

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRIESTE

Sede Amministrativa del Dottorato di Ricerca

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO

Sede convenzionata

Dipartimento Univ. Clinico di Scienze della Riproduzione e dello Sviluppo

I.R.C.C.S. BURLO GAROFOLO

XX CICLO del
Dottorato di Ricerca in

**Medicina materno-infantile, pediatria dello sviluppo e dell'educazione,
perinatologia**

(Ssd: Area 06-Scienze Mediche MED/38-pediatria generale e specialistica)

ACCURATEZZA E CORRELAZIONE ISTOLOGICA DEGLI ANTICORPI ANTI ACTINA NELLA DIAGNOSI DI MALATTIA CELIACA

Dottoranda:

Dott.ssa Fabbro Elisa

Coordinatore:

**Chiar.mo Prof. Alessandro Ventura
(Università di Trieste)**

Tutore e Relatore:

**Dott. Tarcisio Not
(Università di Trieste)**

Anno Accademico 2006-2007

INDICE

RIASSUNTO E SCOPO DELLA TESI

Cap1 LA CELIACHIA	Pg. 8
1.1 INTRODUZIONE	Pg. 8
1.2 EPIDEMIOLOGIA DELLA MALATTIA CELIACA	Pg. 11
1.3 DIAGNOSI DELLA MALATTIA CELIACA	Pg. 14
1.4 MODIFICAZIONI DELLA MUCOSA INTESTINALE NEI SOGGETTI CELIACI	Pg. 19
1.5 GENETICA	Pg. 21
1.5.1 GENI NON-HLA NELLA MALATTIA CELIACA	Pg. 22
1.6 RISPOSTA IMMUNITARIA	Pg. 25
1.6.1 RISPOSTA IMMUNITARIA CELLULO MEDIATA	Pg. 27
1.6.2 RISPOSTA IMMUNITARIA UMORALE	Pg. 33
Cap 2 CELIACHIA E AUTOIMMUNITÀ	Pg. 34
2.1 LA CARDIOMIOPATIA DILATATIVA IDIOPATICA	Pg. 36
Cap 3 L'ACTINA	Pg. 39
3.1 ASSEMBLAGGIO E DISASSEMBLAGGIO	Pg. 40
3.2 ORGANIZZAZIONE DEI FILAMENTI E DELLE PROTEINE ASSOCIATE	Pg. 41
3.2.1 LA GELSOLINA	Pg. 42
Cap 4 NOVITA' NELLA DIAGNOSI DI CD: GLI ANTICORPI ANTI ACTINA DI TIPO IgA	Pg. 44
4.1 CORRELAZIONE POSITIVA TRA LA SEVERITA' DELLA LESIONE INTESTINALE E	

LA PREVALENZA DEGLI AAA	Pg. 45
4.2 CATTERISTICHE DEL TEST: SENSIBILITA' E SPECIFICITA' ELEVATA	Pg. 46
4.3 POSSIBILE RUOLO DEGLI AAA NELLA DIAGNOSI DI MALATTIA CELIACA	Pg. 47
Cap 5 OBBIETTIVI DEL LAVORO	Pg. 49
Cap 6 MATERIALI E METODI	Pg. 50
6.1 DOSAGGIO DEGLI ANTICORPI ANTI ACTINA MEDIANTE IMMUNOFLUORESCENZA INDIRETTA	Pg. 50
6.2 LA COLTURA DELLE CELLULE HEP-2b	Pg. 52
6.2.1 IMMUNOFLUORESCENZA SU CELLULE HEP 2b IN CULTURA	Pg. 52
6.2.2 ALLESTIMENTO DI VETRINI ATTIVATI CON CELLULE HEP-2b	Pg. 53
6.3 UTILIZZO DI TRATTAMENTI CHIMICO-FISICO PER AUMENTARE LA SENSIBILITA' DEL TEST	Pg. 54
6.4 VALUTAZIONE DELLA LESIONE INTESTINALE	Pg. 54
6.5 ANALISI STATISTICA	Pg. 56
6.5.1 SENSIBILITA' E SPECIFICITA'	Pg. 56
6.5.2 CORRELAZIONE TRA LA PREVALENZA DEGLI AAA E LA SEVERITA DELLA LESIONE INTESTINAE	Pg. 56
6.6 CONFRONTO TRA PIU' OPERATORI E RIPRODUCIBILITA' DEL TEST	Pg. 57
6.7 TEST D'INIBIZIONE PER LA VERIFICA DEL RUOLO DELLA GELSOLINA SIERICA	Pg. 58
6.8 CONFRONTARE GLI ANTICORPI ANTI ACTINA CON GLI ANTI TRANSGLUTAMMINASI	Pg. 60
6.9 SELEZIONE DI LIBRERIE ANTICORPALI TOTALI DI MUCOSA INTESTINALE DI PAZIENTI CELIACI CON ACTINA G E h -tTG	Pg. 61

6.9.1 FINGERPRINTING	Pg. 66
a. PCR	
b. DIGESTIONE	
6.9.2 SEQUENZIAMENTO	Pg. 67
a. PRE-PCR DI SEQUENZA	
b. PURIFICAZIONE DELLA PRE-PCR DI SEQUENZA	
c. PCR DI SEQUENZA	
d. PRECIPITAZIONE DELLA PCR DI SEQUENZA	
6.10 POPOLAZIONE STUDIATA	Pg. 70
 Cap 7 RISULTATI DELLO STUDIO	 Pg. 70
7.1 SENSIBILITA 'E SPECIFICITA' DEL TEST	Pg. 71
7.2 CORRELAZIONE CON LA SEVERITA' DELLA LESIONE INTESTINALE	Pg. 75
a. TRATTAMENTO FISICO	
b. TRATTAMENTO CHIMICO	
7.3 VALORE PREDITTIVO POSITIVO (VPP) E VALORE PREDITTIVO NEGATIVO (VPN)	Pg. 76
7.4 CONFRONTO DELLA LETTURA TRA PIÙ OPERATORI	Pg. 77
7.5 VERIFICA DEL RUOLO DELLA GELSOLINA SIERICA	Pg. 78
7.6 TESTARE LA POSITIVITA' DEGLI AAA IN UN GRUPPO DI PROBANDI CON CARDIOMIOPATIA DILATATIVA E NEI LORO PARENTI DI PRIMO GRADO	Pg. 79
7.7 CONFRONTARE GLI AAA CON GLI ANTICORPI ANTI Ttg DIAGNOSI DI MALATTIA CELIACA	Pg. 80
7.8 SELEZIONI DI UNA LIBRERIA TOTALE PER LA VERIFICA DELLA PRESENZA DI A.A.A. NELLA MUCOSA INTESTINALE DI UNA PAZIENTE CON CELIACHIA E CARDIOMIOPATIA	Pg. 81

BIBLIOGRAFIA

RIASSUNTO E SCOPO DELLA TESI

La celiachia (CD) è un'enteropatia immuno-mediata scatenata dall'ingestione di glutine in soggetti geneticamente predisposti. La prevalenza di questa patologia varia tra 1/100 e 1/300; nella sua forma tipica si manifesta con diarrea, malassorbimento, e deficit di crescita, ma è ora noto che esistono molte forme atipiche, con eterogeneità di manifestazioni spesso extraintestinali, o addirittura forme asintomatiche che sfuggono alla diagnosi.

Per la diagnosi abbiamo oggi a disposizione markers sierologici molto sensibili e specifici, ma in ogni caso la conferma di celiachia prevede l'esecuzione di una biopsia intestinale che dimostri le tipiche alterazioni istologiche.

Recenti lavori hanno evidenziato che in una buona percentuale di soggetti con celiachia vengono prodotti, oltre agli anticorpi anti-Endomisio e anti-Transglutaminasi, presenti nella quasi totalità dei pazienti, gli anticorpi anti-Actina (AAA) e dal momento che questi sembrano correlare strettamente con la severità della lesione intestinale sono stati proposti come markers sierologici di danno istologico

La messa a punto di una metodica standardizzata in grado di dosarli potrebbe quindi risultare molto utile e potrebbe già nell'immediato futuro rivoluzionare la diagnostica della malattia celiaca in quanto una semplice indagine sierologica, non invasiva e di basso costo, che preveda il dosaggio degli anticorpi anti-Transglutaminasi (noto test ad elevata sensibilità e specificità) unitamente a quello degli anticorpi anti-Actina, potrebbe rappresentare una valida alternativa alla biopsia intestinale.

In questo contesto si inserisce il progetto relativo al mio Dottorato di Ricerca. Lo studio si propone infatti di confermare i risultati precedentemente ottenuti e di mettere a punto un procedimento operativo semplice e ripetibile.

In una prima fase il dosaggio degli anticorpi anti-Actina è stato eseguito mediante un test di immunofluorescenza indiretta su sieri opportunamente trattati.; si è notato, infatti, che un pretrattamento fisico (riscaldamento a 56°C per 45 minuti) o chimico (aggiunta di EDTA a una concentrazione 0,1mM) dei sieri inibisce una proteina, la Gelsolina, che, se presente, maschera il legame Actina-anticorpo rendendo il test poco sensibile.

Da questo studio è emerso che la presenza degli anticorpi anti-Actina correlava con la severità della lesione intestinale.

E' stata poi valutata la validità del test mediante il calcolo statistico di sensibilità e specificità e tramite la misurazione della discordanza tra la lettura di più operatori diversi .

Il lavoro svolto ha purtroppo dimostrato una bassa sensibilità e specificità di questo test in particolare se confrontato con la metodica ELISA classica utilizzata per la ricerca degli anticorpi anti Transglutaminasi tessutale nei sieri dei pazienti celiaci.

Lo screening di una libreria totale di paziente celiaco ha permesso di identificare alcuni cloni anti Actina positivi che producono un pattern d'immunofluorescenza del tutto identico a quello dei sieri AAA positivi trattati .Questo dimostra che gli anticorpi selezionati da librerie totali sono gli stessi di quelli presenti nel siero dei pazienti celiaci e che il trattamento chimico e fisico non altera il sito di legame antigenico ma va a inibire esclusivamente la proteina sierica che mascherando il sito di legame dell'antigene all'anticorpo rende il test poco sensibile.

La disponibilità di questi cloni di anticorpi anti Actina selezionati da una libreria totale di mucosa intestinale di celiaco potrà far comprendere meglio il ruolo di questi autoanticorpi nella patogenesi del danno intestinale della malattia celiaca.

Nella seconda parte di questo Dottorato è stata valuta la prevalenza degli anticorpi anti Actina anche in pazienti con Cardiomiopatia Dilatativi Idiopatica (CMPD) e nei loro famigliari di primo grado. Questa malattia ha un'eziopatogenesi per lo più sconosciuta. Probabilmente si tratta di una condizione a patogenesi eterogenea tuttavia almeno in una certa parte dei pazienti la Cardiomiopatia Dilatativa Idiopatica potrebbe essere un malattia autoimmune organo specifica in cui il processo distruttivo è ristretto all' organo bersaglio e gli autoanticorpi riconoscono e reagiscono con lo specifico antigene Il dato interessante che emerge da questa tesi è che la positività agli AAA non è casuale ma è presente in gruppi di famiglie. Si può quindi ipotizzare che gli anticorpi anti-Actina siano un potenziale fattore patogenetico e non un' epifenomeno dell' infiammazione tessutale di fase acuta.

Nel prossimo futuro saranno necessari studi prospettici per l' identificazione dei meccanismi patogenetici alla base di questa associazione e per comprendere se una precoce identificazione degli anticorpi anti Actina tra i famigliari di soggetti con CMPD possa modificare la storia naturale di questa patologia gravata da una severa prognosi

(.Fabbro E et al, *"Uselessness of anti-actin antibody in celiac disease screening"* Clinica Chimica Acta 390; 2008 134–137)

1 LA CELIACHIA

1.1 INTRODUZIONE

La malattia celiaca (CD) è un'enteropatia di tipo autoimmune che si manifesta, in individui geneticamente predisposti, in seguito al consumo di glutine. L'ingestione di glutine provoca in questi soggetti una complessa reazione immunitaria che può tradursi in lesioni della mucosa intestinale in grado di causare alterazioni dell'assorbimento.

L'espressione del danno intestinale della malattia celiaca è tipicamente rappresentata dall'atrofia dei villi corredata da iperplasia delle cripte del Lieberkühn. Tali condizioni caratteristicamente e patognomicamente scompaiono dopo eliminazione del glutine dalla dieta.

La storia della CD ha origini molto lontane nel tempo, infatti già nel lontano 250 a.C. Galeno aveva descritto la presenza di questo fenomeno intestinale sia nel bambino che nell'adulto.

Nel I secolo d.C. Celso introdusse l'aggettivo celiaco (dal greco ..e..a..s, intestino) per identificare una patologia della cavità addominale a carattere diarroico, mentre, a sua volta Areteo di Cappadocia ne riconobbe l'andamento protratto nel tempo e le difficoltà nella cura.

Ad ogni modo, è soltanto nel 1888 che si ha la prima definizione di malattia celiaca come sindrome da malassorbimento intestinale ad opera di Samuel Gee, che individuò nella dieta una possibilità di terapia [1].

La storia moderna della CD ricevette un fondamentale impulso dal medico olandese Willem Karel Dicke che, negli anni '50, riuscì a dimostrare il ruolo eziologico del glutine nella sua patogenesi [2, 3].

