto, attraverso l'attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B nel seguente modo: al seguito del riconoscimento del ligando viene attivata una ubiquitina ligasi (TRAF) che aggiunge una catena di ubiquitina ad una proteina detta NEMO facente parte di un complesso noto come IKK. Questo comporta la fosforilazione e l'attivazione della chinasi IKK β che a sua volta fosforila l'I κ B α , ovvero l'inibitore di NF- κ B, comportandone la poliubiquitinazione e la conseguente degradazione a livello del proteasoma. L'I κ B α tiene normalmente legati ed inibiti i dimeri formanti l'NF- κ B che, una volta attivi, sono in grado di migrare nel nucleo per svolgere la loro funzioni di fattori di trascrizione nei confronti di geni legati all'infiammazione come quelli per l'IL-1 e il TNF (Figura 7b) (Abbas A et al., 2010).

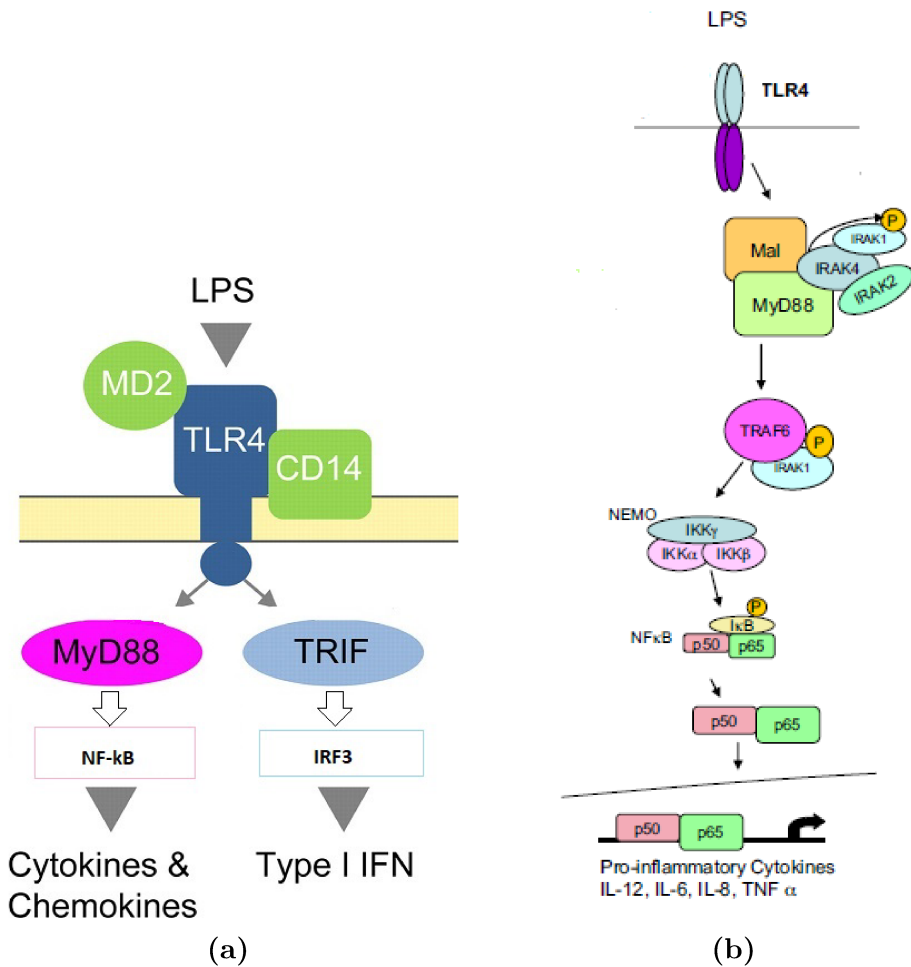


Figura 7: a) Il TLR4 ha la capacità di attivare sia la via pro-infiammatoria attraverso MyD88 che quella antivirale attraverso TRIF. b) Trasduzione del segnale pro-infiammatorio mediato dal TLR4 e attivazione del fattore di trascrizione NF-κB.

1.8 Interazione tra ATIs e TLR4

Diversi studi stanno cercando di caratterizzare il modo attraverso il quale gli ATIs inneschino uno stato pro-infiammatorio a livello intestinale e sono emerse prove dell'azione che essi svolgono nel promuovere l'attivazione del TLR4. Nel tentativo di identificare i componenti del grano effettivamente responsabili dell'avvio della risposta immunitaria innata, il cui ruolo è ancora poco definito nella patogenesi della malattia celiaca, gli ATIs si sono dimostrati potenti attivatori delle cellule

mieloidi. In particolare, gli ATIs sembrano coinvolgere direttamente il complesso TLR4- MD2-CD14 attivando sia la via dell'NF- κ B che quella dell'interferone, determinando l'up-regolazione dei markers di maturazione leucocitaria e il rilascio di citochine pro-infiammatorie (Zevallos V et al., 2016) (Figura 8). Studiando la biochimica di queste molecole è stato possibile verificare, mediante docking, come l'interazione tra la proteina CM3 e la struttura cristallina del complesso TLR4-MD2 avvenga preferenzialmente a livello della regione a foglietto β del TLR4 in una zona differente rispetto a quella designata per l'unione con MD2 o per la dimerizzazione dello stesso recettore. Inoltre, una volta avvenuto il legame, questo risulta essere stabilizzato da interazioni elettrostatiche non covalenti (Cuccioloni M et al., 2017). A riprova del fatto che gli ATIs attivino le cellule dell'immunità innata attraverso una via TLR4 mediata, cellule umane (HEK293) trasfettate con il complesso TLR4-CD14-MD2 e sfidate con ATIs rispondono producendo IL-8, al contrario di quelle non trasfettate (Junker Y et al., 2012). Stessa cosa sembra accadere quando cellule THP-1 vengono incubate con ATIs, producendo una risposta del tutto simile a quella ottenuta incubandole con LPS batterico, ovvero aumento in modo dose-dipendente la produzione di IL-8, IL-1 β , IL-6 e TNF α (Zevallos V et al., 2016). Gli ATIs hanno dimostrato di svolgere un'azione pro-infiammatoria TLR4 correlata anche *in vivo*: studiando due popolazioni di topi, una in cui è stato inattivato il gene codificante per il TLR4 ed una avente il gene normalmente espresso (*wild type*), è stato verificato che al seguito di somministrazione orale di ATIs solo nella popolazione *wild type* si riscontra una produzione di IL-8, IL-1 β e MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*). In ultimo, sfidando con ATIs biopsie di pazienti celiaci in remissione si verifica un aumentato riscontro di mRNA per la produzione di IL-8 (Junker Y et al., 2012). A causa dell'attività stimolante il TLR4 *in vivo* e della resistenza alla proteolisi, gli ATIs possono dunque esercitare un ruolo patogeno nelle malattie infiammatorie, metaboliche ed autoimmuni attivando l'immunità innata.

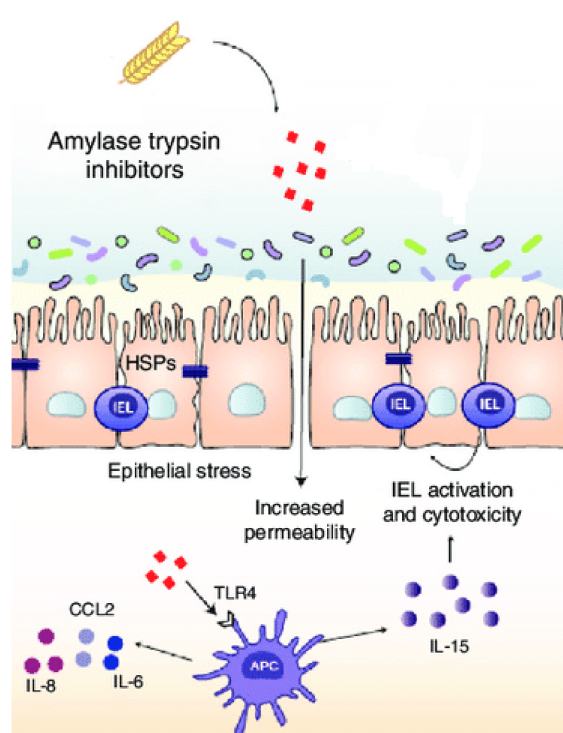


Figura 8: Attivazione delle cellule dell'immunità innata mediata dagli ATIs via TLR4: una volta attivate, le cellule cominciano a produrre citochine e chemochine pronfiammatorie.

Capitolo 2

Scopo del lavoro

Gli ATIs contenuti all'interno dei diversi tipi di cereali hanno dimostrato di possedere un'azione pro-infiammatoria attraverso la stimolazione delle cellule dell'immunità innata, attivando il recettore TLR4. In virtù di questo potrebbero giocare un ruolo, oltre a quello già ben caratterizzato del glutine, nella patogenesi della malattia celiaca. Nonostante ciò, non è ancora chiaro quale membro di questa famiglia proteica sia in grado di stimolare maggiormente il sistema immunitario e se la qualità del cereale nonché il luogo di coltivazione dello stesso ne influenzino l'attività biologica. Estrahendo gli ATIs contenuti in undici diverse specie di grano, ognuna delle quali coltivata in tre differenti ambienti (a Julich, in Germania, in due città italiane, Potenza ed Ancona) e sfidando con essi culture di linee cellulari umane THP-1, si è cercato di identificare l'inibitore bifunzionale avente la maggior attività biologica di stimolazione del sistema immunitario in dipendenza della specie di cereale e dell'ambiente geografico di coltivazione. Questo studio è stato portato avanti in collaborazione con il Dipartimento di Agraria dell'Università Politecnica delle Marche, che ha provveduto a fornire le diverse specie di grano e con il Dipartimento di Chimica dell'Università di Camerino, che ha provveduto all'estrazione e alla purificazione degli ATIs. In ultimo, ma non per ultimo, il gruppo del professor. Catassi, primario della Clinica Pediatrica, Ospedali Riuniti di Ancona, che ha coordinato tutta l'attività di ricerca svolta e rappresenta uno dei maggiori esperti internazionali nel campo della celiachia.

Capitolo 3

Materiali e metodi

3.1 Colture cellulari

Come modello sperimentale è stata usata la linea cellulare umana monocitica THP-1, derivata da un paziente affetto da leucemia monocitica acuta (Tsuchiya S et al., 1980). Tali cellule crescono in sospensione e sono state mantenute in coltura con il terreno RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) supplementato con siero fetale bovino (FBS) al 10%. La crescita delle cellule è avvenuta in incubatore a 37°C, in atmosfera contenente il 5% di CO₂. Il passaggio della linea cellulare era effettuato circa due volte la settimana quando la coltura raggiungeva una densità di circa 8×10^5 /ml. Per il passaggio della coltura, le cellule venivano trasferite in provette di polipropilene e centrifugare a 4°C per 5 minuti a 1220 rpm in una centrifuga Varifuge 3.2S (Heraeus, Sepatech, GmbH). Al termine della centrifugazione il surnatante era eliminato e le cellule erano risospese alla concentrazione di 2×10^5 cellule/ml in RPMI di fresca preparazione al 10% FBS. Le cellule THP1 sono state periodicamente controllate per l'assenza di contaminazione da Mycoplasma utilizzando il kit N-GARDE (Mycoplasma PCR Reagent set (Euroclone, Milano, Italia)).

3.2 Coltivazione di diverse specie di grani

Quindici diverse varietà di frumento appartenenti a tre genotipi (*Triticum turgidum* ssp. *durum*, *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, *Triticum turgidum* ssp. *dicoccum*),

ciascuna proveniente da tre diverse aree geografiche (Potenza-PZ, Ancona-AN, Jülich-JU in Germania), sono state selezionate per la identificazione/purificazione degli ATIs. Due campioni di frumento monococco (*Triticum aestivum* ssp *aestivum*, varietà Botticelli e il *Triticum aestivum* ssp *spelta*, varietà Alt Gold Rotocorn) erano inclusi nello studio.

Tutti i campioni sono stati coltivati e forniti dal gruppo del Prof. Roberto Papa, Dipartimento di Scienze Agrarie Alimentari e Ambientali dell'Università Politecnica delle Marche.

3.3 Purificazione degli ATIs

La purificazione degli ATIs dai differenti grani è stata effettuata dal gruppo del Prof. Mauro Angeletti, Scuola di Bioscienze e Medicina Veterinaria dell'Università di Camerino. La frazione proteica di interesse era estratta essenzialmente secondo la procedura riportata da Zevallos V. F. e collaboratori (Zevallos V et al., 2016).

In breve, le farine sono state ottenute per macinazione dei singoli campioni di grano in mortai di granito in presenza di azoto liquido. 10 g di ciascuna farina così ottenuta sono stati privati della componente grassa per estrazione con una miscela di CH₃OH/C₂H₅OC₂H₅ (rapporto peso farina/volume soluzione di estrazione: 1/10) per 2 h a temperatura ambiente. La risultante sospensione è stata centrifugata a 2500 x g per 20 minuti, il pellet raccolto, seccato per 12-18 ore e successivamente sottoposto a tre cicli consecutivi di estrazione a 4 °C in ammonio bicarbonato 50 mM, pH 7.8 (rapporto peso farina/volume soluzione di estrazione: 1/5), per massimizzare la resa della preparazione. Le risultanti sospensioni sono state centrifugate a 2500 x g per 20 minuti ed i corrispondenti surnatanti combinati.

Tali soluzioni sono state sottoposte a precipitazione frazionata in ammonio solfato a 4 °C; la frazione precipitata nell'intervallo compreso tra 1.8 M e 4 M di ammonio solfato è stata raccolta, estensivamente dializzata in ammonio bicarbonato 10 mM, pH 7.8, aliquotata e conservata a -20 °C fino al successivo utilizzo.