Dicke osservò che durante la seconda guerra mondiale, i bambini che soffrivano di diarrea cronica associata a sindromi di malassorbimento intestinale, sintomi tipici della malattia celiaca, migliorarono notevolmente quando a causa del conflitto ci fu il cosiddetto "inverno digiuno" (1944-1945) in cui, venendo a mancare le scorte di farina e frumento, i piccoli pazienti venivano sfamati con patate, banane ed altri alimenti inconsueti tra cui i

bulbi di tulipano. Finita la guerra, con il ritorno alla normalità alimentare, Dicke notò il ripresentarsi dei sintomi. Grazie a questa brillante osservazione, egli giunse all'identificazione del glutine come agente eziologico della malattia celiaca.

L'anomala sensibilità nei confronti del glutine sembrerebbe conferita e/o comunque favorita da una particolare costituzione genetica. Tale assetto genetico risulta fortemente associato a geni del sistema HLA (Human Leukocyte Antigen Complex), anche se recentemente sono stati individuati geni non appartenenti a tale sistema che appaiono essere coinvolti [4].

Nei soggetti geneticamente predisposti il consumo di glutine innesca una complessa risposta immune sia cellulo-mediata, avente come bersaglio ultimo la mucosa intestinale, sia umorale, evidenziata dalla produzione di autoanticorpi [5].

La CD costituisce un affascinante modello di malattia arricchito ogni giorno da nuove acquisizioni, ma a tutt'oggi ancora poco è noto sulle possibili origini di questa intolleranza.

L'ipotesi attualmente più accreditata è basata sul fatto che l'uomo in origine non introduceva glutine con la dieta, né coltivava il grano da cui quest'ultimo deriva, ma con il passare del tempo da cacciatore del neolitico è diventato "inventore" dell'agricoltura imparando sia a coltivarlo che a nutrirsene.

Su questa base, è stato ipotizzato che a questo cambiamento del comportamento alimentare, cioè il passaggio da un'alimentazione prettamente di tipo carnivoro ad una comprendente prodotti dell'agricoltura, non tutti gli uomini si sono adattati allo stesso modo. In alcuni casi, infatti, il sistema HLA avrebbe riconosciuto il glutine come proteina non "tollerabile", in maniera analoga ad un antigene estraneo, scatenando, come conseguenza, una risposta immunitaria "irragionevole", che porterebbe allo sviluppo dell'autoimmunità [6, 7]. Sebbene il principale organo bersaglio della malattia celiaca sia l'intestino tenue, lo spettro clinico di tale condizione è estremamente eterogeneo comprendendo manifestazioni molto diverse che variano sia da paziente a paziente che con l'età di insorgenza della malattia [5, 8, 9].

Negli ultimi anni sono state descritte forme cosiddette atipiche della malattia celiaca, in cui la sintomatologia si estende anche a livello extraintestinale presentandosi con ipersensibilità a livello cutaneo (dermatite erpetiforme), ipoplasia dello smalto dei denti,

artrite, bassa statura, osteoporosi, problemi neurologici (atassia, epilessia), epatite cronica ed ipertransaminasemia [5, 10, 11].

Tra le forme atipiche della malattia celiaca è doveroso riportare sia la cosiddetta forma latente, caratterizzata dalla positività ai marcatori sierologici (anticorpi antiendomizio ed antitransglutaminasi tessutale) ma con negatività istologica (assenza di atrofia dei villi), sia quella silente o asintomatica, caratterizzata dall'assenza di sintomatologia evidente [5, 10].

Lavori recenti sembrano, inoltre, indicare che la malattia celiaca può essere considerata come un fattore di predisposizione allo sviluppo di altre patologie autoimmuni, quali, in particolare, il diabete mellito insulino-dipendente di tipo I, la tiroidite di Hashimoto e la sclerosi multipla [12,15]

La prevalenza di malattie autoimmuni in soggetti affetti da malattia celiaca è, infatti, significativamente più alta rispetto alla popolazione generale. È ipotizzabile che l'associazione tra la malattia celiaca e le altre patologie autoimmuni possa essere dovuta ad un comune substrato genetico [16,18].

Negli anni passati la CD era considerata una malattia tipica dell'infanzia ma tale convinzione è stata recentemente rivista. Infatti, a partire dai primi anni '90 fino a tutt'oggi si sta assistendo ad un drastico incremento nel numero delle diagnosi di malattia celiaca a carico di soggetti in età adulta [10,19].

1.2 EPIDEMIOLOGIA DELLA MALATTIA CELIACA

I primi studi epidemiologici sulla malattia celiaca sono stati condotti in Europa a partire dal 1950. Una prima analisi di tipo descrittivo ha rivelato, sulla base dei sintomi clinici tipici, la distribuzione, intesa come frequenza, della CD nelle diverse popolazioni europee. Successivamente, con studi di tipo analitico e investigativo, si è cercato invece di definire i valori di incidenza (numero di nuovi malati insorti in una popolazione in un dato periodo di tempo) e di prevalenza (numero di malati totali presenti in una popolazione in un certo periodo di tempo) della malattia. Negli anni '50 in alcuni paesi europei, in particolare Inghilterra e Galles, è stata registrata un'incidenza intorno ad 1:8000, mentre in Scozia sono stati rilevati valori intorno ad 1:4000.

La malattia si presentava maggiormente nei bambini, tanto da farla considerare per lungo tempo una condizione di ambito prettamente pediatrico [20].

In quest'epoca, la diagnosi di malattia celiaca era ancora esclusivamente basata sulla sintomatologia clinica tipica e, dunque, è chiaro che anche i parametri epidemiologici riflettevano la scarsità di conoscenze del tempo.

La consapevolezza della malattia è molto aumentata intorno al 1960 quando i primi test per valutare lo stato di malassorbimento (misurazione dei grassi fecali e valutazione dell'assorbimento intestinale dello xilosio dopo ingestione di dosi note di quest'ultimo) sono stati messi a punto. Infatti, gli studi epidemiologici successivi all'introduzione di questi nuovi test, hanno registrato un aumento della prevalenza della malattia in Irlanda, Scozia e Svizzera con un valore calcolato nel 1970 di circa 1:450–1:500 [21,23]. Sulla base di questo incremento di prevalenza della malattia, sono stati suggeriti cambiamenti nella dieta abituale ed il ritardo nell'introduzione di glutine nella dieta infantile e durante lo svezzamento.

In seguito all'adozione di questi accorgimenti i tassi d'incidenza della malattia in Inghilterra ed in Irlanda hanno subito una notevole diminuzione, suscitando grande ottimismo da parte dei ricercatori. Gioia ed euforia però sono durati poco, in quanto studi successivi hanno rilevato una diminuzione della malattia nella sua forma tipica, ma al contempo un incremento

delle forme atipiche, oltre ad un drastico aumento dei casi di insorgenza tardiva della malattia in bambini e adulti.

Anche in Italia, prima dell'introduzione dei test sierologici il tasso di prevalenza era valutato intorno ad 1:1000. Successivamente analizzando un campione di 17000 ragazzi sardi in età

scolare, il tasso registrato è stato invece di 1:184 evidenziando che i casi mal diagnosticati prima erano di circa un bambino ogni sette [24].

Negli ultimi anni l'introduzione di nuovi marcatori diagnostici di tipo sierologico, più specifici e più sensibili, quali gli anticorpi antigliadina (AGA) e, soprattutto, gli anticorpi antiendomio (EMA), ed anti-transglutaminasi tessutale (anti-tTG), con la possibilità di effettuare in modo più semplice la tipizzazione dell'HLA, ha permesso l'effettuazione di protocolli di screening della malattia sempre più accurati. I risultati di tali studi dimostrano che, ferme restando le differenze alimentari tra le diverse popolazioni che determinano l'ingestione di diversi quantitativi di glutine, la malattia è distribuita in modo piuttosto omogeneo nel mondo.

La prevalenza stimata a tutt'oggi per la malattia celiaca in Italia è di 1 caso su 180 [19], in Europa è compresa tra 1:130 ed 1:300 [26], mentre negli Stati Uniti è stimata intorno ad 1 caso ogni 250 persone [27].

Le cause del notevole aumento della prevalenza della malattia celiaca negli ultimi anni sono oggi da ricercare, quindi, su due versanti: da una parte nelle nuove abitudini alimentari come la diminuzione dell'allattamento al seno o l'aumento delle quantità di glutine ingerite durante il periodo dello svezzamento, e finanche quantità e qualità del glutine stesso, dall'altra nello sviluppo di test diagnostici sempre più sensibili e specifici [28]. I cambiamenti epidemiologici della malattia sono efficacemente sintetizzati da un modello ad iceberg originariamente proposto da Richard Logan nel 1992 [29].

In questo modello, la prevalenza globale della malattia dovrebbe essere rappresentata dalla grandezza totale dell'iceberg, la quale è a sua volta influenzata dalla frequenza dei soggetti predisposti geneticamente.

I casi diagnosticati con evidenza clinica di malattia celiaca rappresentano la parte "emersa", quindi visibile, dell'iceberg. Nella porzione "sommersa" dell'iceberg sono invece rappresentati i casi che sfuggono ancora alla corretta diagnosi, rappresentati in grandissima maggioranza da tutte le forme atipiche con cui la malattia può presentarsi [Figura 1].

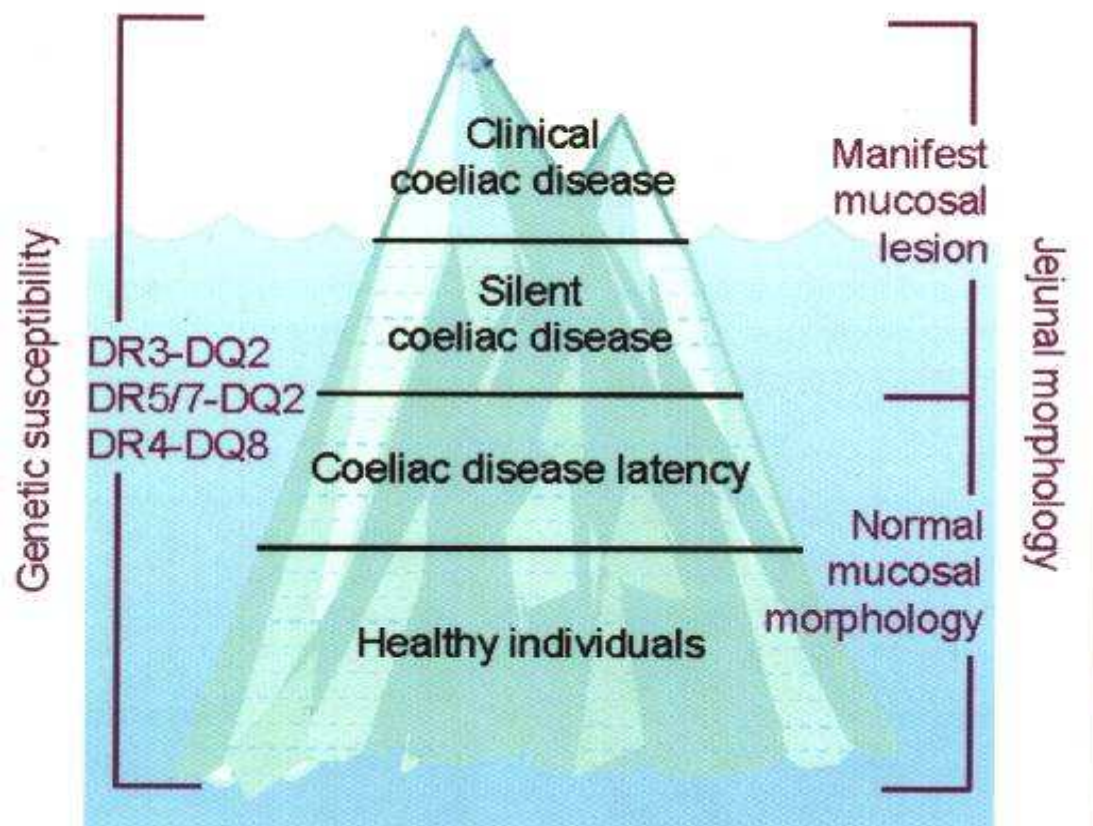


FIGURA 1—l'iceberg della malattia celiaca

La prevalenza globale della malattia è rappresentata dalle dimensioni totali dell'iceberg. Essa è influenzata dalla frequenza dei soggetti predisposti geneticamente (riportati a sinistra). I casi con evidenza clinica di malattia celiaca rappresentano la porzione visibile dell'iceberg. Nella porzione "sommersa" dell'iceberg sono invece rappresentati i casi che sfuggono ancora alla corretta diagnosi. A destra è riportata la morfologia mucosale nelle diverse situazioni. (Modificato da Logan, 1992).

1.3 DIAGNOSI DI MALATTIA CELIACA

I primi tentativi di porre una corretta diagnosi di malattia celiaca erano basati esclusivamente sul riscontro dei caratteristici segni e sintomi clinici. In quest'ottica è identificabile il tentativo di mettere a punto test diagnostici che fornissero una base più obiettiva possibile per effettuare una corretta diagnosi.

I primi test messi a punto erano basati sull'eliminazione dei grassi con le feci (steatorrea) e sulla valutazione dell'assorbimento intestinale e dell'eliminazione urinaria dello xilosio dopo ingestione di una dose nota di questo zucchero (xilosemia e xilosuria). Questi esami, utilizzati per anni ai fini della decisione di sottoporre il paziente con sospetta CD a biopsia duodenale, riflettono, però, solo la presenza di un eventuale malassorbimento degli alimenti da parte della mucosa intestinale lesa, ma non sono assolutamente specifici per la malattia celiaca.

Dopo i primi approcci al problema, nel 1977 ad Utrecht (Olanda) la Società Europea di Gastroenterologia e Nutrizione Pediatrica (E.S.P.G.H.A.N.) ha proceduto alla stesura del "protocollo diagnostico della malattia celiaca", che, per la prima volta ha stabilito in maniera univoca i criteri che permettono di porre una diagnosi di malattia celiaca: .

1. mucosa duodenale atrofica o subatrofica con dati clinici e di laboratorio suggestivi di malassorbimento intestinale;
2. miglioramento clinico ed istologico a dieta priva di glutine;
3. ricomparsa delle lesioni intestinali dopo la reintroduzione del glutine nella dieta

Questo protocollo ha costituito per quasi quindici anni il modello operativo al quale tutti i gastroenterologi pediatrici hanno fatto riferimento per giungere alla diagnosi. Come specificato, esso prevedeva l'esecuzione di una prima biopsia intestinale che doveva dimostrare il danno della mucosa intestinale, una seconda biopsia, dopo dieta senza glutine, per dimostrare la ricostituzione dei villi intestinali ed, infine, una terza biopsia dopo reintroduzione del glutine che riproponesse un quadro di atrofia della mucosa intestinale.

A distanza di 20 anni, il progredire della ricerca e delle conoscenze riguardanti la malattia celiaca ha permesso l'introduzione di esami sempre più sensibili e specifici che, oggi, permettono di sospettarla anche in soggetti completamente asintomatici. Questi esami permettono di ottenere una diagnosi in tempi brevi e di affrontare lo screening della

malattia in maniera sicuramente più precisa ed affidabile, oltre a permettere una notevole semplificazione delle procedure diagnostiche della malattia [30].

Oggigiorno, perciò, l'identificazione della malattia celiaca è basata sull'esecuzione, in prima istanza, di test sierologici di alta specificità e sensibilità. Il primo marcatore sierologico ad essere introdotto è costituito dagli anticorpi antigliadina (AGA) di isotipi IgA ed IgG, determinati con metodica immunoenzimatica ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).

Gli AGA IgG sono maggiormente sensibili, sono infatti positivi nel 92% dei soggetti celiaci non trattati, ma anche nel 22% dei soggetti affetti da altre patologie gastroenteriche. Al contrario, gli AGA IgA sono maggiormente specifici, sono infatti positivi nel 88% dei pazienti celiaci non trattati e nel 10% dei soggetti con altre patologie gastroenterologiche [31- 33]. Per quanto appena affermato, oggi gli AGA hanno perso gran parte del loro valore diagnostico nello screening di malattia celiaca, a causa dei bassi valori di sensibilità e specificità. Attualmente il loro uso è molto limitato nell'adulto e viene riservato in maniera quasi esclusiva allo screening di soggetti in età pediatrica [31-33]. Al giorno d'oggi, il test sierologico con la maggiore specificità (100%) è rappresentato dalla determinazione degli anticorpi antiendomizio (EMA), effettuata con la metodica dell'immunofluorescenza indiretta [31, 32, 34]. Gli EMA legano uno o più componenti endomiziali della muscolatura liscia e vengono identificati dal caratteristico pattern a nido d'ape di color verde mela che si distribuisce sulla muscolaris mucosae di un'opportuna sezione criostatica. Sono stati proposti vari substrati per la determinazione degli EMA, quali l'esofago di scimmia, il cordone ombelicale umano, il digiuno di scimmia ed il rene di ratto [35-38]. Gli ultimi due substrati sono utilizzati per la determinazione, rispettivamente, degli anticorpi antidigiuno (JAB) ed anti-reticulina (ARA), vecchi marcatori, oggi non più utilizzati in quanto ritenuti molto simili, se non identici, agli EMA. È invece certo che tanto l'esofago di scimmia che il cordone ombelicale umano possano funzionare da substrato per l'EMA, anche se il primo si rende preferibile per pulizia di immagine, chiarezza del messaggio alla lettura e per la possibilità di individuare altre componenti endomiziali che, una volta identificate, potrebbero rappresentare promettenti obiettivi di studio. Per la loro altissima specificità, gli EMA di isotipo IgA sono oggi universalmente accettati come test diagnostico nello screening della malattia

celiaca. Al contrario, secondo diversi autori il loro range di sensibilità è variabile tra il 74% ed il 100% [31, 32, 34, 39,42]

Al fine di aumentarne la sensibilità diagnostica, recentemente è stata dimostrata l'esistenza di una seconda classe di EMA, di isotipo IgG1, in una popolazione di soggetti con segni e sintomi di malattia celiaca negativi per gli EMA IgA, in maniera indipendente dalla presenza o meno di un deficit selettivo per le IgA [39,41]. La combinazione del dosaggio degli isotipi IgA ed IgG1 degli EMA permette di ottenere valori prossimi al 100% anche per quel che concerne la sensibilità [39,41]. In supporto ai marcatori sierologici già noti, recentemente la transglutaminasi tissutale (tTG) è stata identificata come il maggior autoantigene responsabile della produzione degli EMA, quindi la determinazione degli anticorpi anti-tTG è stata proposta come un nuovo utile strumento per lo screening sierologico di malattia celiaca. [43]. Gli anticorpi anti-tTG vengono determinati con una metodica immunoenzimatica tipo "ELISA" in micropiastra (Enzyme Linked Immunoassay Assorbent) e presentano elevati valori di sensibilità (95-98%), mentre in letteratura è riportata una specificità intorno al 94% [44-46]. In ogni caso, come detto, si tratta di esami di prima istanza, infatti per una corretta diagnosi è ancora indispensabile il prelievo biotico per l'esame istologico e morfometrico, che deve documentare l'atrofia dei villi accompagnata dall'iperplasia delle cripte (rapporto lunghezza dei villi/profondità delle cripte <3:1) a dieta contenente glutine, con ritorno alla normalità (rapporto villo/crypta =3:1) dopo dieta senza glutine. Per cercare di uniformare i criteri relativi all'indagine morfometrica nella diagnosi di malattia gli originali criteri di Marsh, che definivano il grado di atrofia dei villi e di iperplasia delle cripte insieme alle caratteristiche dell'infiltrato cellulare eventualmente presente, sono stati recentemente modificati da Oberhuber e collaboratori al fine di ottenere la classificazione morfometrica attualmente utilizzata [Tabella I] [47]. L'esame istologico e morfometrico utilizzato per la diagnosi della malattia presenta però degli ovvi limiti, infatti, problemi a livello di tecnica istologica e di osservatore potrebbero condurre ad interpretazioni erranee del dato, inoltre è da tenere in conto anche la casualità del punto in cui viene eseguito il prelievo biotico, che potrebbe avvenire in zone dell'intestino in cui la lesione non è evidente o è del tutto assente, come nei casi, rispettivamente di atrofia zonale (la cosiddetta "patchy atrophy" degli autori anglosassoni) e malattia celiaca latente.

<i>Descrizione</i>	<i>Significato</i>
CLASSE 0 (TIPO NORMALE) - Normale architettura mucosale - Normale numero di IEL (<40/100 EC)*	Mucosa intestinale normale.
CLASSE I (TIPO INFILTRATIVO) - Normale architettura dei villi - Normale profondità delle cripte - Aumentato numero di IEL (>40/100 EC)*	In pazienti celiaci a dieta priva di glutine indica l'introduzione di piccole quantità di glutine e/o che il paziente non è in piena remissione. Ricontrata anche in familiari di pazienti celiaci (definiti come celiaci potenziali). Non è diagnostica di malattia celiaca, ma indica che il paziente deve essere seguito nel tempo.
CLASSE II (TIPO IPERPLASTICO) - Normale architettura dei villi - Iperplasia delle cripte - Aumentato numero di IEL (>40/100 EC)*	Ricontrata raramente, principalmente in condizioni sperimentali ed in pazienti con dermatite erpetiforme. In pazienti a dieta priva di glutine indica spesso la presenza di lesioni "patchy" o che il paziente non ha ancora sviluppato la piena malattia.
CLASSE III (TIPO DISTRUTTIVO) - Iperplasia delle cripte - Aumentato numero di IEL (>40/100 EC)* - Atrofia dei villi: IIIa atrofia parziale IIIb atrofia subtotale IIIc atrofia totale (mucosa piatta)	È suddivisa in tre sottoclassi (IIIa, IIIb e IIIc), in base al grado di atrofia dei villi intestinali. Rappresenta la lesione diagnostica di malattia celiaca.
CLASSE IV (TIPO IPOPLASTICO) - Atrofia totale della mucosa (mucosa piatta) - Normale profondità delle cripte - Normale numero di IEL*	Di rarissimo riscontro, è stata osservata in bambini severamente emaciati, in cui indica un grave stato di malnutrizione. Potrebbe rappresentare una lesione "antica" o irreversibile di causa ignota.

TABELLA 1—:classificazione morfometrica di Marsh rivista da Oberhuber et al.

* IEL: linfociti intraepiteliali; EC: enterociti.

Per quanto detto, negli ultimi tempi all'esame istologico convenzionale è stata affiancata una nuova metodica di elevata specificità e sensibilità: l'esame colturale. Questo esame prevede la coltura, in un opportuno mezzo, del frammento biotico di mucosa intestinale in presenza ed in assenza di glutine al fine di valutare l'eventuale produzione degli EMA nei liquidi di coltura delle biopsie intestinali [48,50].

Si tratta di un test che sta assumendo un ruolo molto importante nella diagnosi della malattia celiaca soprattutto quando, sia per mancanza di dati clinici chiari, sia per mancanza di prelievi biotici adeguati per l'esame istologico, la diagnosi iniziale potrebbe rimanere dubbia. È proprio partendo dalla necessità di ricorrere spesso a challenge di gliadina nella dieta di celiaci con diagnosi dubbia che recenti studi di indagine diagnostica hanno posto particolare attenzione su altri siti mucosali del tratto gastrointestinale. In particolare, osservazioni su sezioni di mucosa rettale di pazienti celiaci, dopo stimolazione con gliadina, hanno rivelato un rapido aumento del volume della lamina propria ed un progressivo aumento di linfociti intraepiteliali [51].

Recenti lavori hanno, inoltre, studiato la risposta della mucosa orale dopo stimolazione locale in vivo al fine di potersene servire come elemento utile a fine di diagnosi [52-53]. Altri studi sono attualmente in corso, per cercare di ottenere una sempre maggiore conoscenza della malattia e, per estensione, dei metodi per diagnosticarla correttamente e nel modo meno invasivo possibile. I tempi sembrano oggi maturi per avvicinarci il più possibile a questo traguardo.

1.4 MODIFICAZIONI DELLA MUCOSA INTESTINALE NEI SOGGETTI CELIACI

La malattia celiaca non trattata è caratterizzata da una complessa lesione morfologica dell'intestino tenue caratterizzata da atrofia parziale o totale dei villi, aumento di profondità delle cripte del Lieberkühn, aumento dell'indice mitotico nelle cripte, aumento del numero dei linfociti intraepiteliali, infiltrazione di plasmacellule, linfociti e mast - cellule nella lamina propria ed anomalie dell'epitelio che perde il suo aspetto cilindrico apparendo cuboide ed irregolare [5, 10]

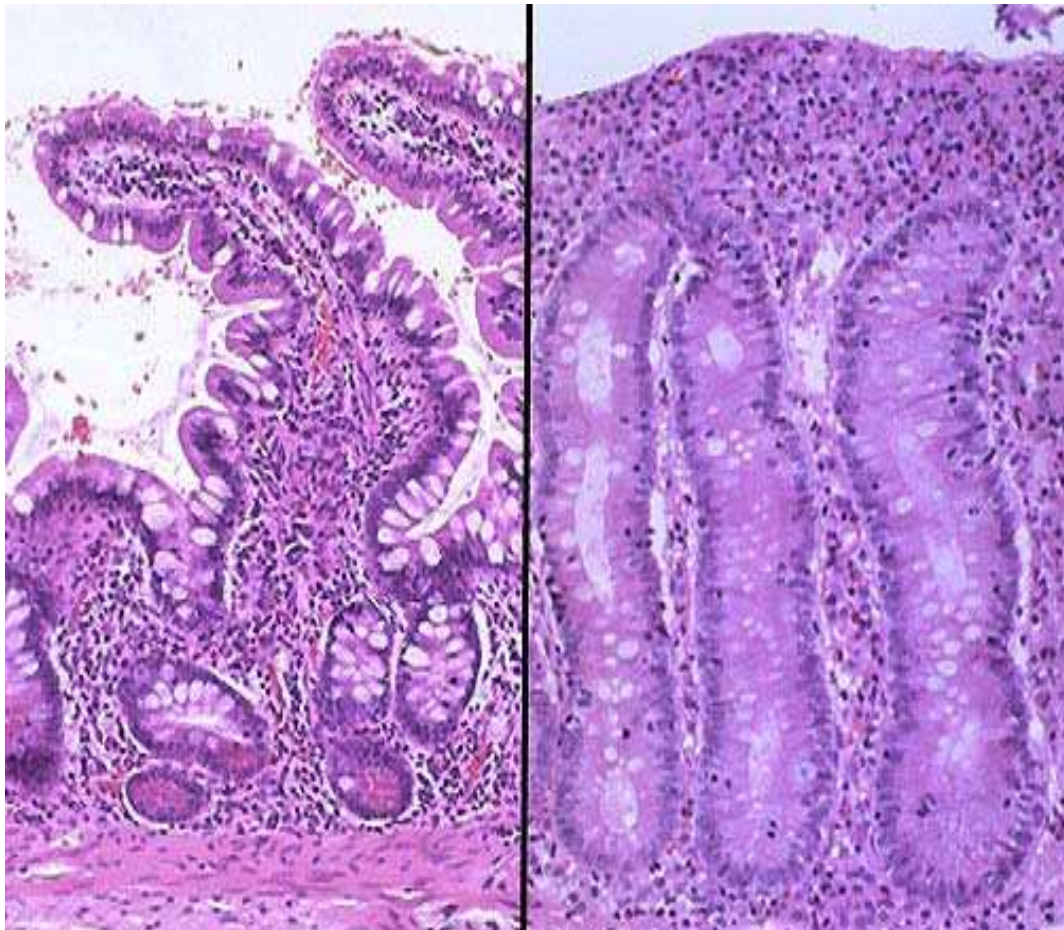


FIGURA 2—*modificazioni della mucosa intestinale nella malattia celiaca non trattata*
a) a sinistra è visibile la situazione normale, mentre b) a destra la tipica architettura mucosale della malattia celiaca non trattata.