La concentrazione proteica di ciascuna soluzione è stata determinata tramite metodo di Bradford (Bradford M.M., 1976) utilizzando il kit della Biorad (Hercules, CA). Il dosaggio è basato sull'utilizzo del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 in acido fosforico e metanolo. È noto che quando avviene il legame con la proteina, l'assorbanza massima per una soluzione acida di tale colorante si sposta da 465 a

595 nm. Ogni volta è stata preparata una curva di taratura con diverse diluizioni contenenti da 1 a 20 µg di proteina standard BSA (albumina bovina serica). Dopo 10 minuti dall'aggiunta della soluzione, è stata misurata l'assorbanza a 595 nm di ogni campione, la cui concentrazione è stata calcolata in base all'equazione della curva di taratura.

Le soluzioni hanno mostrato concentrazioni proteiche comprese in un intervallo 1.8-11 mg per grammo di farina processata (Tabella III A, B e C).

ID campione	codice	origine	Contenuto proteico (mg/g farina)
Triticum turgidum ssp. Dicoccum	F3	PZ	2,4
Triticum turgidum ssp. Dicoccum	F3	AN	5,1
Triticum turgidum ssp. Dicoccum	F3	JU	2,6
Triticum turgidum ssp. Dicoccum	F4	PZ	3,6
Triticum turgidum ssp. Dicoccum	F4	AN	3,8
Triticum turgidum ssp. Dicoccum	F4	JU	2,6
Triticum turgidum ssp. Dicoccum	F6	PZ	2,1
Triticum turgidum ssp. Dicoccum	F6	AN	4,6
Triticum turgidum ssp. Dicoccum	F6	JU	5,2
Triticum turgidum ssp. Dicoccum	F7	PZ	3,6
Triticum turgidum ssp. Dicoccum	F7	AN	4,9
Triticum turgidum ssp. Dicoccum	F7	JU	3,2
Triticum turgidum ssp. Dicoccum	F10	PZ	4,0
Triticum turgidum ssp. Dicoccum	F10	AN	5,7
Triticum turgidum ssp. Dicoccum	F10	JU	6,6

(A)

ID campione	codice	origine	Contenuto proteico (mg/g farina)
Triticum turgidum ssp. Durum	FD2	PZ	7,4
Triticum turgidum ssp. Durum	FD2	AN	4,4
Triticum turgidum ssp. Durum	FD2	JU	7,6
Triticum turgidum ssp. Durum	FD6	PZ	4,1
Triticum turgidum ssp. Durum	FD6	AN	5,2
Triticum turgidum ssp. Durum	FD6	JU	8,7
Triticum turgidum ssp. Durum	FD8	PZ	5,4
Triticum turgidum ssp. Durum	FD8	AN	6,6
Triticum turgidum ssp. Durum	FD8	JU	6,9
Triticum turgidum ssp. Durum	FD10	PZ	3,8
Triticum turgidum ssp. Durum	FD10	AN	4,4
Triticum turgidum ssp. Durum	FD10	JU	9,0
Triticum turgidum ssp. Durum	FD12	PZ	1,9
Triticum turgidum ssp. Durum	FD12	AN	7,0
Triticum turgidum ssp. Durum	FD12	JU	7,9

(B)

ID campione	codice	origine	Contenuto proteico (mg/g farina)
<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>Dicoccoides</i>	TTD1	PZ	2,8
<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>Dicoccoides</i>	TTD1	AN	6,9
<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>Dicoccoides</i>	TTD1	JU	5,5
<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>Dicoccoides</i>	TTD5	PZ	6,2
<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>Dicoccoides</i>	TTD5	AN	7,1
<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>Dicoccoides</i>	TTD5	JU	6,4
<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>Dicoccoides</i>	TTD6	PZ	3,8
<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>Dicoccoides</i>	TTD6	AN	5,6
<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>Dicoccoides</i>	TTD6	JU	6,7
<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>Dicoccoides</i>	TTD9	PZ	7,0
<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>Dicoccoides</i>	TTD9	AN	10,7
<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>Dicoccoides</i>	TTD9	JU	5,3
<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>Dicoccoides</i>	TTD10	PZ	4,1
<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>Dicoccoides</i>	TTD10	AN	5,5
<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>Dicoccoides</i>	TTD10	JU	10,4

(C)

Tabella III: Contenuto proteico degli estratti dei campioni di frumento delle specie A) *Triticum turgidum* ssp. *Dicoccum*; B) *Triticum turgidum* ssp. *Durum*; C) *Triticum turgidum* ssp. *Dicoccoides*.

3.4 Trattamento cellulare con gli ATIs

I campioni di ATIs pervenuti dall'Università di Camerino, sono stati diluiti tutti ad una concentrazione finale di 1 mg/ml e così conservati a -20 °C. Per la diluizione è stato usato PBS ed ammonio solfato in quantità tali che in ogni campione fosse presente la stessa quantità di quest'ultimo. Le cellule sono state piastrate alle concentrazioni specificate nella sezione dei risultati, utilizzando piastre da 24 pozzi in un volume finale di 2 ml, in presenza degli ATIs purificati dai diversi grani alla concentrazione finale di 50 µg/ml. Come controlli negativi degli esperimenti sono state utilizzate sia cellule THP1 coltivate in solo RPMI, sia cellule coltivate in RPMI supplementato di ammonio bicarbonato alla stessa concentrazione finale presente nei campioni. Come controllo positivo degli esperimenti sono state utilizzate le cellule THP1 coltivate in RPMI supplementato con lipopolisaccaride (LPS, E.Coli O111:B4) alla concentrazione finale di 20 ng/ml. Le colture cellulari sono state incubate a 37 °C, in un incubatore al 5% di CO₂ e 95% di umidità relativa per 24 ore. Terminato il tempo di incubazione, i surnatanti relativi alle varie colture cellulari erano singolarmente recuperati in provette di polipropilene e chiarificati

mediante centrifugazione per 2 minuti a 14.000 rpm in una microcentrifuga da banco (Biofuge Pico Heraeus). I campioni recuperati erano, quindi, conservati a -80°C prima del successivo utilizzo per la determinazione del profilo citochinico.

Laddove specificato, le colture cellulari sono state recuperate, lavate due volte in PBS freddo, quindi lisate con 350 µl di soluzione di lisi. Dopo miscelazione tramite uso del vortex, i lisati sono stati chiarificati mediante centrifugazione a 4°C per circa 20 minuti a 14000 rpm in una microcentrifuga da banco (Biofuge Pico Heraeus). Al surnatante recuperato erano successivamente aggiunti 200 µl di etanolo assoluto per poi conservare i campioni a -20 °C fino al successivo utilizzo per la purificazione degli RNAs (vedi paragrafo 3.6).

3.5 Determinazione del profilo citochinico

Con il termine generale di citochine si intendono dei mediatori polipeptidici a basso peso molecolare non antigene specifici che fungono da segnali di comunicazione fra le cellule del sistema immunitario e fra queste e diversi organi e tessuti. Queste proteine possono esacerbare effetti sia pro- che anti-infiammatori in dipendenza della natura del segnale attivante o inibente e del momento in cui esso occorre. Le citochine infiammatorie possono essere distinte in primarie e secondarie. Le citochine infiammatorie primarie costituiscono un trio di mediatori fondamentali o meglio di molecole che sono il prototipo di intere famiglie: IL-1, TNF e IL-6. Le citochine infiammatorie primarie sono estremamente pleiotropiche, nel senso che il loro spettro di azione comprende una grande varietà di cellule e di tessuti. Infatti molecole come IL-1 e TNF agiscono praticamente su tutte le cellule e su tutti i tessuti dell'organismo. Il processo infiammatorio che deriva dalla secrezione di queste citochine comporta varie manifestazioni a livello cutaneo, articolare e in altri tessuti. Questi processi sono richiesti affinché si coordini una buona risposta immune ma, nonostante ciò, sono anche alla base di molte condizioni patologiche come disordini cardiovascolari, neurologici, metabolici, neoplastici ed autoimmuni tra cui, appunto, la celiachia.

La loro secrezione è un evento di breve durata e generalmente auto-limitante. Non vengono immagazzinate ma prodotte ex-novo ogni volta mediante nuova sintesi o meccanismi di modifiche post-trascrizionali. Le loro attività sono pleiotropiche, ovvero una citochina agisce su diversi tipi cellulari e ridondanti, nonché lo stesso

effetto può essere indotto da diverse citochine. Le citochine possono influenzare la sintesi e le attività di altre citochine agendo in sinergia o in antagonismo. Le loro azioni possono essere locali o sistemiche a seconda che la secrezione sia autocrina, paracrina o endocrina.

Per determinare il profilo citochinico derivante dalla stimolazione in vitro delle colture cellulari è stato utilizzato il sistema Bio-Plex 200 (BioRad Laboratories, Hercules, CA). Il vantaggio nell'uso di questa strumentazione risiede nella possibilità di quantificare contemporaneamente un gran numero di biomarcatori proteici nel singolo campione in tempi brevissimi (3-4 ore). Inoltre, la possibilità di utilizzare biglie magnetiche permette di automatizzare i passaggi di lavaggio, offrendo maggiori convenienza e riproducibilità rispetto ad una filtrazione sottovuoto. Il sistema Bio-Plex 200 si fonda su tre elementi centrali:

- il primo riguarda la presenza di microsfere magnetiche del diametro di 5.6 μm , quindi con grande superficie disponibile per legare un anticorpo specifico per l'analita che si voglia quantificare. Le microsfere sono inoltre coniugate ad un fluorocromo diverso con uno specifico indirizzo di spettro per discriminare i singoli test nell'analisi di una soluzione multipla. Con questa metodica si rende possibile l'individuazione simultanea di più di 500 molecole;
- il secondo elemento centrale è la presenza di un lettore dedicato per la piastra. Si tratta di un sistema citometrico con due laser che colpiscono le microsfere singolarmente: uno riconosce il colore della microsfera e dunque il relativo analita riconosciuto dall'anticorpo ad essa legato, l'altro laser la quantifica perché eccita il fluoroforo legato sull'anticorpo secondario;
- il terzo elemento è rappresentato dal processore digitale ad alta velocità che permette di controllare in modo efficace i dati relativi alla fluorescenza.

Nello specifico della ricerca qui esposta è stato utilizzato il Bio-Plex Pro Human Inflammation Assay per la rivelazione contemporanea di IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, TNF α , MCP1, RANTES (*Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*, chemochina di reclutamento e attivazione) e TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*, citochina ad azione pro-apoptotica). Essenzialmente il Bio-Plex Pro Human Inflammation Assay è un saggio immunologico basato sull'utilizzo di biglie magnetiche che sfrutta un principio "sandwich" simile al metodo ELISA, come schematizzato in Figura 9.

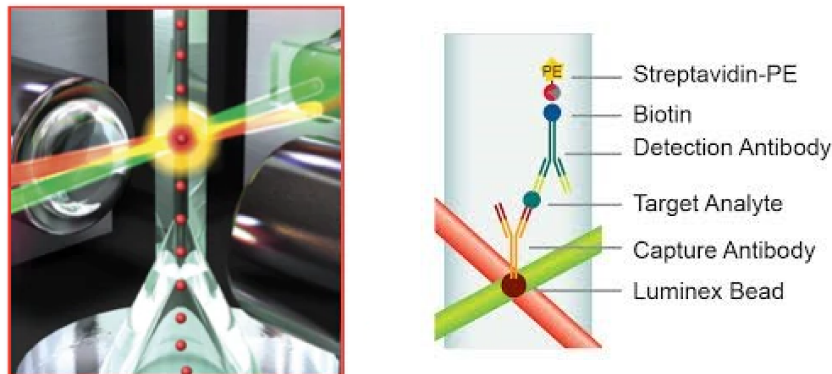


Figura 9: Schematizzazione del funzionamento del lettore Bio-Plex 200.

In breve, anticorpi specifici diretti contro le citochine in analisi sono fissati covalentemente a delle microsferiche magnetiche (step 1, Figura 10) e dispensati nei pozzetti di una piastra da 96. I campioni in esame sono aggiunti nei pozzetti della piastra in modo da consentire il riconoscimento antigene-anticorpo (step 2, Figura 10) mediante incubazione per 1 ora a temperatura ambiente. Al seguito di una serie di lavaggi, atti a rimuovere le proteine che non si sono legate, viene aggiunto un secondo anticorpo biotinilato specifico per lo stesso antigene per 30 minuti a temperatura ambiente (step 3, Figura 10). In seguito ad ulteriori lavaggi allo scopo di eliminare l'eccesso di anticorpi biotinilati che non si sono legati, si aggiunge ai campioni una sonda fluorescente capace di riconoscere l'anticorpo biotinilato (coniugato streptavidina-ficoeritrina) per 10 minuti a temperatura ambiente (step 4, Figura 10). Dopo ulteriori ed opportuni lavaggi, le microsferiche magnetiche, con il materiale ad esse legato, vengono passate al lettore Bio-Plex 200, un laser rosso fa brillare il rivestimento di ogni singola biglia affinché possa essere riconosciuta e contata; allo stesso tempo, un laser verde eccita la ficoeritrina, generando un segnale sonda che viene captato da un tubo fotomoltiplicatore.

Un processore digitale ad alta velocità elabora i dati mentre il sistema Bio-Plex Manager ne permette la rappresentazione come media dell'intensità della fluorescenza (MFI) e come concentrazione (pg/ml), proporzionale alla MFI stessa.