[Figura2] 20 Il quadro descritto, tuttavia, difficilmente è riscontrabile in toto nella malattia celiaca, infatti, alterazioni anche minime rivelabili attraverso l'analisi immunoistochimica possono essere marcatori affidabili di enteropatia glutine-sensibile.

Tali alterazioni sono tipicamente rappresentate da un aumento degli IEL con ritorno a valori normali dopo esclusione del glutine dalla dieta, dall'incremento del numero di IEL con TCR α/β e/o da un aumento dell'espressione dei marcatori di attivazione immunitaria sulle cellule mononucleate nella lamina propria [5, 10, 60]. Proprio grazie ad accurati studi di queste alterazioni è stata molto ben caratterizzata una delle forme atipiche di malattia celiaca, la cosiddetta CD "latente" in cui la mucosa, pur apparendo normale da un punto di vista morfologico, mostra fenomeni di attivazione immunologica del tutto sovrapponibili a quelli osservati nei soggetti che presentano la classica lesione istologica, pur in presenza di positività per i marcatori sierologici della malattia stessa [60]. Questa presentazione della malattia può, però, anche essere un artefatto strumentale, correlabile alla piccola estensione della lesione ed alla casualità del prelievo biotico. In questi casi si parla di malattia celiaca con atrofia zonale o a placche (la cosiddetta "patchy atrophy").

1.5 GENETICA

L'interazione, ancora non del tutto chiarita, tra fattori genetici e fattori ambientali nella malattia celiaca la fa considerare chiaramente una malattia multifattoriale. Il coinvolgimento genetico nello sviluppo della patologia è stato evidenziato dall'alta prevalenza (10%) tra i familiari di primo grado dei pazienti celiaci e dall'alta concordanza (70-100%) della malattia nei gemelli monozigoti [61,62]. Tuttavia non sono noti tutti i numerosi geni che contribuiscono alla predisposizione ereditaria. Tra questi comunque il principale fattore genetico predisponente, identificato nel 1965, è il sistema HLA, un complesso di geni con la funzione primaria di riconoscere le molecole estranee all'organismo. Il sistema genico HLA è disposto nell'uomo sul cromosoma 6p21.3 ed occupa circa l'1% dell'intero genoma. La funzione di queste molecole è quella di presentare peptidi al recettore dei linfociti T: rispettivamente le molecole HLA di classe I ai linfociti CD8⁺ mentre quelle di classe II ai linfociti CD4⁺.

Il 90-95% dei celiaci presenta l'aplotipo HLA II DQ2 dato dagli alleli DQA1*0501 e DQB1*0201 in cis (DR3) o in trans (DR5/7) mentre il rimanente 5-10% presenta l'aplotipo DQ8 dato dagli alleli DQA1*0301 e DQB1*0302 soprattutto in cis (DR4) [63]. Questi due aplotipi sono considerati dei marcatori di predisposizione genetica dell'intolleranza. Hanno un valore predittivo positivo basso (infatti questi genotipi si riscontrano nel 20-30% di soggetti sani della popolazione generale ma solo lo 0,1% sviluppa la malattia) ma un valore predittivo negativo elevato [64].

La capacità di questi alleli nel conferire suscettibilità al glutine risiederebbe nella loro peculiare affinità nel legare amminoacidi carichi negativamente come quelli presenti nei peptidi gliadinici in seguito a deamidazione da parte della tTG [65]. La componente genetica potrebbe agire non solo inducendo un'immunità anomala ma anche influenzando la gravità degli effetti patologici.

Tuttavia l'avere questi aplotipi è una condizione necessaria ma non sufficiente per sviluppare la malattia. Infatti i gemelli monozigoti hanno una concordanza solo del 70-80% e quelli dizigoti di appena del 10-20% [66]. Quindi sono sicuramente coinvolti altri geni. A tal proposito sono stati compiuti analisi di *linkage* con marcatori genetici polimorfici sul genoma per trovare geni non HLA eventualmente associati alla CD ma i

risultati sono stati vari e contrastanti (*CD28*, *CTLA4*, *ICOS* sul cromosoma 2q33, geni sul cromosoma 5q31-33, geni sul cromosoma 19p13) [67,68].

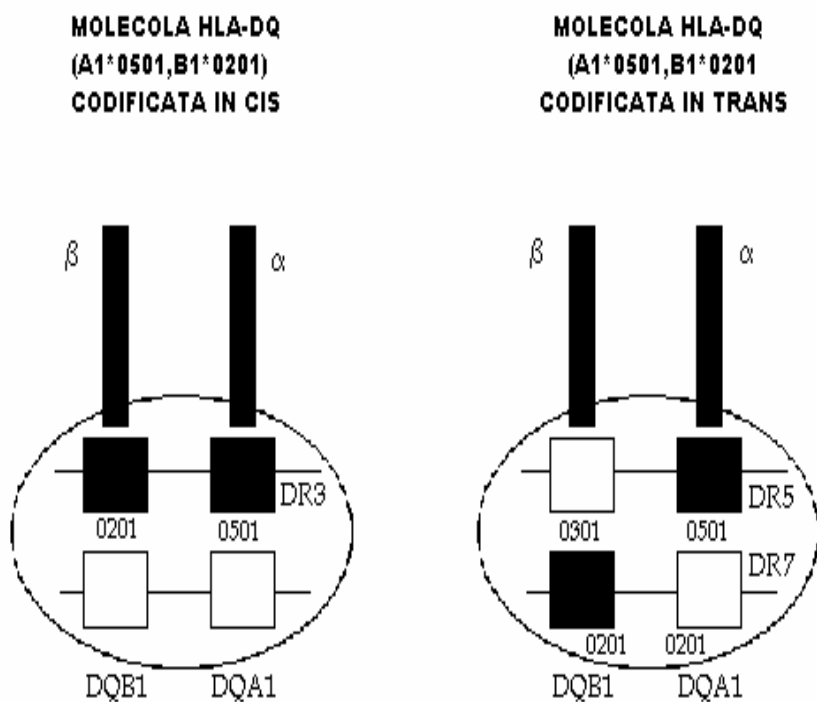


FIGURA 3– correlazione tra la malattia celiaca el'eterodimero *HLADQ* (α 1*0501, β 1*0201).

I pazienti celiaci omozigoti per HLA-DR3 o eterozigoti per HLA-DR5/DR7 possono esprimere la stessa molecola DQ.

I geni in questione si trovano in cis negli omozigoti DR3 ed in trans negli eterozigoti DR5/DR7.

1.5.1 GENI NON-HLA NELLA MALATTIA CELIACA

Recenti studi di screening genomico, in famiglie in cui più figli risultavano affetti da malattia celiaca, hanno evidenziato che anche altri geni, non appartenenti al sistema HLA, sono coinvolti nel conferimento della suscettibilità alla malattia stessa. L'analisi di linkage ha dimostrato che appaiono essere coinvolti geni localizzati su cromosomi differenti [69]. Il primo possibile candidato è stato individuato sul braccio corto del cromosoma 6, in posizione telomerica a 30 cM dai loci HLA [70]. Altre regioni geniche che sembrano avere un legame con la malattia celiaca, sono situate su cromosomi 7 (7q31), 11 (11p11), 15 (15q26) e 22 [Figura 3]

In ogni caso, va sottolineato che i risultati ottenuti in diversi studi sono contrastanti, per cui l'eventuale legame di queste regioni geniche con la malattia celiaca è ancora tutto da chiarire [69, 71, 72].

D'altro canto, altri lavori hanno riportato un'associazione della malattia con regioni geni che localizzate sul cromosoma 11 (11qter), questo fattore potrebbe consentire di discernere la presentazione clinica, sintomatica o silente, della malattia [73]. Inoltre, anche un locus ,recentemente individuato nella porzione terminale del cromosoma 5q, sembra essere coinvolto nelle differenti manifestazioni cliniche della malattia [71].

Nonostante l'elevato numero di studi condotti, ad oggi, il solo gene per cui sono stati effettuati in quantità studi di associazione con la malattia celiaca è certamente il gene che codifica per il CTLA-4 [74,75]. Questo gene mappa sul cromosoma 2 (2q33) e codifica per una molecola di superficie dei linfociti T in grado di legarsi al B7 espresso dalle cellule presentanti l'antigene e di sviluppare, come conseguenza, un segnale negativo per le cellule T in grado di mediare la loro stessa apoptosi. Tale sistema potrebbe contribuire al mantenimento della tolleranza nei confronti degli antigeni "self".

Il coinvolgimento di questa molecola nella malattia è stato ipotizzato sulla base di diversi lavori in vitro che hanno dimostrato la variazione del singolo nucleotide nel primo esone del gene, in cui la transizione dall'allele A all'allele G comporta il cambiamento di un amminoacido, da treonina ad alanina, nella molecola codificata. La probabilità che questa variazione allelica del gene partecipi al meccanismo della malattia, modificando l'espressione di membrana della stessa, è ritenuta bassa [74].

Studi di associazione condotti in diverse popolazioni hanno però riportato dati differenti; infatti l'allele A è risultato associato con la malattia celiaca solo in alcune popolazioni, mentre in altre l'associazione con la malattia è stata supportata dalla scoperta di un microsatellite D2S116 localizzato immediatamente vicino al gene del CTLA-4 [76, 77].

Lo studio dei polimorfismi genetici di alcune citochine ha rivelato una stretta associazione della malattia celiaca con un particolare alplotipo codificante per un fenotipo altamente secretorio nel locus del TNF- α [78].

1.6 RISPOSTA IMMUNITARIA

È ormai consolidato il concetto che la malattia celiaca sia immunologicamente mediata e possa essere definita come malattia autoimmune. Fattori chiari e qualificanti sono lo stretto legame col sistema HLA, la presenza nel siero di anticorpi antigliadina (AGA), antiendomisio (EMA), ed anti-transglutaminasi tessutale (antiTG) [5, 9, 10].

Gli EMA, autoanticorpi in quanto determinabili su sezioni di esofago umano [79], sono diretti verso un autoantigene, la transglutaminasi tessutale [43], anche se altri studi hanno dimostrato che quest'ultima potrebbe non essere l'unico autoantigene responsabile della produzione degli EMA [46, 80].

La malattia celiaca è quindi caratterizzata da una potente risposta immune sia cellulo-mediata che umorale, scatenata dall'introduzione per via alimentare della gliadina. La risposta immunitaria inizia quando le cellule presentanti l'antigene (APC) riconoscono l'antigene primario (peptidi della gliadina), lo processano e lo presentano ai linfociti T CD4+, in associazione a molecole MHC di classe II. Questo processo avviene all'interno dei grandi aggregati di tessuto linfoide associato all'intestino (GALT) e nei linfonodi mesenterici che si trovano sparsi nel tratto gastrointestinale. I linfociti T CD4+ attivati migrano nella lamina propria attraverso i vasi sanguigni, pronti al contatto con l'antigene.

I linfociti T CD4+ si dividono in due sottopopolazioni distinte, Th1 e Th2. I linfociti Th1 indirizzano la risposta immunitaria attraverso il rilascio di citochine quali γ -interferone (IFN) ed interleuchina 2 (IL-2) che stimolano la proliferazione ed il differenziamento dei linfociti T citotossici (CTL). I linfociti appartenenti alla sottopopolazione Th2, invece, indirizzano la risposta immunitaria in senso umorale, secernendo fattori quali interleuchina 4 (IL-4), interleuchina 5 (IL-5) ed interleuchina 10 (IL-10) che inducono la proliferazione e la differenziazione dei linfociti B. In ogni caso, entrambi i tipi cellulari sembrano derivare da un precursori comuni a profilo citochinico intermedio: i linfociti Th0.

Recenti lavori hanno indicato che i principali imputati nella produzione delle lesioni istologiche, caratteristiche della malattia celiaca, sono le cellule T CD4+ a profilo Th1, anche se il meccanismo che porterebbe alla polarizzazione delle cellule T in senso Th1 rimane ancora poco chiaro. Infatti, paradossalmente, la principale citochina coinvolta nella polarizzazione in senso Th1, l'interleuchina 12 (IL-12) non è riscontrabile nella mucosa intestinale dei soggetti celiaci [81, 82]. Sembra che questa funzione inducente le cellule T

verso Th1 sia svolta da altre citochine quali α -IFN ed IL-18 [83]. Come la gliadina scateni tale sequenza di eventi non è ancora del tutto noto. In condizioni fisiologiche normali, le giunzioni serrate (“tight junction”) dell’epitelio intestinale rappresentano una barriera selettiva per il passaggio di macromolecole come la gliadina. Il suo trasporto, così come quello del 90% delle proteine, è di tipo transcellulare, in cui l’azione litica dei lisosomi sui peptidi gliadinici, li rende più piccoli e, conseguentemente, non immunogenici.

Nella mucosa intestinale dei pazienti in fase attiva di malattia celiaca, invece, il trasporto dei peptidi gliadinici sembra avvenire attraverso una via paracellulare, per cui i peptidi stessi, non venendo in contatto con i lisosomi, passerebbero come tali, mantenendo quindi le loro proprietà immunogeniche, nella lamina propria [84]. Il cambiamento della via di trasporto sembra essere una conseguenza dell’aumento di permeabilità intestinale, causata dall’alterata integrità delle giunzioni serrate [85].

Diversi lavori hanno indagato i motivi dell’alterata integrità giunzionale della mucosa in fase attiva di malattia celiaca, ma ancora non è stato possibile chiarire tutti i dubbi relativi a questo fenomeno.

Alcuni autori suggeriscono, a tale proposito, che le citochine rilasciate nella mucosa in fase acuta di malattia, ovvero il fattore di necrosi tumorale- α (TNF- α), il fattore di crescita trasformante- β (TGF- β), il γ -IFN e le interleuchine IL-1 ed IL-2, possano ridurre i livelli di trascrizione dell’E-caderina, allentando così le giunzioni [84]. L’azione di queste citochine è stata studiata su un modello in vitro di cellule tumorali derivate da colon umano (CaCO2), confermando il loro possibile ruolo nel processo di alterazione della permeabilità intestinale [84]. Un ulteriore studio effettuato su biopsie intestinali di pazienti celiaci, al fine di valutare l’espressione della zonulina, una proteina normalmente espressa dagli enterociti ed implicata nella modulazione endogena delle giunzioni serrate, ha dimostrato un suo interessamento nella patogenesi della malattia celiaca.

Sembra che la zonulina interagendo con uno specifico recettore di superficie intestinale, riesca ad alterare la polimerizzazione dei microfilamenti di Actina, regolando così la via paracellulare [86]. Sebbene gli studi menzionati documentino il ruolo centrale svolto dall’alterazione della barriera intestinale nella patogenesi, non è da escludere che accanto a questa causa ci possa essere anche un’alterazione del meccanismo di induzione della tolleranza orale nei confronti della gliadina. L’induzione della tolleranza orale in seguito all’ingestione di cibo, un sistema di “down regulation” antigene-specifico delle risposte

immuni potenzialmente dannose, forma una parte integrante della capacità immunoregolatoria del GALT, di conseguenza è possibile ipotizzare che la reazione nei confronti della gliadina nei soggetti celiaci, possa essere dovuta ad una mancata induzione della tolleranza da parte delle cellule T regolatorie, presenti nelle placche di Peyer, o ad una mancata delezione clonale delle cellule T specifiche per la gliadina negli organi linfoidi secondari dopo esposizione alla gliadina [87].

1.6.1 RISPOSTA IMMUNITARIA CELLULO-MEDIATA

È noto che la risposta immunitaria cellulo-mediata, indirizzata dai linfociti CD4⁺ Th1, gioca un ruolo centrale nella genesi della lesione tessutale a livello della mucosa intestinale. Ciò è confermato dall'infiltrazione della mucosa intestinale da parte di linfociti T CD4⁺ e dalla presenza di cloni di cellule T che riconoscono specificamente la gliadina e i peptidi da essa derivati ristretti per HLA-DQ($\alpha 1^*0501$, $\beta 1^*0201$). Il profilo citochinico di queste cellule riflette quello tipico dei linfociti Th0 e Th1 [88].

Ulteriore evidenza a conferma viene fornita dalla presenza di cellule immunitarie attivate nel sangue periferico dei pazienti celiaci, con prevalenza di cellule T di memoria, che esprimono il CD45RO, così come quella del recettore per l'interleuchina 2 (IL-2R) solubile [89]. I primi studi sembravano dimostrare che, tra le citochine prodotte, un ruolo importante nelle modificazioni istologiche in senso degenerativo a carico della mucosa intestinale fosse rivestito dal γ -interferone, ciò venne confermato dalla dimostrazione che queste modificazioni potevano essere bloccate in vitro utilizzando anticorpi anti γ -IFN [90]. Ad oggi, il quadro sembra essere diverso, infatti, è stato recentemente dimostrato che, in vitro, le cellule T a profilo Th1 gliadina-specifiche rilascino fattore di necrosi tumorale che determinerebbe, a sua volta, la secrezione di metalloproteinasi di matrice (MMPs) da parte dei fibroblasti intestinali. Le metalloproteinasi di matrice così rilasciate causerebbero la dissoluzione del tessuto connettivo [91, 92]. [Figura 4].

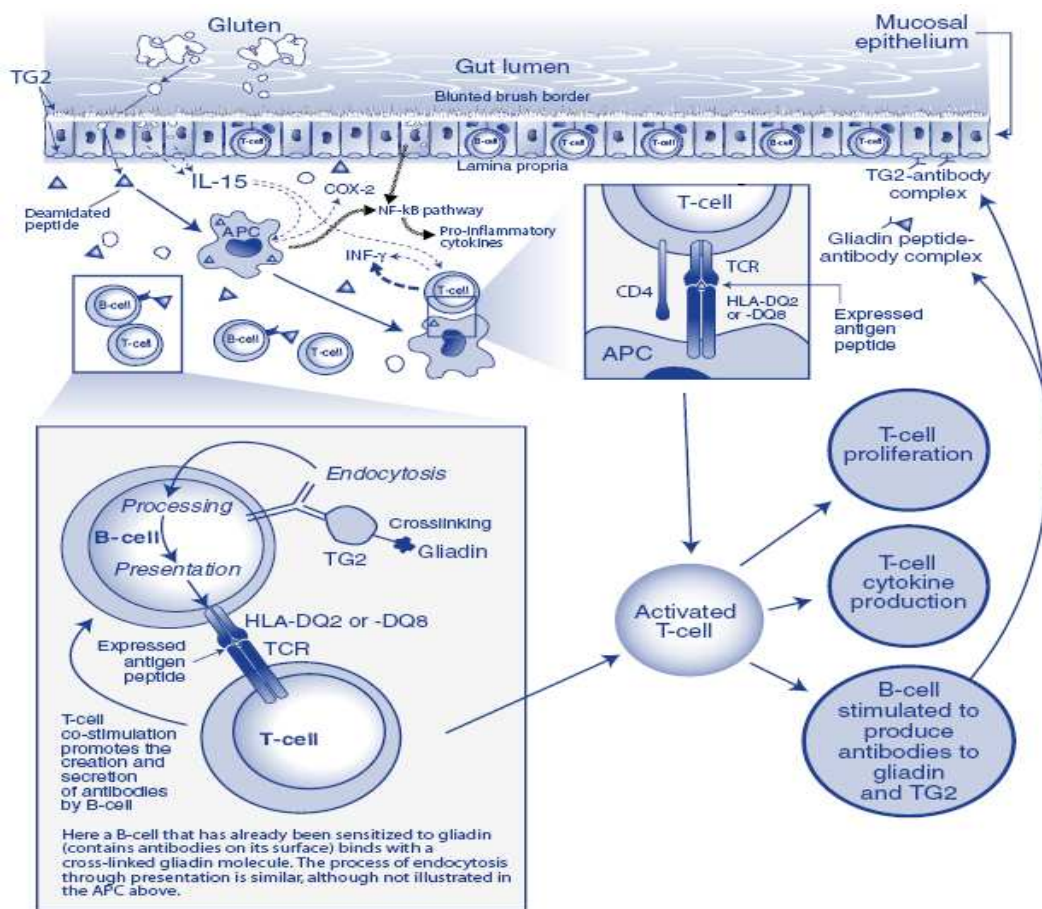


FIGURA 4– la gliadina come fattore scatenante della produzione di anticorpi e del rimodellamento mucosale

Le cellule T attivate dal glutine stimolano altre cellule immunitarie promuovendo le loro rispettive attività: le cellule B a creare anticorpi contro l'antigene, le cellule APCs a distruggere l'antigene. Quando l'anticorpo lega l'antigene formano un complesso che viene neutralizzato dal sistema del complemento e/o tramite fagocitosi. Tutte le cellule secernono citochine che fungono da comunicatori immunoendocrini a corto e lungo raggio. L' $IFN\gamma$, la principale citochina prodotta, attiva altri linfociti T e promuove il potere distruttivo dei macrofagi

Un'altra molecola, fondamentale in questo processo, espressa sul linfocita T è il CTLA-4, costitutivamente espressa a bassi livelli, ed indotta durante il processo di attivazione.

Il CTLA-4 ha una elevatissima affinità per il B7 ed è pertanto in grado di competere con il CD28. Quando una cellula T è attivata a causa del riconoscimento dell'antigene da parte del TCR e la contemporanea interazione del segnale costimolatorio, l'espressione del CTLA-4 è indotta sulla cellula T ed, a causa della sua elevatissima affinità per le molecole

B7, il CTLA-4 stesso compete progressivamente con il CD28 ed, in ultima analisi, controlla il processo di attivazione T cellulare. A conferma di quanto detto, è stato recentemente dimostrato che l'uso di CTLA-4 solubile (CTLA-4 Ig) rappresenta, in vitro, l'approccio più conveniente per controllare una attivazione T cellulare indesiderata. Lo studio in questione ha evidenziato che l'uso del CTLA-4 Ig solubile può indurre una condizione di tolleranza della cellula T e potrebbe essere in grado di prevenire e controllare lo sviluppo di patologie autoimmuni [93]. Anche nella malattia celiaca il CTLA-4 riveste un ruolo molto importante. Il modello di coltura in vitro descritto prima è utilizzato per controllare, nella mucosa intestinale dei pazienti celiaci in remissione, l'abnorme ed indesiderata risposta immunologica T linfocitaria indotta dal challenge con gliadina [93]. La coltura d'organo è stata utilizzata come sistema in vitro per lo studio dei meccanismi immunologici e patogenetici alla base della malattia celiaca. In questi esperimenti, i frammenti biotici di pazienti celiaci in remissione, a dieta priva di glutine, sono stati coltivati in presenza di digesto peptico-triptico (PT) di gliadina a tempi di incubazione diversi. Non è stato ancora del tutto chiarito come l'antigene primario, la gliadina, scateni la serie di eventi che portano alle tipiche lesioni della mucosa. Dopo due ore di incubazione con la gliadina, si osserva, a livello della lamina propria, un aumento del numero delle cellule mononucleate (linfociti e macrofagi) che esprimono ICAM-1 e CD25 (recettore per l'IL-2), distinti in linfociti T (marcati con anticorpi anti-CD3) ed in macrofagi (marcati con anticorpi anti-CD68). Tra le 4 e le 12 ore d'incubazione si osserva, invece, la migrazione di tali cellule dalla lamina propria verso lo strato epiteliale. Il fenotipo delle cellule T migranti è CD4⁺/CD25⁺, mentre la distribuzione dei linfociti T CD8⁺ rimane inalterata nei vari strati della mucosa. Inoltre, le cellule CD68⁺ (monociti e macrofagi) iniziano ad esprimere sulla loro superficie sia l'antigene B7 che le molecole MHC di classe II DQ2. Dopo 24 ore di coltura, si osserva un'ulteriore migrazione di linfociti T e di macrofagi all'interno del compartimento sub epiteliale. A livello epiteliale si evidenzia sugli enterociti delle cripte un'aumentata espressione delle molecole HLA-DR e del recettore per la transferrina (TFR). Infine, si osserva un'infiltrazione dell'epitelio a livello sia dei villi che delle cripte, da parte dei linfociti T con fenotipo CD8⁺/CD25⁻ [94]. Sebbene da un punto di vista strettamente immunologico questo modello in vitro rappresenta una situazione di richiamo della risposta, e non esamina l'evento primario che

induce la sensibilizzazione verso la gliadina, quest'ultimo resta, comunque, estremamente valido per studiare la dinamica immunologica della risposta all'antigene stesso.

Oltre quanto detto finora, è necessario tenere presente che la lesione mucosale, tipica della malattia, potrebbe essere anche dovuta a meccanismi diversi dalla semplice attivazione delle cellule T mucosali.