Estremamente importante è contemplare nella piastra di lettura 12 pozzetti dedicati agli standard forniti dal kit e adeguatamente diluiti, ponendo la massima concentrazione nella riga A e la più bassa concentrazione nella riga H, come

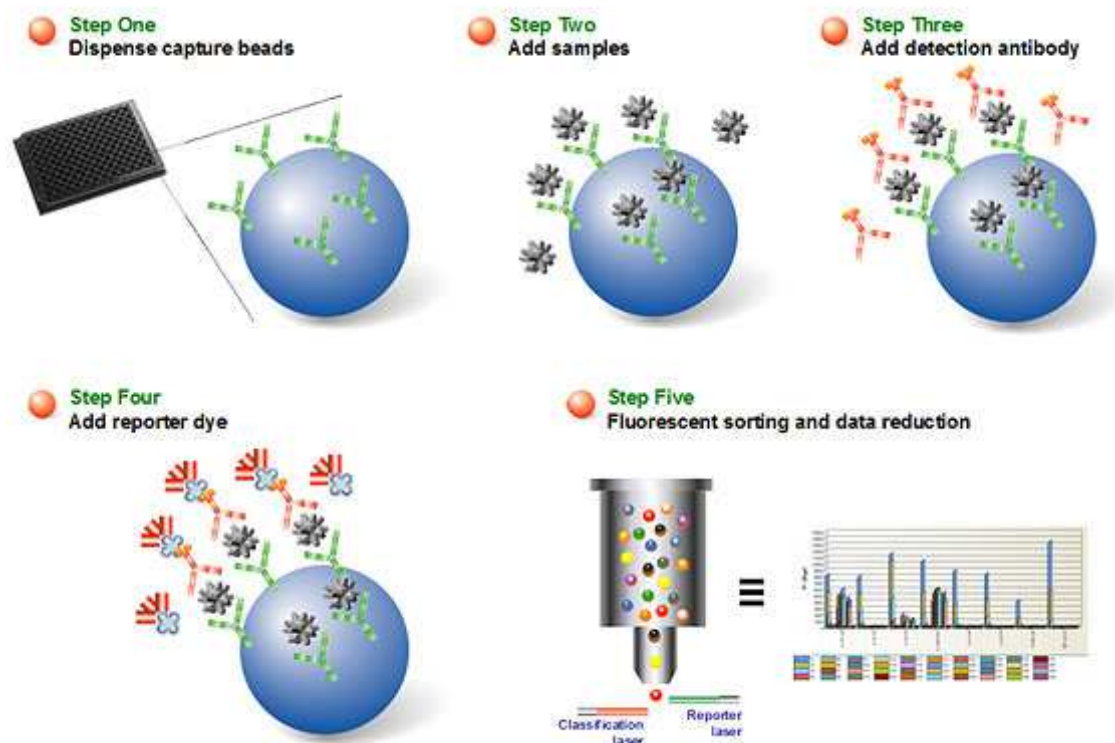


Figura 10: Schematizzazione di un saggio immunologico a “sandwich” alla base della tecnologia Bio-plex. La spiegazione è data nel testo.

schematizzato in Figura 11.

Vanno inoltre dedicati due pozzetti per il bianco, rappresentato esclusivamente dal diluente standard scelto: il software Bio-Plex Manager sottrae automaticamente il valore MFI del bianco da tutti gli altri pozzetti del dosaggio.

Per quanto riguarda la preparazione dei campioni, una volta scongelati, questi vanno comunque conservati su ghiaccio. Le diluizioni dei campioni vanno predisposte appena prima dell’inizio del test, equilibrate alla temperatura ambiente prima dell’uso e contenute in provette per microcentrifuga.

Per quanto riguarda la preparazione delle microsfele, queste vanno opportunamente diluite secondo quanto specificato dal kit fornito ed utilizzate quando raggiungono la temperatura ambiente: è importante ricordare che bisogna proteggere le microsfele dalla luce durante la durata del test mediante l’uso di un foglio di alluminio.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	1	8	8	7	7	15	15	16	16	17	17
B	3	2	1	1	8	8	10	10	19	19	20	20
C	3	3	1	1	8	8	21	21	22	22	23	23
D	4	4	2	2	10	10	24	24	25	25	26	26
E	5	5	3	3	11	11	27	27	28	28	29	29
F	5	5	4	4	12	12	30	30	31	31	32	32
G	7	7	5	5	13	13	33	33	34	34	35	35
H	8	8	5	5	14	14	36	36	37	37	38	38

Figura 11: Rappresentazione schematica di una piastra Bio-plex a 96 pozzetti.

L'intero processo è schematizzato nella Figura 12.

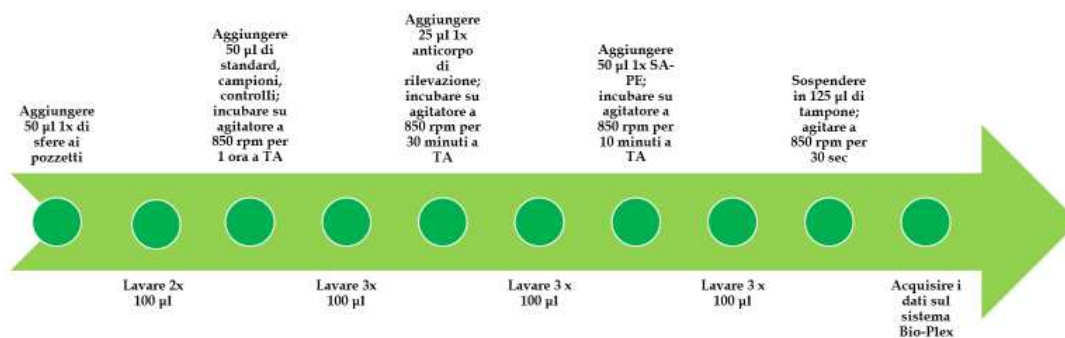


Figura 12: Rappresentazione schematica dei principali passaggi per la preparazione del saggio immunologico secondo il protocollo Bio-Plex.

A questo punto si può procedere alla lettura della piastra. Il protocollo di lettura deve essere preparato in anticipo in modo che la piastra venga letta non appena l'esperimento è completo. È possibile scegliere tra i protocolli già disponibili nel software o creare un nuovo protocollo seguendo le istruzioni fornite.

3.6 Estrazione dell'RNA

Per poter effettuare un'analisi di espressione genica in laboratorio tramite la tecnica real-time (RT)-PCR (vedi paragrafo 3.7), è necessario prima di tutto isolare l'RNA cellulare con un protocollo di estrazione dalla popolazione cellulare di interesse. Si procede poi con la valutazione della sua qualità e purezza e si determina la concentrazione dell'estratto tramite spettrofotometro. L'RNA totale è stato estratto utilizzando kit commerciale "Total RNA purification Kit" distribuito dalla ditta Norgen Biotek Corporation (Thorold, ON, Canada), che consente di isolare e purificare in modo relativamente rapido l'RNA proveniente da vari tipi di materiale biologico, ivi inclusi le colture cellulari, campioni tissutali, il sangue, i batteri, i lieviti, i funghi, le piante e i virus.

Questa procedura prevede l'utilizzo di soluzioni formulate specificatamente per la ritenzione dell'RNA, isolandolo attraverso l'utilizzo di una colonna cromatografica provvista di una resina capace di legarlo in base alla concentrazione ionica. La metodologia impiegata dal kit permette di ottenere preparati privi di altre componenti cellulari come le proteine e, quindi, evita l'utilizzo di sostanze tossiche quali il fenolo e il cloroformio. I campioni ottenuti dopo lisi cellulare (vedi paragrafo 3.4) erano trasferiti nell'opportuna colonna assemblata con la provetta di raccolta, fornita dal kit. A questo punto i campioni erano centrifugati per 1 minuto a 13.000 rpm: il materiale recuperato nella provetta di raccolta era eliminato. Si eseguivano, quindi, tre lavaggi della colonna utilizzando 400 μ l di soluzione di lavaggio e successiva centrifugazione per 1 minuto a 13.000 rpm. L'RNA depositato sulla resina della colonna veniva, quindi, recuperato attraverso l'aggiunta di 50 μ l di soluzione d'eluizione e successiva centrifugazione per 2 minuti a 2.000rpm. Infine, il materiale recuperato nella provetta di raccolta, contenente l'RNA eluito era conservato -80°C fino a successivo utilizzo.

Dato che la procedura purifica l'RNA totale, indipendentemente dalle dimensioni dei suoi componenti, è possibile effettuare una valutazione sia quantitativa che qualitativa del campione per controllarne la sua idoneità all'analisi successiva.

La quantificazione dell'RNA totale estratto, nonché il suo grado di purezza, sono state analizzate con lo spettrofotometro Nanodrop ($A_{260/280} = 1.8 - 2.0$). Quindi i campioni erano conservati a -80 °C fino al loro utilizzo.

3.7 qRT-PCR

La retro-trascrizione consiste nella sintesi di una molecola di DNA (chiamata cDNA, DNA complementare) a partire da RNA. L'enzima che catalizza questa particolare reazione viene chiamato trascrittasi inversa, e consiste in una particolare DNA polimerasi che utilizza come filamento stampo una molecola di RNA (Nelson DL e Cox MM, 2011). Infine, dopo aver retro-trascritto l'RNA in cDNA, una molecola più stabile, si può procedere all'analisi di espressione genica tramite real-time PCR. Il cDNA specifico per un gene si diversifica dal corrispettivo DNA perché privo di introni.

L'enzima trascrittasi inversa per catalizzare la sintesi di una catena di cDNA complementare all'RNA, oltre all'RNA stampo necessita di deossiribonucleotidi trifosfati (dNTPs), opportuni inneschi, una soluzione tampone e Mg^{++} . Gli inneschi per l'enzima, detti anche *primers*, possono essere di due tipi: *Random Examer Primers*, cioè sequenze oligonucleotidiche di 6 basi, che legano in maniera casuale le molecole dell'RNA, o *Oligonucleotide Primer di Poli-T*, cioè sequenze oligonucleotidiche costituite da basi timina, che legano la coda poli-A dell'RNA.

La retro-trascrizione dell'RNA in cDNA è stata effettuata tramite il “Prime-Script Reagent Kit” (Takara Bio Inc., Shiga, Japan). La quantità di RNA utilizzata per la reazione è stata di 0,5µg totali; una volta preparata la miscela di reazione e dispensato il rispettivo quantitativo di RNA da retro-trascrivere i campioni sono stati inseriti in un termociclatore con impostato l'opportuno programma affinché la reazione fosse realizzata.

Più precisamente il programma impostato è stato il seguente:

1. 42 °C per 2 minuti;
2. 37 °C per 15 minuti;
3. 85 °C per 5 secondi;

con ripetizione delle tre fasi appena descritte per 30 volte.

Una volta terminata la reazione, i campioni sono stati mantenuti a 4°C.

La tecnica di PCR convenzionale è una tecnica qualitativa; infatti non è possibile correlare la quantità di prodotto finale con la quantità di DNA stampo presente inizialmente, perché nella fase finale l'efficienza della reazione può essere variabile.

La real-time PCR, denominata anche PCR quantitativa, è di fatto un metodo di amplificazione e quantificazione simultanea del DNA: essa misura l'amplificazione in tempo reale durante la fase esponenziale della PCR, quando cioè l'efficienza dell'amplificazione è minimamente influenzata dalle variabili di reazione. Piuttosto che rilevare l'ammontare totale del prodotto amplificato alla fine dei cicli di PCR, i prodotti della reazione vengono determinati a partire dal ciclo in cui l'amplificato diventa rilevabile, definito ciclo soglia (Ct), permettendo di ottenere risultati molto più accurati (vedi paragrafo 3.8). Il segnale che viene quantificato è rappresentato dalla fluorescenza emessa da specifici fluorofori, cioè coloranti fluorescenti in grado di legarsi alle molecole di DNA prodotte ad ogni ciclo di amplificazione. I fluorofori possono intercalarsi al DNA in modo aspecifico oppure fungere da marcatori di sonde oligonucleotidiche complementari a specifiche sequenze.

Uno dei fluorofori più utilizzati è il SYBR-Green, una molecola fluorescente che durante la reazione di PCR si intercala nel doppio filamento del DNA. Il complesso DNA/SYBR-Green ad una lunghezza d'onda $\lambda_{\text{max}} = 488\text{nm}$ ed emette luce verde ad una lunghezza d'onda $\lambda_{\text{max}} = 522\text{nm}$. Il SYBR-Green si intercala nel DNA a doppio filamento, motivo per cui non è adatto per quantificare RNA a filamento singolo (Mackay I, 2007). Durante la fase di denaturazione il SYBR-Green si trova libero nella miscela di reazione, successivamente nella fase di appaiamento esso si posiziona in maniera aspecifica nel solco minore del DNA. Nella fase di elongazione il colorante si intercala nella molecola di DNA e quando eccitato emette fluorescenza in modo proporzionale al numero di copie di DNA prodotte (Figura 13).

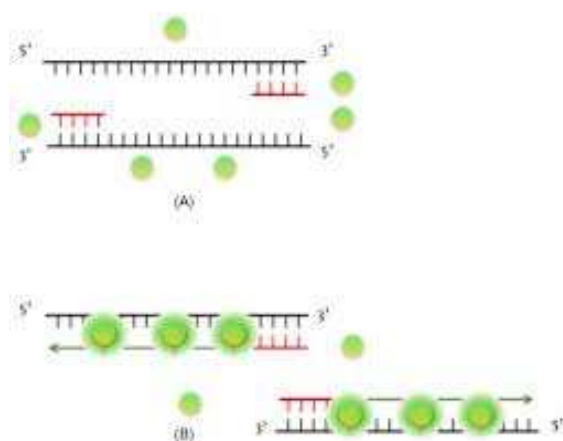


Figura 13: Incorporazione del SYBR-Green nelle tre fasi di PCR.

Maggiore è il segnale emesso dal fluoroforo, maggiore sarà la quantità di cDNA amplificato. Grazie ad un rilevatore ottico installato nel termociclatore stesso (Rotor Gene Q) e ad un software dedicato, è possibile convertire il segnale luminoso in valore numerico, ricavando così la concentrazione dell'acido nucleico di interesse. La RT-PCR prevede che si lavori in doppio. Per l'amplificazione del cDNA è stata utilizzata la quantità di 1µg per ciascun campione preparato. Gli inneschi utilizzati per l'analisi dell'espressione dell'mRNA per l'IL-6 sono i seguenti:

- FW 5' TGCAATAACCAACCCCTGACC 3'
- RV 5' GTGCCCATGCTACATTTGCC 3'

mentre quelli utilizzati per l'analisi dell'mRNA per la GAPDH (GlicerAldeide-3-Fosfato-Deidrogenasi, gene *housekeeping* utilizzato come controllo) sono rispettivamente:

- FW 5' GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG 3'
- RV 5' ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA 3'

La curva di amplificazione utilizzando questi inneschi descrive l'aumento di fluorescenza in funzione del numero dei cicli di PCR. La quantificazione del segnale di fluorescenza può essere effettuata seguendo due strategie diverse: i livelli di espressione genica possono essere riportati tramite quantificazione assoluta o relativa. La prima rappresenta una misura del numero di copie di DNA bersaglio di partenza e viene valutata utilizzando una curva di calibrazione. La quantificazione relativa, invece, rappresenta una misura relativa dei livelli di espressione rispetto ad una specifica condizione sperimentale (Filion M, 2012). Nella presente sperimentazione è stata utilizzata la quantificazione relativa che consente di determinare i cambiamenti di livello di espressione di un dato gene in più campioni rispetto ad un gene di riferimento (GAPDH) che è stato co-amplificato insieme al gene IL-6 di interesse.