È stato, infatti, recentemente riportato che il danno morfologico potrebbe essere dovuto ad un'inappropriata apoptosi degli enterociti [95].

Le molecole coinvolte in questi fenomeni sono state identificate come membri della famiglia dei recettori del TNF (TNFR) e denominate Fas o CD95 e Fas Ligando (FasL o CD95L).

Studi recenti hanno riportato, infatti, che nella maggior parte degli enterociti dei soggetti celiaci con atrofia dei villi è possibile rilevare un'elevata frammentazione del DNA, evento centrale del fenomeno apoptotico, e che questo pattern reverte verso i valori normali dopo l'eliminazione del glutine dalla dieta e la conseguente restaurazione dello "status quo" mucosale [96].

Ulteriore conferma sperimentale a questa ipotesi viene da un recente studio in vitro, in cui è stata osservata l'interazione fra il recettore Fas espresso dagli enterociti (cellule bersaglio) dei pazienti celiaci ed il suo ligando, FasL, espresso dalle cellule mononucleate della lamina propria (effettori). Secondo questi autori, tale interazione porterebbe alla morte degli enterociti e determinerebbe la conseguente lesione tissutale [97].

In questo fenomeno, è stato riportato anche il coinvolgimento di un'ulteriore citochina, l'interleuchina 15 (IL-15), rilasciata principalmente dai macrofagi che, come verrà spiegato successivamente, sembra giocare un ruolo molto importante nella patogenesi della malattia.

La IL-15 è capace di indurre l'espressione di Fas sugli enterociti. È stato dimostrato che la stimolazione in vitro di frammenti di mucosa intestinale di pazienti celiaci in remissione in presenza di IL-15, è in grado di riprodurre i risultati che si hanno quando la mucosa è stimolata in presenza di gliadina [98].

Tutte le considerazioni finora effettuate, che rappresentano una fase preliminare nello studio dei meccanismi che portano all'atrofia della mucosa intestinale, sembrano tuttavia inficiare l'attuale concetto "dogmatico" che i meccanismi immunopatogenetici della malattia celiaca siano centrati sul ruolo cruciale dei linfociti T.

Seppure l'attivazione dei linfociti T gliadina ristretti assolve un fondamentale ruolo chiave nella malattia celiaca, non è ancora del tutto chiaro del perché soltanto una piccola porzione di individui HLA-DQ2 e HLA-DQ8 positivi sviluppino un'attivazione delle cellule T gliadina ristrette ed il conseguente innesco del meccanismo immunopatogenetico.

Recenti studi in vitro hanno evidenziato la capacità dei frammenti di gliadina di indurre una risposta immunitaria innata nella mucosa intestinale dei soggetti celiaci.

Sembra che questa risposta innata sia la prima risposta immunitaria ad intervenire nei confronti della gliadina così come avviene normalmente in risposta a stimoli quali LPS (lipopolisaccaridi batterici), proteine virali e DNA batterico.

La risposta innata è particolarmente importante a livello della superficie mucosale, in quanto rappresenta la prima linea di difesa contro gli antigeni patogeni esterni.

Nei soggetti celiaci sembra che le cellule epiteliali e le cellule della lamina propria con capacità fagocitaria siano caratterizzate dalla presenza, sulle loro superfici, di specifici recettori definiti "pattern recognition receptors", i quali, dopo aver riconosciuto e legato i peptidi gliadinici, innescano il rilascio di citochine e chemochine proinfiammatorie, quale, ad esempio, IL-15.

Il rilascio di IL-15, come emerge da questi studi, attiverebbe le cellule presentanti l'antigene MHC-ristrette per i frammenti di glutine deamidati dalla transglutaminasi tessutale ed innescerebbe la risposta immunitaria adattativa precedentemente descritta. Da questi lavori emerge che le due branche della risposta immunitaria, l'innata e l'adattativa, seppure con differenti funzioni, partecipano nella patogenesi della malattia celiaca. L'importanza di queste nuove ricerche è data, inoltre, dalla scoperta che all'interno delle sequenze proteiche dei frammenti della gliadina si possono distinguere due diversi epitopi: non-immunodominante ed immunodominante, capaci uno di attivare la risposta immunitaria innata e l'altro quella adattativa [91].

Questa particolare ed inaspettata risposta innata al glutine potrebbe spiegare il perché soltanto una parte degli individui HLA-DQ2 e HLA-DQ8, positivi presenti nella popolazione generale sviluppano la malattia celiaca.

Forse in aggiunta ai geni già noti coinvolti nella patogenesi, potrebbero essercene altri, ad oggi ignoti, che predisporrebbero verso questa risposta innata. [Figura 5].

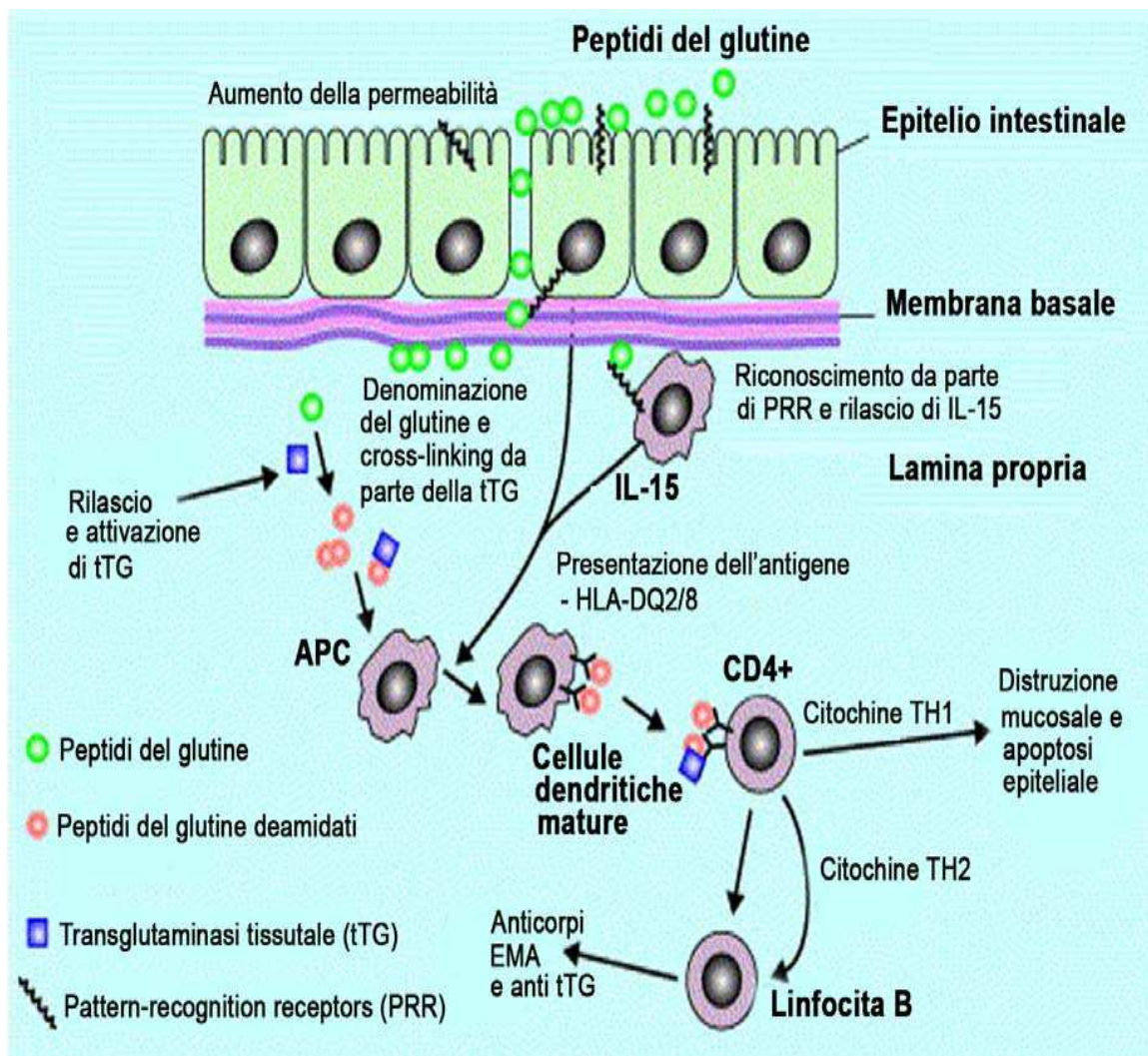


FIGURA 5—risposte innata e adattative nella malattia

Formazione degli antigeni gliadinici dopo deamidazione da parte della tTG.

Le cellule presentanti l'antigene (APC) HLA-DQ2 o -DQ8 attivano le risposte delle cellule T del sistema adattativo (infiammazione e degenerazione del tessuto-Th1- o produzione di anticorpi -Th2-). Le cellule del sistema innato riconoscono i peptidi del glutine direttamente attraverso i recettori di ricognizione (pattern recognition receptors, PRR) e rilasciano IL-15 che modula la risposta adattativa.

Le cellule dendritiche ed i linfociti T migrano verso i linfonodi mesenterici (dove avviene la loro espansione clonale) e successivamente ritornano alla lamina propria. (Modificato da Maiuri et al., 2003).

1.6.2 RISPOSTA IMMUNITARIA UMORALE

La risposta umorale inizia quando i linfociti B quiescenti, presenti nella lamina propria, vengono in contatto con l'antigene grazie alle loro immunoglobuline di membrana a funzione Come precedentemente detto, le cellule T implicate nello sviluppo della risposta immunitaria di tipo umorale, sono le cellule Th2. Il contatto fra linfocita B e linfocita T avviene in seguito alla riesposizione dell'antigene processato in associazione a molecole MHC di classe II da parte della cellula B ed è mediato da altre molecole, sia di adesione, quali LFA1 ed LFA3 presenti sulla cellula B che si legano con ICAM-1 ed il CD2 presente, invece, sulla cellula T, che di costimolazione, quali B7/BB1 presente sulla cellula B che si lega al CD28 espresso sulla cellula T. In seguito a questo contatto, il linfocita T rilascia diverse citochine (IL-4, IL-5, IL-10) che favoriscono l'ulteriore sviluppo delle cellule B ed influenzano la commutazione di classe immunoglobulinica. Nei pazienti celiaci è stata rilevata una abnorme espressione sia di IL-10 che di TGF- β , che insieme cooperano al fine di incrementare la secrezione di anticorpi di isotipo IgA da parte delle cellule B attivate [91]. In ogni caso, per lo sviluppo, l'espansione clonale e la commutazione di classe, è necessario il legame tra il recettore CD40 espresso sulle cellule B ed il suo ligando (CD40L) che viene espresso esclusivamente sui linfociti T CD4+ attivati. L'interazione tra CD40 e CD40L è indispensabile per la corretta trasduzione dei segnali che portano all'attivazione delle cellule B ed alla sintesi anticorpale. È noto che la gliadina induce un'attivazione del sistema immunitario nei soggetti affetti da malattia celiaca, ciò è supportato dall'esistenza di cloni di cellule T ristrette per la gliadina nella mucosa intestinale di pazienti celiaci e dalla produzione di anticorpi antigliadina (AGA)[5, 88]. Non è, però, ancora completamente chiaro il legame tra la gliadina e la sintesi di anticorpi antiendomisio (EMA), i marcatori di più alta specificità e sensibilità di malattia celiaca. Non ci sono evidenze che supportano una cross-reattività o un mimetismo molecolare fra la gliadina e l'autoantigene responsabile della produzione degli EMA, di contro, diverse altre evidenze lasciano pensare che la gliadina possa essere implicata nello smascheramento di antigeni "self" [48, 100, 101]. La gliadina, pertanto, non costituirebbe di fatto l'antigene della malattia celiaca, ma rappresenterebbe solo una sorta di "avvio" che renderebbe disponibili per il riconoscimento immunologico epitopi criptici normalmente nascosti al sistema immunitario.

2 CELIACHIA E AUTOIMMUNITA'

Nei soggetti celiaci si è osservata un'aumentata prevalenza di malattie autoimmuni, così come di CD tra i soggetti con malattie autoimmuni (come per esempio le tireopatie autoimmuni il diabete di tipo primo e la cardiomiopatia dilatativa).[102,103]

La CD silente si manifesta con elevata frequenza anche nei parenti di primo grado dei soggetti con malattie autoimmuni. D'altra parte, è emerso che la prevalenza di questa manifestazione della malattia celiaca è più alta nei familiari che soffrono di malattie autoimmuni (24%) rispetto ai familiari sani di celiaco (3,9%).[104]

L'associazione tra malattia celiaca e patologie autoimmuni potrebbe, in alcuni casi, essere legata alla condivisione di alcuni fattori genetici predisponenti, in modo particolare antigeni facenti parte del sistema HLA.

D'altra parte la comparsa di manifestazioni autoimmuni potrebbe dipendere dalla durata dell'esposizione al glutine in soggetti geneticamente predisposti. Una dimostrazione a questo proposito ci viene data da uno studio realizzato su 1000 celiaci di pari età, diagnosticati in tempi differenti per la MC. La prevalenza delle malattie autoimmuni aumentava in maniera direttamente proporzionale alla durata del periodo di esposizione al glutine[105] e il rischio di queste complicanze aumentava di 1,1% per anno di dieta libera [Figura 6]

In altre parole, tanto più è tardiva la diagnosi di CD tanto maggiore è il rischio di incorrere in patologie di tipo autoimmune. La relazione tra autoimmunità e glutine emerge anche da studi che valutano la presenza di autoanticorpi organo specifici, diversi dagli EMA in soggetti celiaci. Tali autoanticorpi, per esempio anti-pancreas (ICA,GAD), antitiroide (TG,TPO), non solo sono presenti con diversa frequenza nei soggetti celiaci, ma hanno una loro correlazione con l'assunzione di glutine. In uno studio su 90 bambini celiaci, 11 presentavano autoanticorpi correlati al diabete (ICA e/o GAD e/o IAA) alla diagnosi, e il titolo anticorpale si normalizzava dopo un tempo variabile di dieta senza glutine[106]

Ancora una volta, quest'osservazione avvalora l'ipotesi che la malattia celiaca nella sua forma silente tardivamente riconosciuta e non trattata esponga questi soggetti ad un alto rischio di sviluppare malattie autoimmuni.

Nel loro insieme questi dati possono avere un riscontro pratico, legato alla possibilità di organizzare degli screening di popolazione per identificare i soggetti con malattia celiaca

non ancora espressa clinicamente, con l'obiettivo di prevenire lo sviluppo di complicanze glutine dipendenti.

La presenza di anticorpi cuore specifici in molti pazienti con cardiomiopatia dilatativa idiopatica ha suggerito una possibile patogenesi di tipo autoimmune di questa malattia per lo meno in un sottogruppo di soggetti.

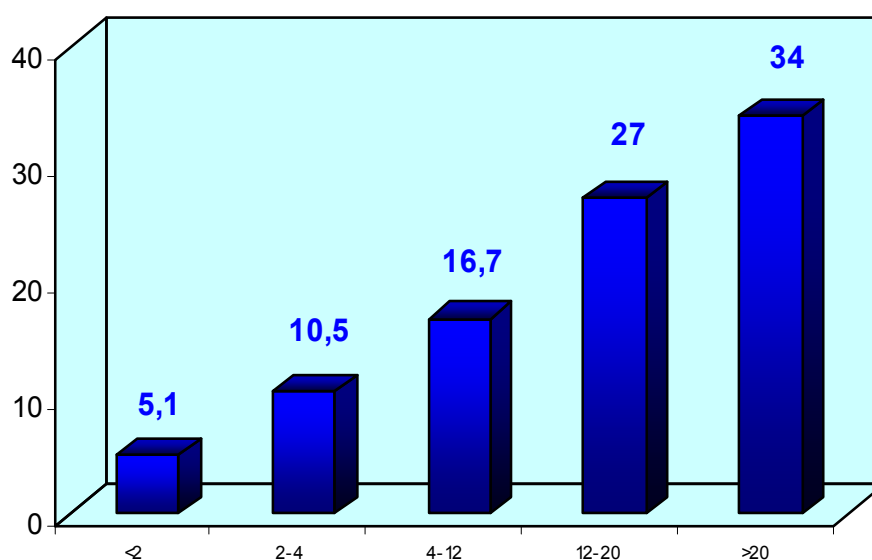


FIGURA 6— *Prevalenza (%) delle malattie autoimmuni in relazione all'età della diagnosi di celiachia*

2.1 LA CARDIOMIOPATIA DILATATIVA IDIOPATICA

La Cardiomiopatia Dilatativa Idiopatica (CMPD) è una malattia cronica del miocardio di causa sconosciuta, caratterizzata da una ridotta funzione contrattile del ventricolo sinistro o di entrambi i ventricoli, generalmente associata a dilatazione delle camere cardiache.

Si tratta della più frequente patologia del miocardio, dalla letteratura emerge che la sua incidenza tra lo 0,73 per 100000 all'anno e 6,95 per 100000 all'anno. e la sua prevalenza tra 8,3 soggetti per 100000 soggetti e 36,5 per 100000 [107].

La sua eziopatogenesi è per lo più sconosciuta. Probabilmente si tratta di una condizione a patogenesi eterogenea; tuttavia in un sottoinsieme di soggetti la cardiomiopatia dilatativa potrebbe rappresentare una malattia autoimmune organo specifica. [108] in cui il processo distruttivo è ristretto all'organo bersaglio e gli autoanticorpi riconoscono e reagiscono con lo specifico antigene [109,110]

Un altro elemento caratterizzante la cardiomiopatia dilatativa è, come in altre patologie autoimmuni, la predisposizione genetica che giustifica l'elevata prevalenza di patologia autoimmune tra i componenti di uno stesso gruppo familiare. Spesso c'è l'associazione con specifici alleli HLA di classe seconda, che predispongono alla malattia o al contrario conferiscono una protezione nei confronti di questa. Alcuni pazienti presentano inoltre l'espressione anomala di HLA di classe seconda sull'endotelio cardiaco, alterato rapporto tra linfociti T Helper e Citotossici, livelli aumentati di citochine circolanti, presenza di autoanticorpi cuore specifici in circolo in pazienti con cardiomiopatia dilatativa e nei loro familiari [111]

E' stata osservata una correlazione con i geni del complesso HLA e la presenza in circolo di anticorpi contro il recettore $\beta 1$ del sistema adrenergico, l'HLA DR 4 era sei volte maggiore nei soggetti che presentavano questo tipo di autoanticorpi rispetto a quelli che non li possedevano [112]. In pazienti con cardiomiopatia dilatativa oltre alla positività agli autoanticorpi contro il recettore $\beta 1$ è stata descritta l'associazione con l'HLA DQA1/QB1 [113,114]. D'altra parte il fenotipo DR3 era assente, in questi pazienti suggerendo che questo fenotipo potesse conferire protezione contro lo sviluppo di questi autoanticorpi.

Associazioni tra HLA DQ e altri autoanticorpi sono riportate in altre malattie autoimmuni e potrebbero identificare un sottogruppo di pazienti in cui le manifestazioni cliniche sono controllate da determinanti HLA DR o DQ. [112].

Il contributo dei geni del complesso HLA all'eziopatogenesi della malattia è, comunque di modesta importanza(rischio relativo dell'ordine di circa 2-2,5) Questo indica che il complesso HLA è solo uno dei molti geni coinvolti nella patologia della cardiomiopatia dilatativa o che il suo sia di maggiore importanza solo in un piccolo gruppo di pazienti con questa patologia [112]

Gli antigeni identificati, che reagiscono con le immunoglobuline specifiche presenti nel siero, sono proteine di trasporto o enzimi della cresta mitocondriale e altre proteine quali la miosina, la tropomiosina e la heat shock protein (HSP) e in particolare l'Actina[115]

Inoltre dalla letteratura si evince che la frequenza di autoanticorpi specifici del cuore è più elevata nelle forme famigliari rispetto alle forme non famigliari [116]I parenti di primo grado asintomatici dei malati, positivi agli autoanticorpi presentano più frequentemente disfunzione e dilatazione del ventricolo sinistro e generalmente si tratta di soggetti più giovani rispetto ai famigliari che non presentano autoanticorpi. Questo suggerisce che gli autoanticorpi potrebbero essere presenti nelle fasi iniziali della malattia ed avere un elevato valore predittivo positivo sullo sviluppo della cardiomiopatia. [117]

La presenza di anticorpi cuore specifici in molti pazienti con Cardiomiopatia Dilatativa Idiopatica ha suggerito una possibile patogenesi di tipo autoimmune di questa malattia per lo meno in un sottogruppo di soggetti. Inoltre tale patologia risponde ad alcuni criteri che ne giustificano la sua origine autoimmune, quali la riproduzione della malattia in un modello animale(topi immunizzati con l'isoforma β della miosina) anomala espressione di molecole HLA di classe seconda a livello cardiaco e la predisposizione genetica.

Nei soggetti celiaci d'altraparte, la prevalenza di malattie autoimmuni è aumentata e nei pazienti con malattie autoimmuni(per esempio nei soggetti con diabete di primo grado, tiroidine autoimmuni, artrite reumatoide) c'è una maggior prevalenza di malattia celiaca

Queste osservazioni hanno suggerito che ci potrebbe essere un' associazione tra la malattia celiaca e cardiomiopatia.

Recentemente Curione e collaboratori hanno effettuato uno studio su 52 pazienti con cardiomiopatia dilatativa idiopatica (38 maschi e 15 femmine con età media di 47anni)per valutare la prevalenza della malattia celiaca silente. In tutti i pazienti si cercò la presenza di anticorpi anti Endomisio e ai pazienti risultati positivi agli EMA venne eseguita la biopsia intestinale .Dei 52 soggetti studiati ,3 risultarono EMA positivi e la biopsia mostrò

un quadro di atrofia della mucosa intestinale Dal punto di vista clinico questi pazienti presentavano una storia caratteristica di dolore addominale ricorrente, diarrea cronica, perdita di peso e anemia sideropenica [118]. Questi risultati identificarono per la prima volta un nuovo gruppo a rischio di malattia celiaca, che con una prevalenza pari al 5.7% è di gran lunga maggiore di quella attesa (0,5%) e del tutto sovrapponibile a quella di altre patologie autoimmuni.

In seguito allo studio descritto, un' analisi epidemiologica tra celiaci del registro sanitario danese mostrò un' elevata incidenza di cardiomiopatia dilatativa (0,4%) rispetto all' atteso valore di prevalenza della popolazione generale (compreso tra 0,008%-0,036%). Tuttavia per determinare la relazione che intercorre tra CD e cardiomiopatia dilatativa sono necessari ulteriori studi per confermare i dati forniti da Curione e dai suoi collaboratori

3 L'ACTINA

L'Actina è una proteina di forma globulare, con un diametro di circa 7 nm, dal peso di 43 kDa e costituisce una porzione abbondante (5-10%) di tutte le proteine delle cellule eucariote. ;Essa è principalmente localizzata nel citoplasma ma può essere presente anche nel nucleo con funzione di .proteina motrice. La più alta presenza di Actina si verifica nelle cellule del tessuto muscolare (circa 20% delle proteine totali), dove è fondamentale per il processo di contrazione ma è molto abbondante in tutte le cellule (10-20% del totale di proteine intracitoplasmatiche) del nostro organismo .

Ogni singola subunità di Actina (detta *Actina G*, cioè globulare) si può legare ad altre due subunità, formando così un polimero lineare. Due polimeri lineari avvolti tra di loro danno origine ad un microfilamento, uno dei tre tipi fondamentali di filamenti che compongono il citoscheletro [*Figura 7*]

.Formando la struttura principale del citoscheletro è alla base delle sue numerose ed importanti funzioni: interviene nella motilità e adesione cellulare, organizza i rapporti ed i segnali che arrivano ai recettori cellulari, prende parte ai processi di endo-esocitosi,ha funzione di proteina motrice, regola il trasporto di ioni , la struttura della matrice intra ed extracellulare e la risposta mediata da recettori a segnali extracellulari.;interviene infine nell'apoptosi e in altri meccanismi che controllano il danno tessutale.[119]

I microfilamenti di Actina contraggono strettissimi rapporti con le *giunzioni strette*, così come con altre proteine intracitoplasmatiche, che ne guidano il movimento (ad esempio Miosina e Dineina) e altre che ne controllano la polimerizzazione. .

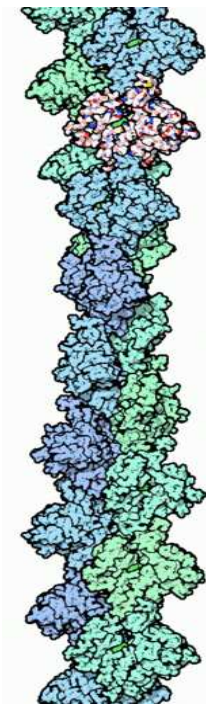


FIGURA 7– *Un microfilamento di Actina: in due toni di azzurro le subunità di Actina di un semifilamento e in due toni di verde le subunità del secondo semifilamento. In colori misti è evidenziata una singola subunità di Actina.*

3.1 ASSEMBLAGGIO E DISASSEMBLAGGIO

L'assemblaggio dei filamenti di Actina è dipendente dalle condizioni dell'ambiente interno alla cellula, il citosol, ed in particolare dagli ioni presenti, dalle loro concentrazioni e dal legame con l'ATP, l'adenosintrifosfato, un'importante molecola energetica. La polimerizzazione è infatti favorita da una concentrazione salina pari a quella corporea; inoltre, i monomeri di Actina legati ad ATP tendono ad aggiungersi e a restare attaccati al filamento con maggiore facilità rispetto ai monomeri in cui l'ATP è diventata ADP, l'adenosindifosfato. La presenza di un capo del filamento caratterizzato da Actina legata ad ATP identifica l'estremità "più", mentre l'altro capo, dove l'Actina è legata a ADP costituisce l'estremità "meno" del filamento.