3.8 Valutazione dell'espressione genica

Come accennato nel paragrafo precedente, piuttosto che rilevare l'ammontare totale del prodotto amplificato alla fine dei cicli di PCR, i prodotti della reazione vengono determinati a partire dal ciclo in cui l'amplificato diventa rilevabile, definito ciclo

soglia (Ct), permettendo di ottenere risultati molto più accurati. Più è elevato il numero di copie iniziali della sequenza da amplificare, più basso sarà il Ct.

Il diagramma di Ct su DNA stampo è lineare e la pendenza della retta (*slope*) fornisce una misura dell'efficienza della PCR. Durante lo svolgimento di una reazione di amplificazione del DNA mediante Real-time PCR, la quantità di prodotto che si forma dopo un ciclo termico raddoppia al ciclo successivo. Misurando l'incremento di fluorescenza, all'avanzare dei cicli, è possibile ricavare la curva di amplificazione della molecola stampo di interesse. Tale diagramma esibisce un andamento tipicamente sigmoide, caratterizzato da tre fasi: una prima fase in cui al susseguirsi dei cicli di amplificazione non corrisponde un significativo incremento della fluorescenza; una fase esponenziale; una fase di *plateau* (Figura 14).

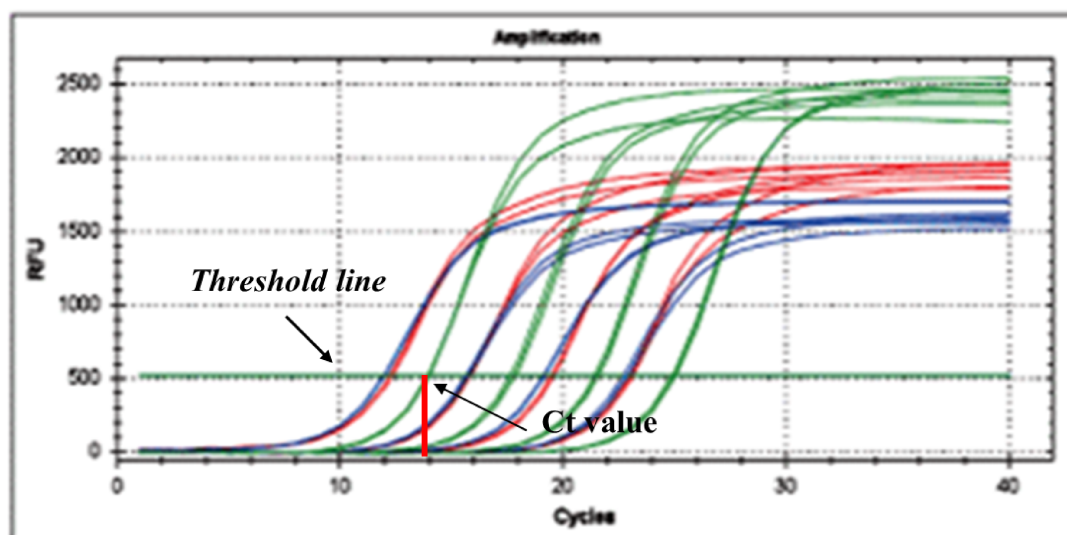


Figura 14: Esempio di risultato grafico dell'analisi della fluorescenza emessa durante l'amplificazione e registrata dall'apparecchiatura. Ogni curva rappresenta un campione diverso: la linea orizzontale è la soglia scelta dall'operatore. L'intersezione fra la soglia e la curva rappresenta il ciclo soglia Ct.

Tale ciclo di amplificazione prende il nome di ciclo soglia (Ct) e graficamente corrisponde al punto in cui la curva di amplificazione interseca la linea di base (*Threshold line*). A questa linea virtuale, che distingue la fluorescenza di fondo da segnali imputabili a reali amplificazioni, corrisponde un valore ben definito di fluorescenza, al di sopra del quale diventa significativo qualsiasi incremento di fluorescenza. I valori di Ct relativi ad ogni campione sono stati ottenuti mediante l'uso

del programma Real Time PCR Opticon Monitor Version 3.0 (MJ Research).

Per calcolare l'espressione del gene in analisi in relazione al gene di riferimento, i calcoli sono stati effettuati attraverso il metodo Livak o del ΔC_T che assume l'ipotesi che sia il gene in analisi (gene per l'IL-6) che quello di riferimento (gene GAPDH) siano amplificati con un'efficienza che si avvicina al 100%, con uno scarto accettabile del 5%. Il risultato ottenuto quantifica l'incremento (o eventualmente il decremento) del gene in analisi dopo normalizzazione rispetto all'espressione del gene di riferimento (Livak KJ e Schmittgen TD, 2001). In particolare, i valori della distribuzione dell'espressione relativa sono stati calcolati applicando la seguente formula: $2^{-\Delta C_T}$ ($\Delta C_T = C_t \text{ normalizzatore} - C_t \text{ cDNA di interesse}$).

3.9 Analisi statistica

I risultati ottenuti dall'analisi al Bio-plex 200 e quelli della qRT-PCR sono stati espressi come valori medi $\pm$ la deviazione standard da tre esperimenti indipendenti. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando l'analisi della varianza ad una via (one way-ANOVA), seguita dal test di Bonferroni utilizzando il software Sigma-stat 3.1 (SPSS, Chicago, IL, USA). p values < 0.05 sono stati considerati statisticamente significativi.

Capitolo 4

Risultati

4.1 Definizione delle condizioni ottimali di trattamento

Nella parte iniziale della sperimentazione sono stati effettuati una serie di tests con lo scopo di definire le condizioni ottimali alle quali saggiare le differenti specie di ATIs purificati. In particolar modo si è prestata attenzione alla definizione della concentrazione cellulare da utilizzare, alla definizione del tempo di trattamento, della concentrazione di ATIs e dell'eventuale interferenza sul saggio da parte dell'ammonio bicarbonato presente in ugual misura in tutti i campioni (vedi paragrafo 3.4).

Come mostrato in Figura 15, che si riferisce ad un trattamento per 24 ore con LPS usato come controllo positivo, si è registrata una importante stimolazione citochinica sia coltivando 250×10^3 che 500×10^3 cellule/pozzetto. Tuttavia si è scelto di proseguire con una concentrazione di 250×10^3 cellule/pozzetto dato che all'analisi al microscopio tale concentrazione cellulare risultava morfologicamente più integra rispetto alla concentrazione di 500×10^3 cellule/pozzetto. Per quanto riguarda la concentrazione di LPS da utilizzare, la dose di 20 ng/ml è stata selezionata come ottimale. Nelle stesse condizioni sperimentali, il trattamento delle cellule per 48 ore non risultava in una maggiore stimolazione di citochine e peraltro mostrava maggiore sofferenza cellulare (dati non mostrati).

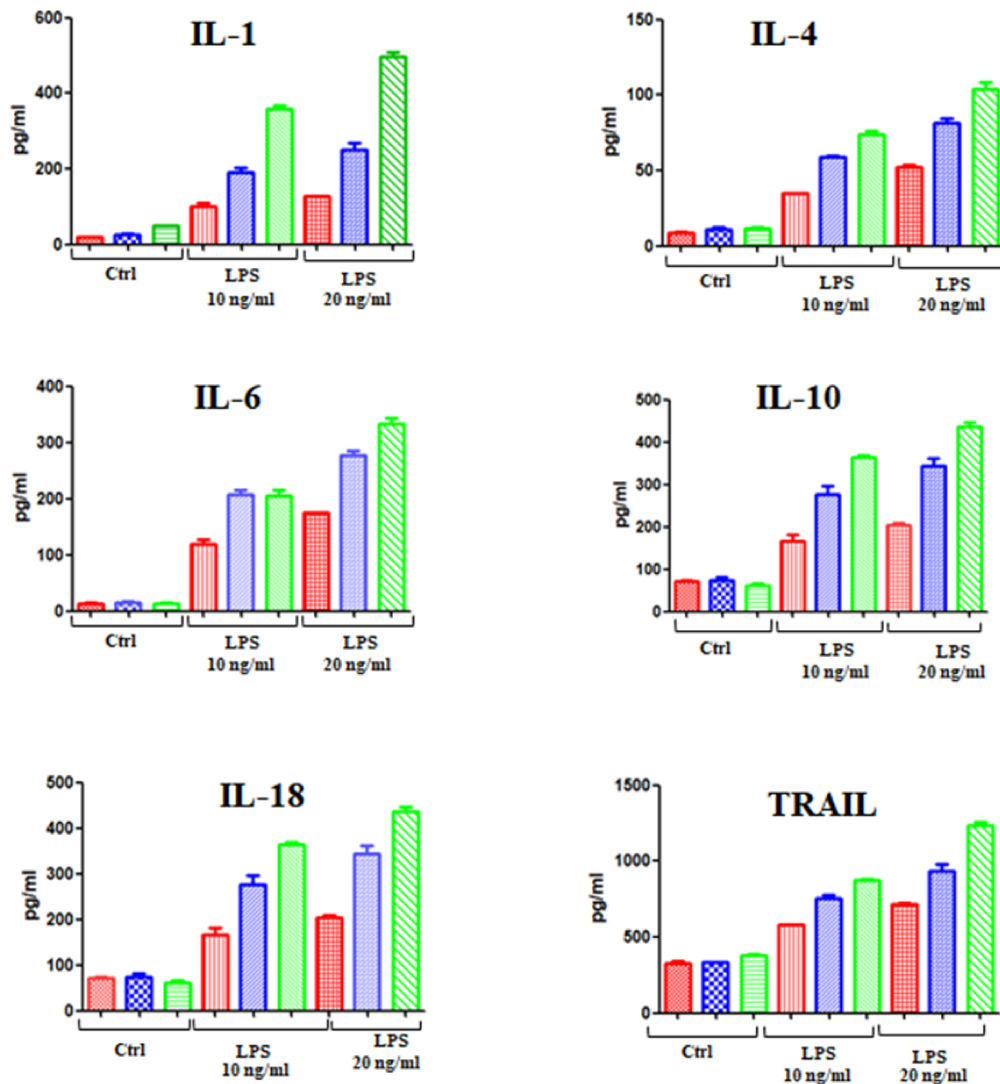


Figura 15: Stimolazione delle cellule THP-1 per la determinazione delle citochine indicate coltivate per 24 h alla concentrazione di 125×10^3 cellule /pozzetto (istogrammi in rosso), 250×10^3 cellule /pozzetto (istogrammi in blu) e 500×10^3 cella/pozzetto (istogrammi in verde), in assenza o in presenza di LPS 10 ng/ml o 20 ng/ml, come indicato in figura.

L'ammonio bicarbonato utilizzato alle concentrazioni presenti nei campioni non ha mostrato interferenza nel saggio Bio-Plex utilizzato (dati non mostrati).

In un altro set di esperimenti sono state provate due differenti concentrazioni di ATIs, purificati dai grani indicati: in base a questi risultati, mostrati in Figura 16,

si è scelto di utilizzare le gli ATIs alla concentrazione finale di 50 μ g/ml. In particolare, in questi esperimenti, la frazione di ATIs purificata dal frumento monococco *Triticum aestivo ssp aestivum*, varietà Botticelli, mostrava attività ottimale alla concentrazione di 50 μ g/ml, con stimolazione della produzione delle varie citochine analizzate superiore a quella rivelata dopo stimolazione cellulare con LPS 20ng/ml.

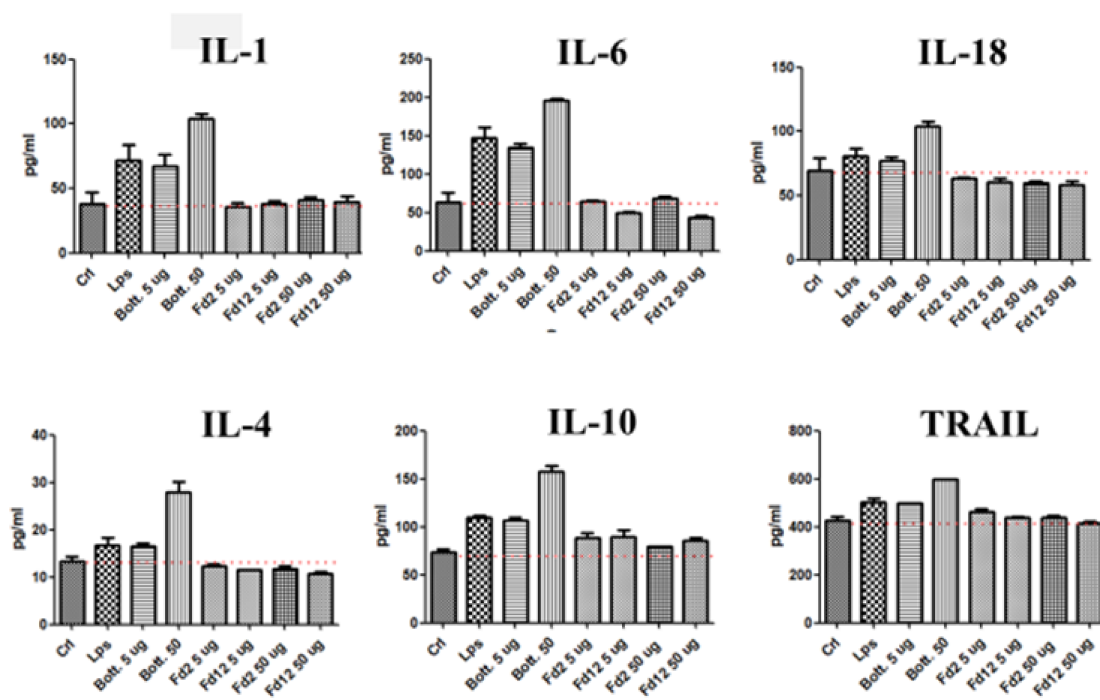


Figura 16: Produzione di citochine da parte di cellule THP-1 coltivate alla concentrazione di 250×10^3 per 24 ore in assenza od in presenza delle molecole indicate in figura. L'LPS è stato utilizzato alla concentrazione di 20 ng/ml.

4.2 Controllo quantitativo dell'mRNA per l'IL-6

Prima di procedere con la determinazione del profilo delle citochine rilasciate nel mezzo di coltura dalle cellule THP-1 trattate nelle varie condizioni sperimentali, ho voluto verificare che i livelli di espressione relativa dell'mRNA per l'IL-6 fossero realmente aumentati in seguito a stimolazione per 24 ore con l'LPS 20 ng/ml

rispetto alle cellule controllo.

L'analisi è stata effettuata tramite qRT-PCR come descritto nei paragrafi 3.7 e 3.8. I risultati, riportati in Figura 17, mostrano chiaramente un aumento statisticamente significativo ($p < 0,001$) dell'mRNA per l'IL-6 rispetto ad entrambe le colture di controllo (THP-1 coltivate in RPMI al 10% FBS; THP-1 coltivate in RPMI al 10% FBS più ammonio bicarbonato).

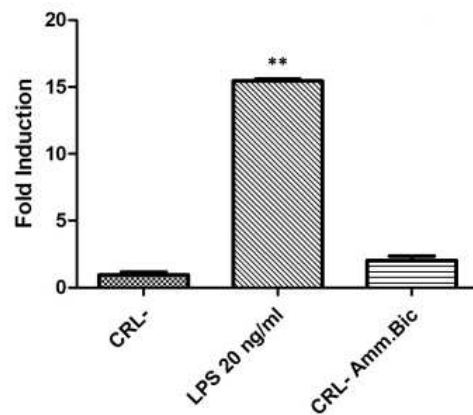


Figura 17: Valutazione dell'effetto dell'LPS 20 ng/ml sulle cellule THP-1 dopo 24 ore di trattamento. CRL- (THP-1 coltivate con RPMI al 10% FBS); CRL- Amm.Bic (THP-1 coltivate con RPMI al 10% FBS supplementato con ammonio bicarbonato). ** $p < 0,001$ versus CRL e CRL- Amm. Bic.

4.3 Profilo citochinico indotto dagli ATIs purificati dalle diverse specie di grano coltivate a Potenza

Una volta stabilite le condizioni sperimentali di trattamento, si è proceduto con l'analisi degli ATIs purificati dalle diverse specie di grano coltivati nel campo di Potenza ed elencate in Tabella IV.

	Wheat species	Code Sample
➡	<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>Dicoccum</i>	F3
	<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>Dicoccum</i>	F4
	<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>Dicoccum</i>	F6
	<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>Dicoccum</i>	F7
➡	<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>Dicoccum</i>	F10
	<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>Durum</i>	FD2
	<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>Durum</i>	FD6
	<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>Durum</i>	FD8
	<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>Durum</i>	FD10
	<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>Durum</i>	FD12
	<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>Dicoccoides</i>	TTD1
➡	<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>Dicoccoides</i>	TTD5
	<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>Dicoccoides</i>	TTD6
	<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>Dicoccoides</i>	TTD9
	<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>Dicoccoides</i>	TTD10
	<i>Triticum aestivum</i> ssp. <i>Aestivum</i> - Varietà: Botticelli	
➡	<i>Triticum aestivum</i> ssp. <i>Spelta</i> ALT GOLD ROTOCORN	

Tabella IV: Lista delle specie di grani da cui si sono ottenuti i differenti ATIs. Ogni colore si riferisce a varianti genetiche della stessa specie. In verde sono evidenziati i controlli positivi.

Con la freccia blu sono evidenziate le specie i cui ATIs non sono risultati rilevabili alla lettura al Bio-Plex. Dalla Figura 18, si può evincere come gli ATIs purificati da alcune specie (più specificatamente F4, F6 e F7) presentano un'attività biologica molto significativa nel determinare il rilascio di citochine pro-infiammatorie quali IL-1 β , TNF- α ed IL-6, in alcuni casi a livelli anche maggiori rispetto ai controlli positivi utilizzati quali l'LPS 20 ng/ml e gli ATIs derivati dal frumento monococco *Triticum aestivo ssp aestivum*, varietà Botticelli.

Inoltre, si è potuto constatare che gli ATIs provenienti dalle stesse varietà di grano innescavano un rilascio maggiore di altre citochine pro-infiammatorie quali MCP-1, IL-8, IL-12 e IL.18 rispetto alle altre preparazioni (Figura 19).

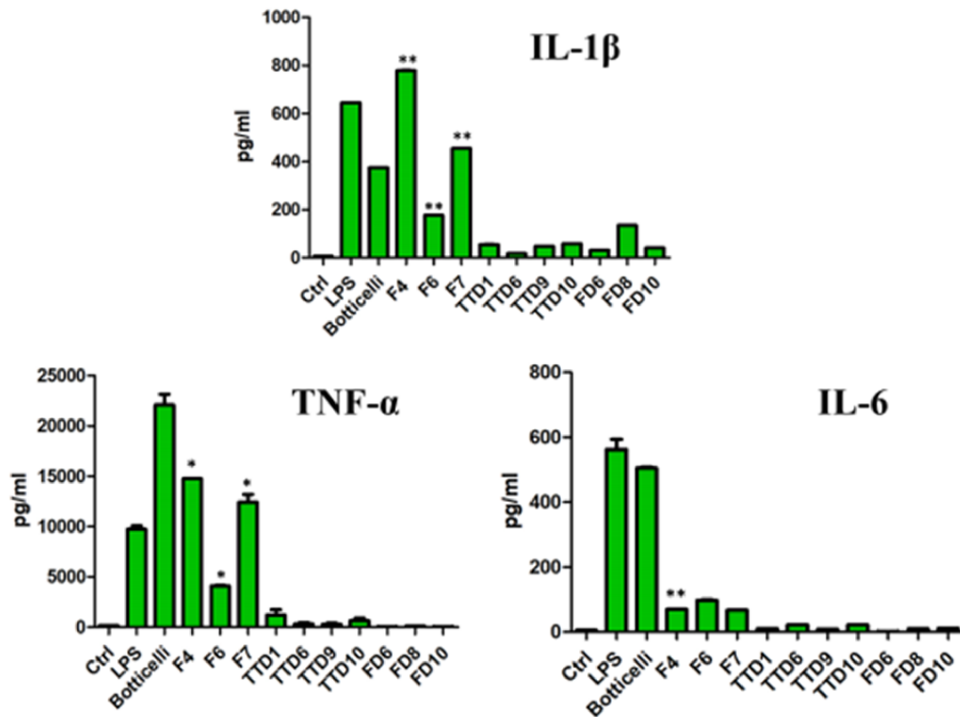


Figura 18: Produzione delle citochine pro-infiammatorie nelle cellule THP-1 dopo stimolazione per 24 ore con ATIs (concentrazione finale 50 μ g/ml) purificati da differenti specie di grano coltivate a Potenza. L'LPS (concentrazione finale 20 ng/ml) e il *Triticum aestivum ssp aestivum*, varietà Botticelli (50 μ g/ml) sono stati utilizzati come controlli positivi. I risultati sono riportati come media (1pm SD). ** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$: controllo negativo versus gli ATIs purificati dalle specie di grano indicate.

Contemporaneamente alla mia sperimentazione, il gruppo dell'Università di Camerino saggiava, attraverso spettrometria di massa, le preparazioni ottenute. Da questa analisi risultava che, tra tutti i sottotipi di ATIs presenti, la specie CM3 rappresentava il maggior componente delle preparazioni (>50% degli ATIs totali). Successivamente il gruppo dell'Università di Camerino ha effettuato una separazione cromatografica delle miscele proteiche ottenute attraverso cromatografia FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*, cromatografia a fase mobile liquida della proteina veloce) secondo il metodo proposto da Zevallos e collaboratori (Zevallos V et al., 2016), allo scopo di ottenere 4 sotto-frazioni di CM3. Tali sotto-frazioni

sono indicate come sotto-frazione ad alto peso molecolare (Alto PM), medio peso molecolare PM1, medio peso molecolare PM2, medio peso molecolare PM3.

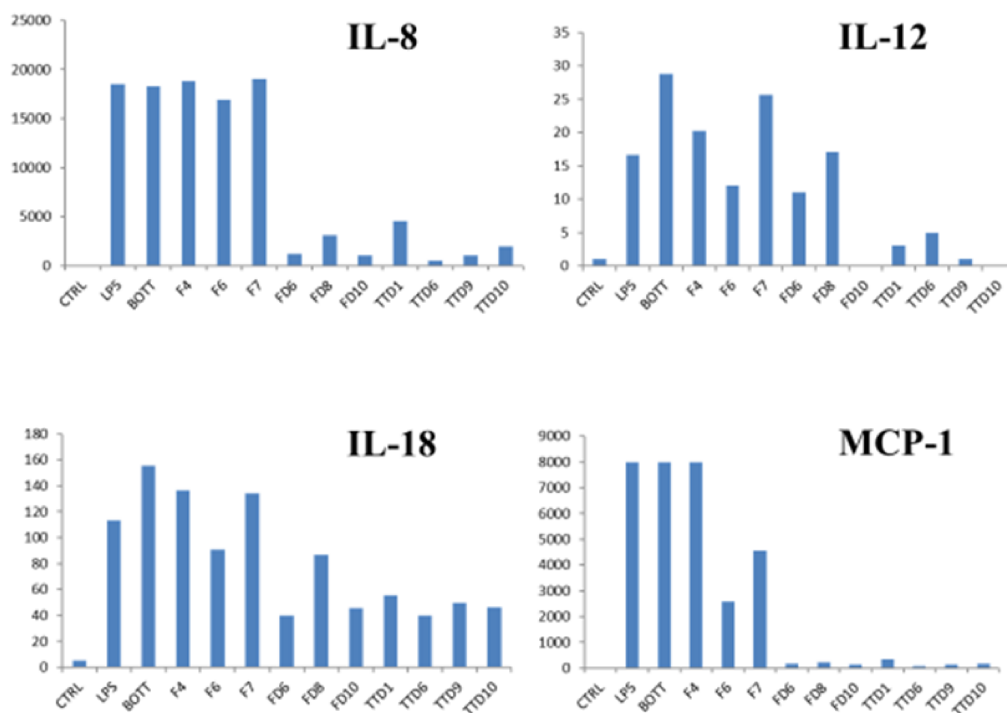


Figura 19: Produzione delle citochine pro-infiammatorie nelle cellule THP-1 dopo stimolazione per 24 h con ATIs (concentrazione finale 50µg/ml) purificati da differenti specie di grano coltivate a Potenza. L'LPS (concentrazione finale 20 ng/ml) e il *Triticum aestivum ssp aestivum*, varietà Botticelli (50µg/ml) sono stati utilizzati come controlli positivi.

Da questa analisi è risultato che le differenti varietà di grano studiate, pur presentando un contenuto proteico qualitativamente simile, mostravano profili cromatografici peculiari che differivano per l'abbondanza relativa dei singoli componenti.

Variabilità cromatografiche erano inoltre rilevate confrontando i campioni ottenuti dallo stesso genotipo di grano ma di diversa provenienza geografica (vedi Figura 20).

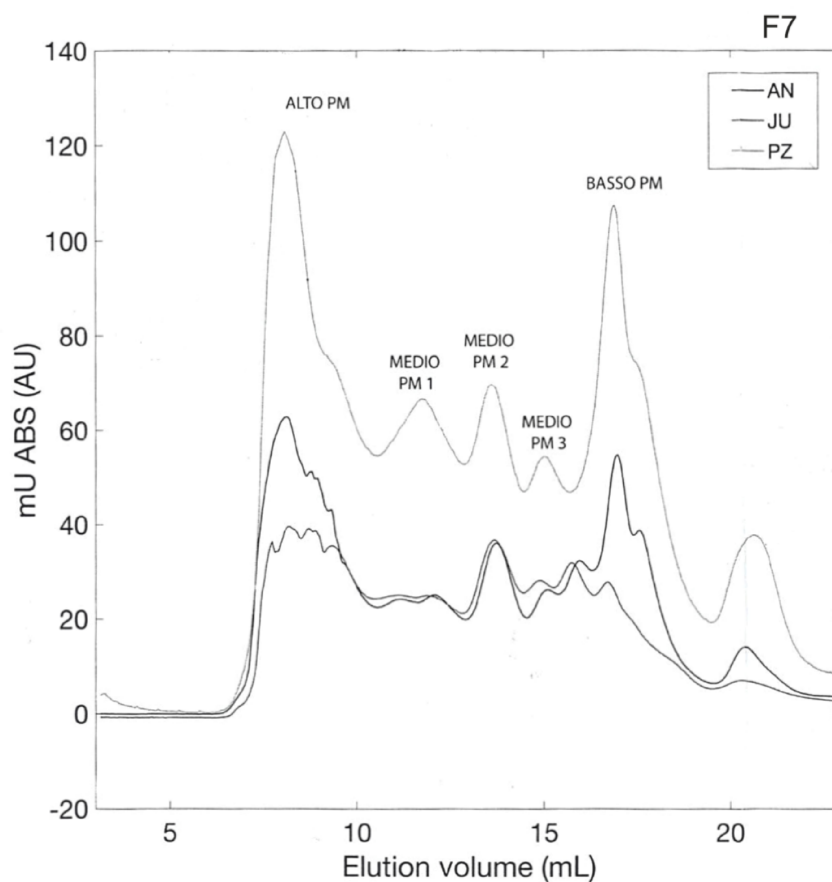


Figura 20: Cromatogramma degli ATIs purificati dal *Triticum Turgidum* ssp *Dicoccum* (variante F7) coltivato in tre differenti aree geografiche (vedi legenda).

In particolare, da questa analisi, risulta che la quantità di CM3 è nettamente superiore nel campione coltivato a Potenza rispetto allo stesso coltivato in Germania.

Pertanto ho voluto verificare se tale differenza potesse essere collegata ad una maggiore stimolazione da parte delle cellule THP-1 nella produzione di citochine pro-infiammatorie (Figura 21).

4.3 – Profilo citochinico indotto dagli ATIs purificati dalle diverse specie di grano coltivate a Potenza

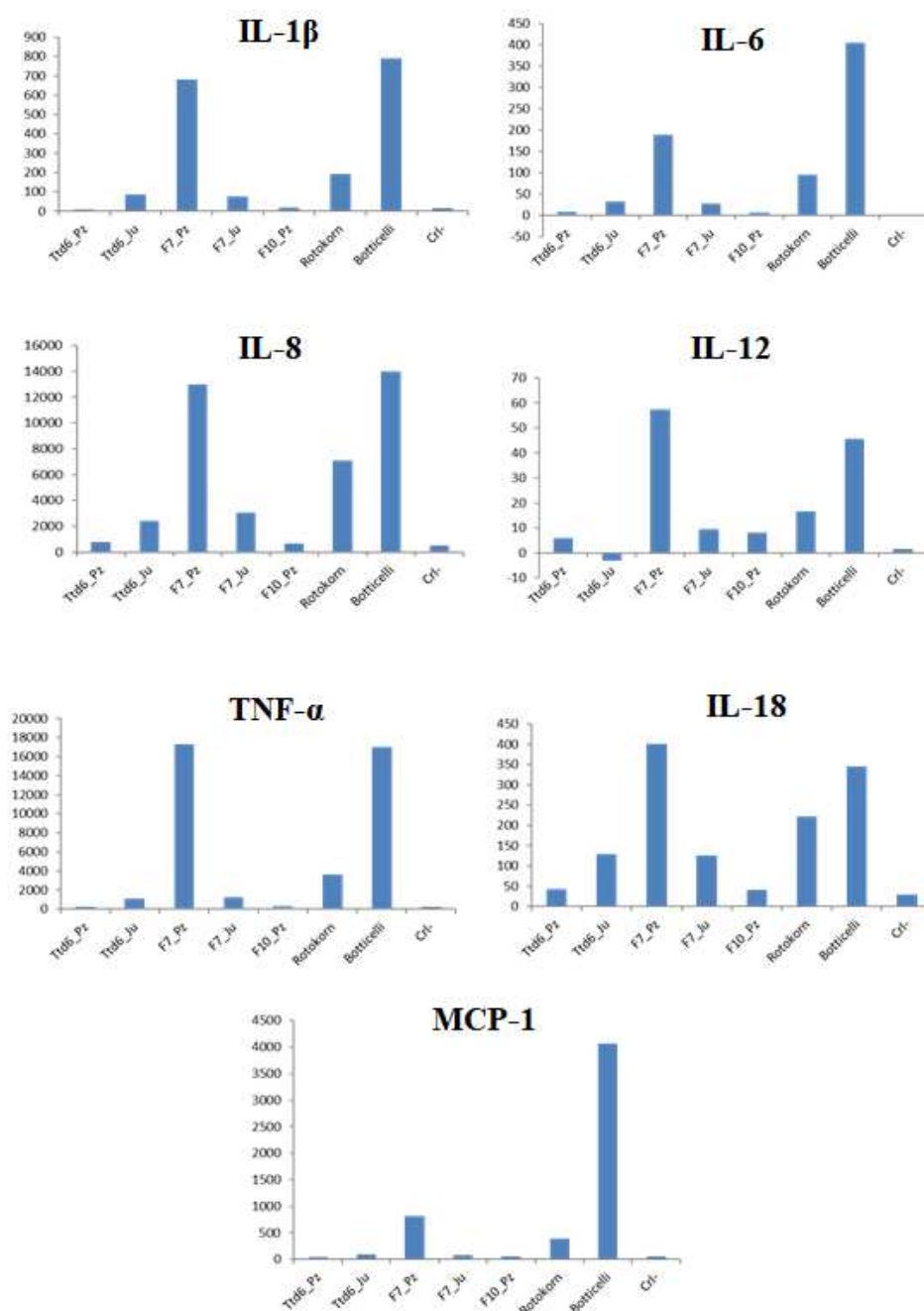
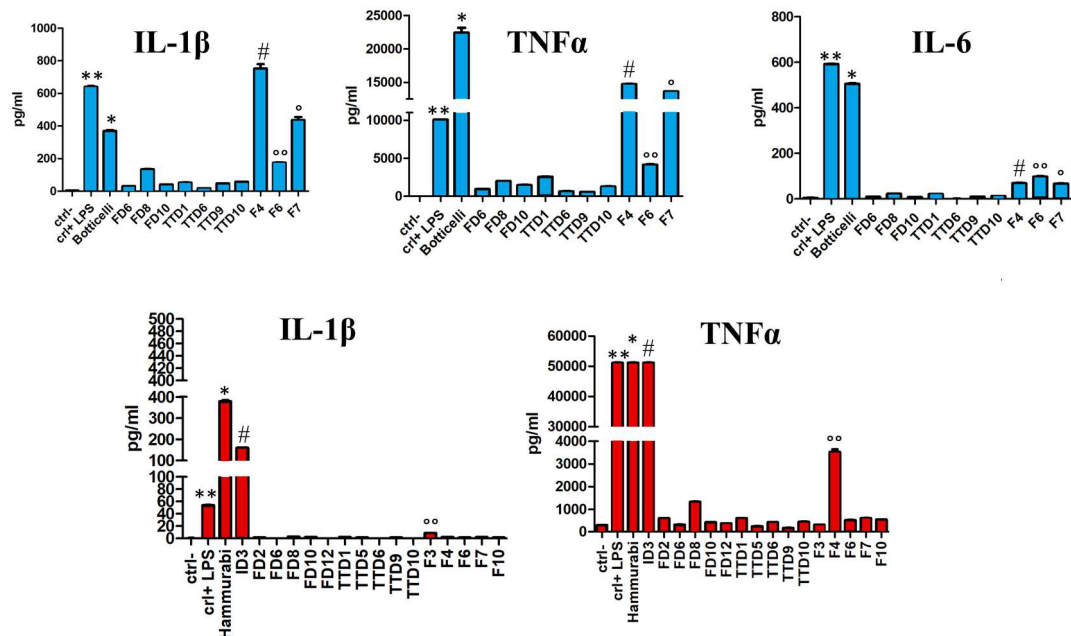


Figura 21: Confronto della produzione delle citochine indicate in figura tra gli ATIs purificati dal *Triticum Turgidum* ssp *Dicoccum* (variente F7) coltivato a Potenza (PZ) ed in Germania (JU). Le cellule sono state coltivate alla concentrazione di 250×10^3 cellule/pozzetto in presenza di ATIs purificati dalle specie indicate alla concentrazione finale di $50\mu\text{g/ml}$.

4.4 Profilo citochinico indotto dagli ATIs purificati dalle diverse specie di grano coltivate nelle tre differenti regioni

Ho quindi proceduto ad un confronto del profilo citochinico indotto dagli ATIs purificati dalle differenti specie di grano coltivate nelle tre aree geografiche e, più precisamente, a Potenza, Ancona e Germania. In Figura 22 sono riportati i grafici relativi alle principali citochine pro-infiammatorie. Si può effettivamente apprezzare come, non solo fattori genetici ma anche ambientali, influenzino notevolmente la quantità di ATIs purificabile da ogni specie di grano.



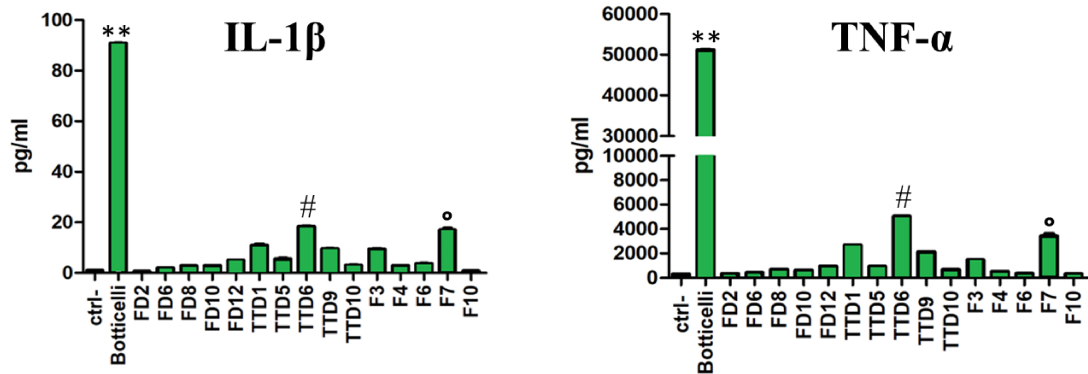


Figura 22: Produzione delle citochine IL-1 β , TNF- α e IL-6 indotte dagli ATIs purificati dai grani indicati in figura, coltivati nei campi di Potenza (in azzurro), Ancona (in rosso) e Julich (Germania) (in verde). Relativamente all'IL-6, la stimolazione con gli ATIs purificati dalle coltivazioni nei campi di Ancona e Germania, il grafico non è riportato poiché i campioni avevano valori simili al controllo negativo, al contrario della stimolazione registrata con i controlli positivi (LPS, Botticelli, Hammurabi e ID3). Per quanto riguarda il campo di Potenza: $p < 0,001 = **$ in comparazione a tutti i gruppi; $*$ in comparazione a tutti i gruppi (ad eccezione di LPS); $\#$ in comparazione a tutti i gruppi (ad eccezione di F6 ed F7); $^{\circ}$ in comparazione a tutti i gruppi (ad eccezione di F4 ed F6); $^{\circ}$ in comparazione a tutti i gruppi (ad eccezione di LPs e Botticelli). Per quanto riguarda il campo di Ancona: $p < 0,001 = **$ in comparazione a tutti i gruppi (ad eccezione dei campioni Hammurabi ed ID3); $*$ in comparazione a tutti i gruppi; $\#$ in comparazione a tutti i gruppi (ad eccezione di Hammurabi); $^{\circ}$ in comparazione a tutti i gruppi (ad eccezione di LPS, Hammurabi ed ID3) Per quanto riguarda il campo di Julich: $p < 0,0001 = **$ in comparazione a tutti i gruppi; $\#$ in comparazione a tutti i gruppi (ad eccezione del campione Botticelli); $^{\circ}$ in comparazione a tutti i gruppi (ad eccezione dei campioni Botticelli e TTD6).

Capitolo 5

Discussione

La celiachia è un'enteropatia permanente su base infiammatoria scatenata dall'ingestione di glutine in soggetti geneticamente predisposti e caratterizzata dalla distruzione della mucosa dell'intestino tenue. Il glutine è la frazione proteica alcol-solubile di grano, orzo e segale: questo complesso proteico, che si trova principalmente in alimenti a base di frumento come pane, pasta, pizza, biscotti e snacks, causa una risposta immunitaria abnorme a livello intestinale che, a sua volta, conduce ad atrofia dei villi, importanti per l'assorbimento dei nutrienti.

La celiachia è dunque una patologia multifattoriale: sebbene il ruolo dell'esposizione al glutine, della predisposizione genetica (con particolare riferimento ai geni HLA-DQ2 e HLA-DQ8) e delle risposte immunitarie specifiche TH1-mediate sia stato ben definito, altri fattori sembrerebbero essere coinvolti nella patogenesi, quali ad esempio componenti del grano non gluteinici. Tra questi, gli ATIs sono stati indicati come forti attivatori della risposta immunitaria innata attraverso l'impegno del complesso TLR4/MD2/CD14 (Junker Y et al., 2012; Cuccioloni M et al., 2017). Per meglio comprendere il ruolo svolto dagli ATIs nella stimolazione della risposta immunitaria innata e, quindi, nella patogenesi della celiachia, in questo studio ho voluto indagare la loro attività biologica *in vitro*, in correlazione non solo della specie di cereale da cui sono stati purificati ma anche dell'ambiente geografico di coltivazione.

I risultati qui presentati mostrano chiaramente come gli ATIs purificati dal grano siano in grado di stimolare *in vitro* le cellule THP-1 alla secrezione di varie citochine pro-infiammatorie, *in primis* l'IL-1 β , TNF- α e l'IL-6, senza comprometterne

la vitalità. Tra le diverse specie di grano analizzate, gli ATIs ottenuti dal *Triticum turgidum* ssp. Dicoccum, variante F4, F6 e F7 coltivato nella zona di Potenza mostrano la più alta attività biologica.

L'analisi globale dei dati cromatografici relativi ai preparati degli ATIs tramite algoritmi di deconvoluzione rivelava la presenza di 10 picchi cromatografici componenti (con pesi molecolari compresi nell'intervallo 1-350 kDa) comuni a tutti i campioni, come mostrato dai bassi valori delle deviazioni standard associati ai volumi di ritenzione di ciascun picco (dati non mostrati). Nonostante le differenti varietà di grano presentassero un contenuto proteico qualitativamente simile, essi mostravano profili cromatografici peculiari che differivano per l'abbondanza relativa dei singoli componenti. Variabilità cromatografiche erano inoltre rilevate confrontando i campioni ottenuti dallo stesso genotipo di grano ma di diversa provenienza geografica. L'analisi effettuata con spettrometria di massa portava all'identificazione del sottotipo di ATIs, denominato con la sigla CM3, come il più abbondante nelle purificazioni ottenute. È di estremo interesse il fatto che l'attività biologica correla positivamente con la quantità relativa di CM3 presente nella campione. La componente CM3 è stata successivamente isolata e sottoposta a FLPC, ottenendo il profilo mostrato in Figura 20 del paragrafo 4.3. I primi quattro profili, presenti nel cromatogramma, sono stati ulteriormente separati e testati singolarmente per la loro attività biologica sulle cellule THP-1: dati preliminari indicherebbero che le frazioni cromatografiche indicate in Figura con la sigla ALTO PM e MEDIO PM1 sarebbe responsabili dell'induzione delle citochine pro-infiammatorie rilevate nei surnatanti delle colture cellulari. ALTO PM contiene specie sopramolecolari particolarmente abbondanti in CM3, mentre MEDIO PM1 contiene tetrameri di CM3. Gli altri due profili, indicati come MEDIO PM2 e MEDIO PM3, contenenti rispettivamente dimeri di CM3 e monomeri di CM3, hanno mostrato una minima o assente attività biologica in termini di stimolazione di citochine infiammatorie. Ulteriori indagini sono attualmente in corso per confermare questi dati ed eventualmente testarne gli effetti immunologici *in vivo*.

Il consumo giornaliero del glutine nella società moderna è di circa 15-30 gr/persona/giorno, equivalente approssimativamente a 0,5-1,5 gr di ATIs: pertanto il glutine commerciale contiene quantità significative di ATIs biologicamente attive. In base ai risultati qui presentati tale quantitativo non andrebbe assolutamente sottovalutato. E' importante, inoltre, sottolineare come gli ATIs rappresentino di fatto

molecole di resistenza primaria prodotte dai cereali per respingere insetti nocivi e parassiti (Ryan C, 2003; Cordain L, 1999): la selezione, e quindi la coltivazione di grani ad alto rendimento e ad alta resistenza ai parassiti, messa in atto dalla società moderna (Ryan C, 2003; Cordain L, 1999), ha inevitabilmente portato a un drastico aumento del contenuto totale di ATIs (Ryan C, 2003). Il fatto che gli ATIs siano potenti stimolatori dell'immunità innata potrebbe essere rilevante non solo per la malattia celiaca, ma probabilmente anche per i pazienti con la cosiddetta sensibilità al glutine e possibilmente anche per pazienti con sindrome dell'intestino irritabile, intestino infiammatorio e persino infiammazione non intestinale. Infatti i pazienti con sensibilità al glutine in assenza di conclamata malattia celiaca mostrano un miglioramento dei loro sintomi in seguito a una dieta priva di cereali (quindi in assenza non solo di glutine ma soprattutto di ATIs); tra l'altro molte pubblicazioni hanno documentato come altre condizioni infiammatorie intestinali trovino giovamento da una dieta analoga (Verdu EF et al., 2015; Biesiekierski J et al., 2013). Inoltre, componenti della famiglia degli ATIs sono già stati precedentemente caratterizzati come allergeni nell'asma dei panettieri e nell'ipersensibilità gastrointestinale al grano (Tatham A e Shewry P, 2008). Si potrebbe quindi speculare circa il fatto che la capacità degli ATIs di stimolare la *pathway* TLR4-mediata contribuisca alla loro allergenicità, come è stato recentemente dimostrato per l'allergene della polvere Der p2, presentante omologia strutturale con la molecola MD2 (Trompette A et al., 2009).

In conclusione, con il presente studio si è dimostrato come le proteine ATIs (con particolare riferimento al sottotipo CM3), presenti nel grano ed in altri cereali correlati, siano in grado di indurre risposte immunitarie innate *in vitro* in termini di produzione di citochine infiammatorie con enormi implicazioni non solo nell'insorgenza e nella patogenesi della celiachia, ma anche per altre malattie intestinali e probabilmente anche patologie non intestinali. Successivi studi sperimentali, sia preclinici, ma soprattutto clinici, finalizzati alla definizione degli effetti di una dieta priva di ATIs sulle malattie infiammatorie intestinali sono sicuramente auspicabili e mandatori.

Capitolo 6

Ringraziamenti

Dov'è il tuo tesoro, là sarà anche il tuo cuore.

Matteo 6.21

Immagino che mi venga posta una domanda bizzarra, una domanda che suona più o meno così: “Quale pensi sia, secondo te, la parola più utilizzata, più detta, più scritta, più pensata... insomma, quale pensi sia la parola più inflazionata di questi 6 anni a Medicina?”. Ci penso su. Qualcuno suggerisce, guardandomi di sottocchi: “Malattia!”, oppure: “Paziente!”, altri ancora sussurrano: “Sangue! Diagnosi! Terapia!”, e c'è chi addirittura si lancia in un ardito: “Iatrogeno!”. Io invece, riflettendoci un po', credo che l'unica parola che risponda a queste caratteristiche sia “Cellula”. Pronuncio: “Cellula!” e mentre articolo la parola sento già di aver risposto correttamente. Dal primo esame di Biologia e Genetica all'ultimo di Oncologia, passando per i meandri della Fisiologia, della Cardiologia, della Medicina di Urgenza, tutto si è sempre rifatto a quella piccola entità. Piccola a rigor di scienza, ma drammaticamente grande nella mia mente di studente dove i micrometri si trasformano in metri e minuscole proteine sono velieri in mari di citoplasma. Sì, tutto parte da lì, tutto inizia in quel fortunatissimo giorno ancestrale quando un piccolo batterio, futuro Mitocondrio, bussò sulla membrana di una cellula eucariote chiedendo asilo e offrendosi di svolgere qualche mansione per sdebitarsi dell'ospitalità. Mi piace immaginare che ci sia stato un Neolitico anche per loro, per le cellule. Le vedo stringersi in piccole comunità per proteggersi a

vicenda, cominciare ad avere degli usi e dei costumi tipici per ogni popolazione a seconda del loro sentimento e del loro territorio: ci sono i Cardiomiociti, a metà strada tra l'Equatore che è l'ombelico e il Polo Nord, su al cervello, che hanno fatto dell'Instancabilità il loro valore più grande ed hanno imparato a stringersi in modo così indissolubile e a ballare perfettamente a tempo, perfettamente coordinati tanto da fare di quella ipnotica danza il loro lavoro. E un po' più a Sud ecco il clan degli Epatociti, posizionati lungo il grande fiume della Vena Porta, nel punto migliore per intrattenersi in commerci e servizi, esperti in compravendita di sostanze e smaltimento dell'usato. Solidali e per nulla ostili, commerciano solo ciò che è stato lasciato passare dalla dogana intestinale, di competenza degli Enterociti, esponenti di una delle popolazioni più antiche, perfetti direttori di ciò che entra e ciò che resta fuori. E lassù, all'estremo Nord, abitano invece i Neuroni: deve fare piuttosto freddo poiché si sono tutti chiusi dentro un grande igloo, stretti stretti tra loro, ma inviano costanti delegazioni per intrattenere rapporti con ogni singolo clan esistente. Hanno fama di essere la popolazione più avanzata ma non per questo disdegnano le altre, anzi, si preoccupano di essere pienamente informati su tutto ciò che accade in ogni parte di questo grande regno e, dove possono, aiutano. Gli Pneumociti hanno fatto del giardinaggio la loro arte e sono bravissimi nel coltivare e curare piantagioni di ossigeno in quella grande foresta di alberi alveolari che sono i polmoni: lavorano alacremente giorno e notte affinché un vento leggero soffi costante tra quelle strane foglie sferiche. Il loro acquirente principale è la popolazione dei Globuli Rossi: esperiti marinai, instancabili viaggiatori, comprano e rivendono ossigeno lungo tutto il regno, e quando dico "tutto" intendo proprio tutto, dal grande Fiume Aorta fino al più piccolo capillare sulla punta dei piedi, all'estremo Sud. E potrei davvero continuare narrando le gesta degli Osteociti, guerrieri impavidi dotati delle più robuste armature, sempre saldi in solidi ma allo stesso tempo flessibili schieramenti, pronti a sostenere le fondamenta ad ogni terremoto. In superficie invece abitano i Cheratinociti che amano così tanto l'intero regno da averlo completamente avvolto e lo difendono, lo tengono caldo durante l'Inverno e fresco in Estate, avvertono tutto ciò che è estraneo e lo riconoscono quando, estraneo, non lo è più... Ebbene, ciò che più mi diverte in tutto questo è la nostra convinzione di essere stati noi i primi in ogni cosa mentre, in verità, le prime in tutto erano loro: le cellule. Si potrebbe anche azzardare un'affermazione: noi siamo cellule, o meglio: siamo noi, le cellule. E se di fatto ripenso a questi ultimi 6 anni non posso non

riconoscere tutte quelle cellule e quei tessuti che mi hanno accompagnato giorno dopo giorno...

...C'è chi è stato per me solido Osso su cui fare affidamento nel mio percorso di istruzione: ringrazio dunque la Professoressa Francesca Fazioli, perché con lei ho dato il via a questo pezzo della mia storia e con lei lo “concludo” con questa tesi. La ringrazio per essere stata una lezione, un consiglio, un punto di vista esperto, una chiaccherata e spesso una risata, che non guasta. La ringrazio soprattutto per averci tenuto molto, a me: questo ha rafforzato e preparato il mio scheletro per tutto ciò che avverrà in futuro.

Altra vertebra fondamentale, senza la quale questa tesi sarebbe nata più difficilmente, è Maristella: grazie per i disegni, gli esperimenti, le spiegazioni. Grazie per essere riuscita ad incastrarmi nelle settimane piene di impegni senza mai rinunciare a chiedermi se andasse tutto bene, in generale. Grazie per il sostegno e la fiducia dati nel modo che ci piace di più, quello scout, che entrambi conosciamo.

...C'è chi è stato per me Cuore e Pancia: prima ancora che agli esami, prima ancora che alle ore di lezione, prima ancora che alle mangiate di studio penso a voi:

Grazie Eva per essere stata non solo una cellula ma l'intero ventricolo (quello sinistro, sì!)...ci siamo già scritti e letti il succo di questi anni, ma qui voglio sottolineare come tu abbia alzato davvero in alto l'asticella: non vorrò avere solo dei colleghi, non vorrò avere solo degli amici...vorrò avere delle Eva nella mia vita, qualcuno che mi sproni ad arrivare a notte fonda con gli occhi gonfi di sonno per terminare un capitolo ma che mi chieda un aiuto l'indomani per svegliarsi, qualcuno che scoppi a ridere e non smetta per un buon quarto d'ora, che fugga dalle api, qualcuno che metta tutto da parte per un'ora di consigli, di progetti, di pausa caffè (ok, dai, “pausa tiramisù” a dir il vero, ma faceva brutto...). E se non troverò qualcuno a questo livello non sarò poi così affranto perché mi basterà alzare la cornetta e non Mastrotta (è partito spontaneamente ad “alzare la cornetta”), ma Eva, l'originale, mi risponderà! Grazie all'intera Famiglia Vitali che mi ha accolto come un quarto figlio: ho un pensiero speciale che mi vortica nel petto tutto per voi...e profuma di tagliatelle di nonna Mari.

Grazie Giorgia, per essere la Leggerezza: ricordo il primo anno, ti sei seduta dietro di me e ridevi quando me ne uscivo con le mie solite scempiaggini, ma lo facevi con una spontaneità così vera che mi ha subito incuriosito... da quel momento mi sono sentito sicuro con te, leggero anche nei discorsi pesanti, più sognatore ma

in modo concreto, più attivo, più spronato...più viaggiatore. Sei un carburante inestinguibile, una guida della Lonely Planet, sei una birra in Piazza del Papa che sempre mi mancherà tantissimo e un volo nella giostra di una qualche città nordica, centrifugati come in una lavatrice ad urlare di essere già puliti!

Grazie Eppi (va beh... non ti ho mai chiamato Simone, figurati ora!) per essere proprio quel pezzetto che mancava per completare il mio puzzle: avevo bisogno di portare con me tutto me stesso in questo percorso e sei spuntato proprio tu da dietro una colonna dell'Aragosta con in mano uno zaino più grande di quello che portavo sulle spalle e me lo hai regalato: c'entravo tutto a meraviglia, e c'era anche un sacco di spazio per qualcosa di più! ... Eravamo entrambi fratelli minori di sorelle maggiori, ma ora siamo anche fratello l'uno dell'altro. Di storie ce ne siamo raccontate in abbondanza, abbiamo fatto incetta di risate, abbiamo creato un nuovo vocabolario comprensibile solo ai pochi eletti e, se c'era da stare in silenzio ad ascoltare, hai sempre creato per me una stanza perfettamente insonorizzata per non lasciarti sfuggire nulla (tralasciamo l'ipoacusia precoce...). Grazie.

Grazie Ilaria... in quanto a Pancia siamo imbattibili: grazie per essere stata proprio quel groviglio allo stomaco quando parte una canzone Disney, quando citiamo il nostro musical preferito ("Do you hear the people sing..."), quando, bacchette alla mano, ci ritroviamo ad Hogwarts invece che all'Univpm! Grazie per essere stata lo Scaustismo anche dove non c'erano tende, fuochi o bambini urlanti. Grazie per essere stati (... meglio "rimasti"?) noi i bambini urlanti. Grazie Simone per essere stato non solo Cuore e Pancia ma anche Fegato e Cervello. Fegato, un po' per il coraggio che mi hai aiutato a sviluppare nei primi anni, un po' per il bicchiere che non smetti mai di riempire (diamo la colpa al sangue veneto!). Cervello, perché che fosse sui libri o su intricati discorsi esistenziali, li abbiamo spremuti per bene quei neuroni. Grazie.

Grazie alle Amiche di una vita (o per la vita, direi!): Chiara, Roberta, Daniela, Camilla, Eleonora, Federica e Cristina... siete la mia casa. Siete un qualcosa in continuo cambiamento ma in qualche modo immutabile, sempre fedele a se stesso e mai banale, mai scontato. A cellule non potete che essere Cuore e Pancia: Cuore perché qualsiasi emozione, luminosa o oscura che sia, passa attraverso voi e, se brillante, risplende ancora di più, se buia, viene rischiarata. Pancia perché quando rido con voi rido di pancia, quando mangio con voi mangio fino a farmi scoppiare la pancia, quando parlo con voi devo usare la pancia per spingere il diaframma,

urlando per farmi sentire (le ottave raggiunte escono fuori dal pentagramma, sì!) e quando semplicemente mi rivedo con voi, sento un gran calore dentro, che nasce nel petto e scende proprio lì, nella Pancia. Siete state le mie batterie in questi 6 anni, quelle sempre ricaricabili. Grazie.

Grazie Cate, Bea, Pierpa, Pux e Ari: quattro costanti, quattro cellule Pacemaker (Bea e Pux poi ve lo spiego...) sempre pronte a darmi quella scossa necessaria quando il caffè non funziona più, sempre pronte a togliermi le nuvole dalla testa per metterci sopra un po' di sole, sempre pronte per una canzone, per una colazione, un tuffo al Passetto, una schitarrata! Sempre pronte per una nuova ricetta, un Harry Potter infinito, due passi fino al porto a fine giornata... anche tutte queste cose di Pancia, anche tutte queste di Cuore.

Grazie Nicola per essere un treno sempre in viaggio, un Orient Express con tantissimi vagoni, uno per ogni stato d'animo, per ogni situazione, necessità... prossima destinazione?

Grazie a tutto lo Scout della vita, la mia quarta dimensione: grazie per essere stato il mio vero primo incarico lavorativo: mi hai insegnato a prendermi cura delle persone. Mi hai insegnato che le Parole possono essere la prima medicina. Mi hai insegnato che un po' di Natura e una bella Storia sono uno scudo impenetrabile contro tanti dolori. Mi hai insegnato che "Tutto, tutti insieme" batte alla grande "Tutto, solo io"... ed è anche più divertente. Mi hai insegnato Affetto, Abnegazione e Coraggio... mi hai insegnato Gesù: cos'altro deve sapere un medico?

E in fine c'è chi è stato "me" per me, perché non c'è una singola cellula del mio corpo che non sia abitata dalla mia Famiglia: ho preso la forza dai muscoli di Papà, la logica dal pensiero di Mamma, la furbizia dallo sguardo di Silvia e il calore dalla pelle di Marta. Non siete solo Osso, solo Cuore o Pancia, non siete solo Muscolo o Sangue... siete tutto questo e ancora di più! C'è un tessuto che nessuno ha mai studiato, particolare perché invisibile e perché non invecchia dopo anni come fanno gli altri. Non ha una localizzazione precisa: è un po' ovunque. Non vive di ossigeno e glucosio ma si nutre di discorsi, di esperienza, di sostegno... siete quel tessuto, siete un'Anima... siamo noi che, solo insieme, formiamo un organismo perfetto... sono io che, solo con e grazie a voi, sono io. Grazie.

Bibliografia

Abbas A, Lichtman A, Pillai S e Sozzani S (2010) *Immunologia cellulare e molecolare*. VII edizione, Edra Edizioni, Milano. ISBN: 9788821431760.

Ashfaq-Khan M, Aslam M, Qureshi M, Senkowski M, Yen-Weng S, Strand S, Kim YO, Pickert G, Schattenberg J e Schuppan D (2019) “Dietary wheat amylase trypsin inhibitors promote features of murine non-alcoholic fatty liver disease”. *Scientific Reports* 9: p. 17463.

Bajor J, Szakács Z, Farkas N, Hegyi P, Illés A, Solymár M, Petervari E, Balasko M, Par G, Sarlós P, Szűcs Á, Czimmer J, Szemes K, Huszár O, Varjú P e Vincze A (2019) “Classical celiac disease is more frequent with a double dose of HLA-DQB1*02: A systematic review with meta-analysis”. *PLOS ONE* 14: e0212329.

Bellinghausen I, Weigmann B, Zevallos V, Maxeiner J, Reissig S, Waisman A, Schuppan D e Saloga J (2018) “Wheat amylase/trypsin inhibitors exacerbate intestinal and airway allergic immune responses in humanized mice”. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 143: pp. 201–212.

Biesiekierski J, Peters S, Newnham E, Rosella O, Muir J e Gibson P (2013) “No Effects of Gluten in Patients With Self-Reported Non-Celiac Gluten Sensitivity After Dietary Reduction of Fermentable, Poorly Absorbed, Short-Chain Carbohydrates”. *Gastroenterology* 145: pp. 320–328.

Björck S, Lindehammer S, Fex M e Agardh D (2014) “Serum cytokine pattern in young children with screening detected celiac disease”. *Clinical & Experimental Immunology* 179: pp. 230–235.

- Bold J e Rostami K (2011) “Gluten tolerance; Potential challenges in treatment strategies”. *Gastroenterology and hepatology from bed to bench* 4: pp. 53–57.
- Caio G, Volta U, Sapone A, Leffler D, Giorgio R, Catassi C e Fasano A (2019) “Celiac disease: a comprehensive current review”. *BMC Medicine* 17: pp. 142–162.
- Calasso M, Francavilla R, Cristofori F, Angelis MD e Gobetti M (2018) “New Protocol for Production of Reduced-Gluten Wheat Bread and Pasta and Clinical Effect in Patients with Irritable Bowel Syndrome: A randomised, Double-Blind, Cross-Over Study”. *Nutrients* 10: pp. 1873–1892.
- Catassi C, Copparoni R, Corazza GR, De Stefano S, Ruocco G, Silano M, Troncone R e Alessandro V (2015) “Protocollo per la diagnosi e il follow-up della celiachia”. *G.U. 19-8-2015* 191: pp. 148–158.
- Catassi C, Rossini M, Ratsch IM, Bearzi I, Santinelli A, Castagnani R, Pisani E, Coppa G e Giorgi P (1993) “Dose dependent effects of protracted ingestion of small amounts of gliadin in coeliac disease children: A clinical and jejunal morphometric study”. *Gut* 34: pp. 1515–1519.
- Ciccocioppo R, Sabatino A e Corazza G (2005) “The immune recognition of gluten in coeliac disease”. *Clinical and experimental immunology* 140: pp. 408–416.
- Cordain L (1999) “Cereal Grains: Humanity’s Double-Edged Sword”. *World review of nutrition and dietetics* 84: pp. 19–73.
- Cuccioloni M, Mozzicafreddo M, Bonfili L, Cecarini V, Giangrossi M, Falconi M, Saitoh SI, Eleuteri AM e Angeletti M (2017) “Interfering with the high-affinity interaction between wheat amylase trypsin inhibitor CM3 and toll-like receptor 4: In silico and biosensor-based studies”. *Scientific Reports* 7: pp. 13169–13170.
- Elli L e Marinoni B (2019) “Gluten Rhapsody”. *Nutrients* 11: pp. 589–593.
- Ensari A e Marsh MN (2019) “Diagnosing Celiac Disease: A Critical Overview”. *The Turkish Journal of Gastroenterology* 30: pp. 389–397.
- Filion M (2012) *Quantitative Real-time PCR in Applied Microbiology*. Caister Academic Press, Norfolk. ISBN: 9781908230010.

- Freeman HJ (2008) "Refractory celiac disease and sprue-like intestinal disease". *World journal of gastroenterology* 14.6: pp. 828–830. ISSN: 1007-9327.
- Freeman HJ (2015) "Celiac Disease: A Disorder Emerging from Antiquity, Its Evolving Classification and Risk, and Potential New Treatment Paradigms". *Gut and Liver* 9: pp. 28–37.
- Haboubi N, Taylor S e Jones S (2006) "Coeliac disease and oats: A systematic review". *Postgraduate medical journal* 82: pp. 672–678.
- Herpen T von, Goryunova S, Schoot J, Mitreva M, Salentijn E, Vorst O, Schenk M, Veelen P, Koning F, Soest L, Vosman B, Bosch D, Hamer R, Gilissen L e Smulders MJM (2006) "Alpha-gliadin genes from the A, B, and D genomes of wheat contain different sets of celiac disease epitopes". *BMC genomics* 7: pp. 1–13.
- Jackson J, Eaton W, Cascella N, Fasano A e Kelly D (2011) "Neurologic and Psychiatric Manifestations of Celiac Disease and Gluten Sensitivity". *The Psychiatric quarterly* 83: pp. 91–102.
- Junker Y, Zeissig S, Kim SJ, Barisani D, Wieser H, Leffler D, Zevallos V, Libermann T, Dillon S, Freitag T, Kelly C e Schuppan D (2012) "Wheat amylase trypsin inhibitors drive intestinal inflammation via activation of toll-like receptor 4". *The Journal of experimental medicine* 209: pp. 2395–3408.
- Kinross-Wright J, Potu K, Pownell B, Lamfers R e Bleeker J (2018) "EBV-Associated Lymphoproliferative Disorder and Hemophagocytic Lymphohistiocytosis in a Patient with Severe Celiac Disease". *Case Reports in Hematology* 2018: p. 606351.
- Lionetti E e Catassi C (2011) "New Clues in Celiac Disease Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Manifestations, and Treatment". *International reviews of immunology* 30: pp. 219–231.
- Livak KJ e Schmittgen TD (2001) "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method". *Methods* 25.4: pp. 402–408. ISSN: 1046-2023.
- Mackay I (2007) *Real-Time PCR in Microbiology: From Diagnosis to Characterization*. Caister Academic Press, Norfolk.

- Makovicky P, Caja F, Rimárová K, Samasca G e Vannucci L (2020) “Celiac disease and gluten-free diet: past, present and future”. *Gastroenterology and hepatology from bed to bench* 13: pp. 1–7.
- Martinelli P, Troncone R, Paparo F, Torre P, Trapanese E, Fasano C, Lamberti A, Budillon G, Nardone G e Greco L (2000) “Coeliac disease and unfavourable outcome of pregnancy”. *Gut* 46: pp. 332–335.
- Nelson DL e Cox MM (2011) *Introduzione alla biochimica di Lehninger, IV edizione*. IV edizione, Zanichelli editore, Bologna. ISBN: 9788808723284.
- Palova Jelinkova L, Dáňová K, Drašarová H, Dvořák M, Funda D, Fundova P, Kotrbova-Kozak A, Cerna M, Kamanova J, Martin S, Freudenberg M e Tucková L (2013) “Pepsin digest of wheat gliadin fraction increases production of IL-1 β via TLR4/MyD88/TRIF/MAPK/NF- κ B signaling pathway and an NLRP3 inflammasome activation”. *PloS one* 8: e62426.
- Poddighe D, Rebuffi C, De Silvestri A e Capittini C (2020) “Carrier frequency of HLA-DQB1*02 allele in patients affected with celiac disease: A systematic review assessing the potential rationale of a targeted allelic genotyping as a first-line screening”. *World Journal of Gastroenterology* 26: pp. 1365–1381.
- Rashtak S e Murray J (2009) “Celiac Disease in the Elderly”. *Gastroenterology clinics of North America* 38: pp. 433–446.
- Rouvroye M, Zijtveld S, Bonnet P, Spierings E e Bontkes H (2019) “HLA-DQ Typing Kits in Diagnosis and Screening for Celiac Disease”. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers* 23: pp. 418–422.
- Rugarli C (2016) *Medicina interna sistematica*. VII edizione, Edra Edizioni, Milano.
- Ryan C (2003) “Protease Inhibitors In Plants: Genes For Improving Defenses Against Insects And Pathogens”. *Annual Review of Phytopathology* 28: pp. 425–449.
- Sharma N, Ch V, Sharma S, Kapoor P, Kumari A e Garg M (2020) “Pathogenesis of Celiac Disease and Other Gluten Related Disorders in Wheat and Strategies for Mitigating Them”. *Frontiers in Nutrition* 7: pp. 6–32.

- Silvester J e Duerksen D (2013) “Five things to know about...celiac disease”. *CMAJ: Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* 185.1: p. 60.
- Singh P, Arora A, Strand T, Leffler D, Catassi C, Green P, Kelly C, Ahuja V e Makharia G (2018) “Global Prevalence of Celiac Disease: Systematic Review and Meta-analysis”. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 16: pp. 823–836.
- Sollid L e Jabri B (2011) “Celiac disease and transglutaminase 2: Model for post-translational modification of antigens and HLA association in the pathogenesis of autoimmune disorders”. *Current opinion in immunology* 23: pp. 732–738.
- Tatham A e Shewry P (2008) “Allergy to wheat and related cereals”. *Clinical & Experimental Allergy* 38: pp. 1712–1726.
- Tchewonpi S, Huschek G, Bönick J, Homann T, Rawel H e Gergeleit W (2019) “A New Approach of Extraction of α -Amylase/trypsin Inhibitors from Wheat (*Triticum aestivum* L.), Based on Optimization Using Plackett–Burman and Box–Behnken Designs”. *Molecules* 24: pp. 3589–3607.
- Al-Toma A, Volta U, Auricchio R, Castillejo G, Sanders D, Cellier C, Mulder C e Lundin K (2019) “European Society for the Study of Coeliac Disease (ESsCD) guideline for coeliac disease and other gluten-related disorders”. *United European Gastroenterology Journal* 7: pp. 583–613.
- Trompette A, Divanovic S, Visintin A, Blanchard C, Hegde R, Madan R, Thorne P, Wills-Karp M, Gioannini T, Weiss J e Karp C (2009) “Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein”. *Nature* 457: pp. 585–588.
- Troncone R e Auricchio S (2007) “Rotavirus and Celiac Disease: Clues to the Pathogenesis and Perspectives on Prevention”. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 44: pp. 527–528.
- Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T e Tada K (1980) “Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)”. *International Journal of Cancer* 26.2: pp. 171–176.

- Tundo S, Lupi R, Lafond M, Giardina T, Larre C, Denery-Papini S, Morisset M, Kalunke R, Sestili F e Masci S (2018) “Wheat ATI CM3, CM16 and 0.28 Allergens Produced in *Pichia Pastoris* Display a Different Eliciting Potential in Food Allergy to Wheat”: pp. 101–114.
- Valvano M, Longo S, Stefanelli G, Frieri G, Viscido A e Latella G (2020) “Celiac Disease, Gluten-Free Diet, and Metabolic and Liver Disorders”. *Nutrients* 12: pp. 940–954.
- Verdu EF, Galipeau HJ e Jabri B (2015) “Novel players in coeliac disease pathogenesis: role of the gut microbiota”. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 12: pp. 497–506.
- Violato M e Gray A (2019) “The impact of diagnosis on health-related quality of life in people with coeliac disease: a UK population-based longitudinal perspective”. *BMC Gastroenterology* 19: pp. 68–79.
- Zevallos V, Raker V, Tenzer S, Jimenez-Calvente C, Ashfaq-Khan M, Rüssel N, Pickert G, Schild H, Steinbrink K e Schuppan D (2016) “Nutritional Wheat Amylase-Trypsin Inhibitors Promote Intestinal Inflammation via Activation of Myeloid Cells”. *Gastroenterology* 152: pp. 1100–1113.