La singola subunità di Actina non espleta direttamente una funzione, ma lo fa tramite la struttura che forma, il già citato microfilamento. Nella cellula sono presenti moltissimi microfilamenti e questi assolvono a diverse funzioni:

1. forniscono sostegno e forma alla cellula, collegandosi con gli organelli interni e con la membrana plasmatica;

2. permettono una parte del trasporto interno di vescicole;
3. i sarcomeri, le unità contrattili delle cellule muscolari sono formati da Actina, oltre che da miosina ed altre proteine;
4. costituiscono la base su cui si formano le principali estroflessioni cellulari, quali microvilli, stereociglia, filopodi, lamellipodi, pseudopodi;
5. sono coinvolti nell'adesione tra cellule e tra una cellula ed un substrato.[119]

3.2 ORGANIZZAZIONE DEI FILAMENTI E DELLE PROTEINE ASSOCIATE

Ci sono ben 162 diverse proteine deputate all'arrangiamento dei microfilamenti di Actina. Esse sono in grado di depolimerizzare i filamenti di questa proteina, di legarne i monomeri (per ridurre la concentrazione e quindi la tendenza a formare polimeri) ed anche di incappucciare l'estremità in accrescimento rapido dei nuclei in formazione per evitarne l'ulteriore allungamento.[119]

Nelle cellule questi enzimi si localizzano prevalentemente al di sotto della membrana plasmatica, dove l'attività dei microfilamenti è più dinamica e più varia. Infatti i filamenti di Actina sono attivamente coinvolti in diverse fasi della vita della cellula, come per esempio l'apoptosi, la rigenerazione e il movimento, e devono poter variare la loro lunghezza molto rapidamente per svolgere adeguatamente la propria funzione..

Questa famiglia di proteine si può suddividere in sottoclassi a seconda del tipo di interazione che intrattiene con l'Actina:

1. proteine che favoriscono la formazione dei filamenti: profilina (si lega ai singoli monomeri di Actina);
2. proteine che ostacolano la formazione dei filamenti legandosi anch'esse ai singoli monomeri di *G Actina*: Severina e Timosina e Gelsolina

3. proteine che organizzano i microfilamenti in fasci paralleli: fimbrina, α -actinina, Tropomiosina, Fodrina, Villina;
4. proteine che organizzano i microfilamenti in reticoli: Filamina;
5. proteine che collegano i microfilamenti alla membrana plasmatica: Spettrina, Distrofina, Vinculina, Talina, Tensina;
6. proteine che si muovono sui microfilamenti: Miosina.

Esiste anche una distinzione in funzione al fatto che le ABP siano legate con G-Actina (forma globulare Actina + ATP) o F-Actina (filamentosa). Esempi famosi di proteine capaci di legarsi a F-Actina sono Miosina Tropomiosina e α -Actinina; esempi invece delle ABP capaci di legarsi con le molecole di G-Actina sono la B-Timosina e la Profilina e la Gelsolina..[119]

3.2.1 LA GELSOLINA

In particolare quest'ultima proteina esiste in due isoforme che derivano da splicing alternativo di un singolo gene. L'isoforma extracellulare o plasmatica quasi identica a quella citosolica e deriva per splicing alternativo di un singolo gene che porta alla formazione di un piccolo peptide situato all'ammino- terminale della proteina .La Gelsolina plasmatica è in grado di "rivestire" e separare ad uno ad uno i monomeri dell'Actina filamentosa rilasciata in circolo in seguito a danno tissutale. Nel siero questo fattore svolge una funzione molto importante poiché riduce la concentrazione plasmatica di Actina filamentosa (o F Actina). ;infatti, quando la F-Actina è presente nel sangue a grosse concentrazioni, come accade in seguito a un danno tissutale, contribuisce all'aggregazione piastrinica e facilita la formazione di trombi intravasali.[104] La depolimerizzazione dei microfilamenti avviene in due fasi: una prima veloce, calcio dipendente e dovuta all'azione di questo enzima, e una seconda più lenta, dovuta al legame dell'Actina con la proteina sierica legante la vitamina D (vitamin-D binding protein – DBP [121, 122],[Figura 8]; infine i monomeri vengono rimossi dal torrente circolatorio nel fegato. Il siero umano è in grado di depolimerizzare, grazie alla Gelsolina sierica circa 10-18 $\mu\text{mol/l}$ di actina, di cui 5 $\mu\text{mol/l}$ rapidamente.[123, 124]

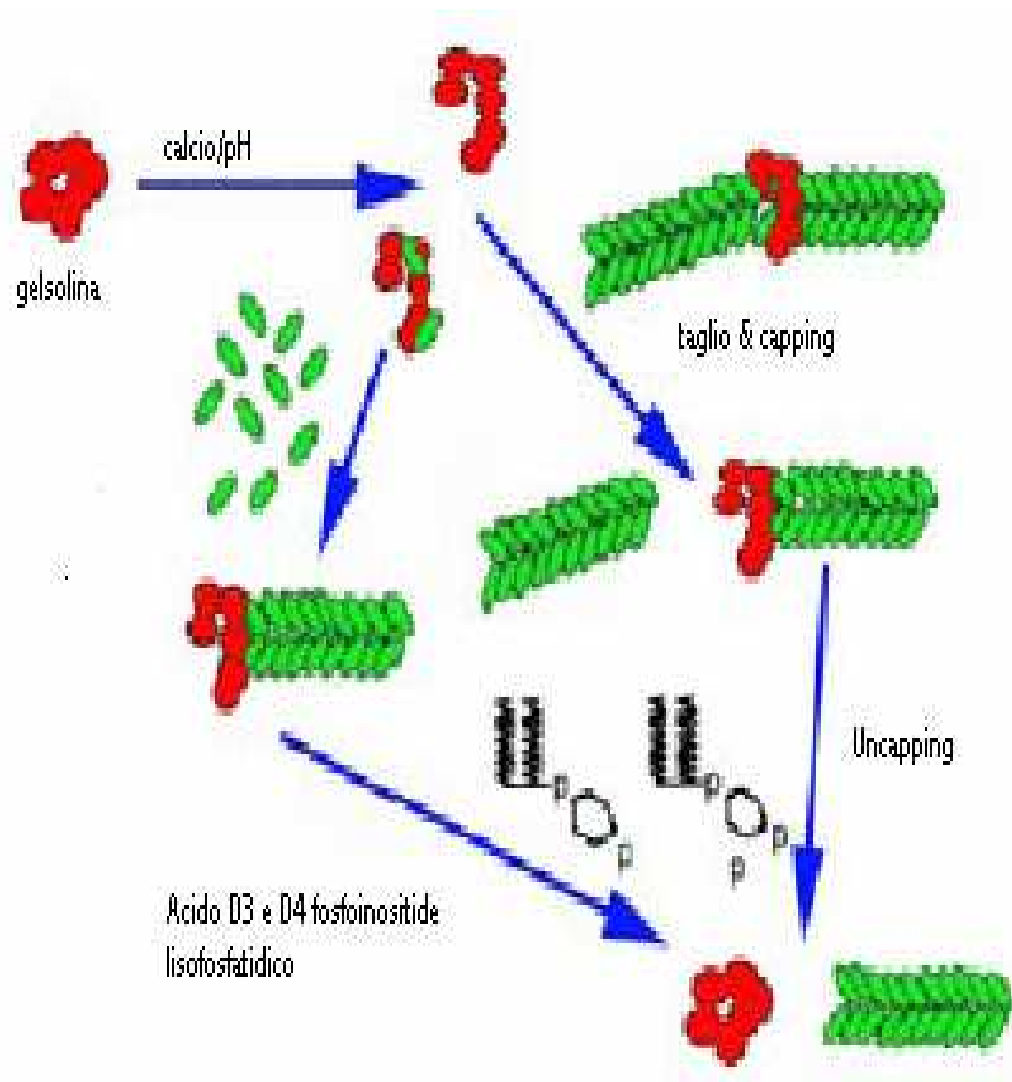


FIGURA 8—la Gelsolina si lega ad un lato del filamento di Actina troncadolo e incappucciando le estremità; agisce in presenza di calcio; l'acido fosfoinositolo di fosfato inibisce il legame tra Gelsolina e il filamento di Actina

4 NOVITA' NELLA DIAGNOSI DI CD: GLI ANTICORPI ANTI ACTINA DI TIPO IgA

La ricerca degli anticorpi anti-Actina (AAA) nella CD nasce dal dosaggio di questi nelle epatiti autoimmuni.[126] In un gruppo di pazienti affetti da epatite autoimmune, era stata riscontrata una reattività anticorpale diretta contro strutture del muscolo liscio ed erroneamente interpretata come anticorpi anti-muscolo. La tecnica dell' immunomicroscopia elettronica ha dimostrato invece che tali anticorpi erano diretti contro l'Actina, ben rappresentata nel tessuto muscolare come unità funzionale.[125]

L'Actina che ,come è stato detto sopra, è presente in diverse forme nel citoscheletro, sia come monomeri di Actina (G-Actina), sia come filamenti di Actina a doppia elica intrecciata, frutto della polimerizzazione della G-Actina., costituisce tra l'altro anche l'ossatura dei microvilli degli enterociti..

Osservazioni sperimentali hanno dimostrato che l'ingresso di gliadina determina una rapida polimerizzazione e ridistribuzione dei filamenti di Actina nella mucosa intestinale con conseguenze inevitabili, anche se poco conosciute, sull'organizzazione del citoscheletro e quindi sulla struttura dell'enterocita.[128]

Inoltre, è stato recentemente riportato che nelle cellule della muscolatura liscia endoteliale, oltre il 40% dell'attività della transglutaminasi colocalizza con i filamenti di Actina

La reazione immune contro il citoscheletro è apparsa presente esclusivamente nei con i gradi più severi di atrofia dei villi intestinali e quindi questo stretto legame tra la presenza degli anticorpi anti Actina e la severità e persistenza suggeriscono che possano essere secondari al danno della mucosa con il quale si verifica lo smascheramento di antigeni criptici. In linea con tale ipotesi altri antigeni tissutali possono progressivamente essere esposti al sistema immune inseguito alla continua ingestione di glutine portando alla continua produzione di un numero maggiore di autoanticorpi nei soggetti predisposti.(come ad esempio anticorpi contro la Calreticulina umana e la Zonulina.[127]

Inoltre le alterazioni del citoscheletro di per se potrebbero ulteriormente aggravare il danno mucosale e l'apoptosi. Infatti lo stato del citoscheletro regola, almeno in parte l'attività dei geni codificanti per proteine coinvolte nella struttura (Collagene tipo I e

Fibronectina), nel ricambio (Collagenasi e inibitore di metallo proteinasi) e nella regolazione (fattore di crescita beta) della matrice cellulare. Poiché la positività per gli anticorpi anti Actina è sempre stata associata all'atrofia severa la determinazione degli anticorpi anti Actina è stata sempre trovata associata all'atrofia severa dei villi intestinali, la determinazione degli anticorpi anti Actina potrebbe costituire un utile test diagnostico per individuare i pazienti celiaci con danno intestinale più severo. Questo dato , se confermato potrebbe avere notevoli implicazioni nella pratica clinica.. La biopsia intestinale, attualmente necessaria per la diagnosi è un esame strumentale invasivo eseguito tramite gastroduodenoscopia ed è accompagnato oltre che dal disagio dovuto alle procedure tecniche di per sé ai rischi legati alla frequente necessità di sedazione specialmente in età pediatrica.. La disponibilità di un marcatore sierologici, spia di un quadro intestinale di tipo celiaco, come gli anticorpi anti Actina, potrebbero permettere di evitare la biopsia intestinale in tutti i pazienti che sierologicamente mostrano positività, oltre che per gli anticorpi anti Gliadina anti Endomisio, e anti Transglutaminasi tessutale anche per gli anticorpi anti Actina .Con la conferma su casistiche più ampie dell'associazione tra la positività per gli anticorpi anti Actina e atrofia dei villi intestinali, si può prevedere un cambiamento del algoritmo diagnostico attuale

4.1 CORRELAZIONE POSITIVA TRA LA SEVERITA' DELLA LESIONE INTESTINALE E LA PREVALENZA DEGLI AAA

I lavori sull'argomento non sono molti, ma tutti rilevano l'esistenza di una stretta correlazione tra la severità della lesione intestinale e la prevalenza degli AAA nel siero di soggetti celiaci. Ad esempio, nello studio di *Clemente et al.* risultarono positivi al test, considerando la *classificazione di Marsh*, il 98,2% dei soggetti presi in analisi con lesione 3c, l' 80% dei soggetti con lesione 3b, il 30% di quelli con lesione 3a e solamente in 20% di quelli con lesione di tipo 1 o 2 ($p<0,0001$)[127]Anche nello studio di *Granito et al.*, in cui è stata riportata una prevalenza degli AAA solo del 27% nei soggetti celiaci, si è dimostrata un'elevata correlazione tra gli AAA e la lesione intestinale. Infatti è emerso che

la prevalenza degli AAA era del 46,3% tra i sieri di soggetti con lesione di tipo 3b-3c e solo del 6% per le lesioni 1-3a ($p<0,0001$).[131]

4.2 CARATTERISTICHE DEL TEST: SENSIBILITA' VARIABILE E SPECIFICITA' ELEVATA

Gli AAA sono stati testati mediante immunofluorescenza indiretta, su sieri di pazienti raccolti al momento delle indagini per la diagnosi di CD (studi prospettici). La sensibilità della metodica nei diversi lavori varia di molto, da un minimo del 25% ad un massimo del 93%. [127,129,130,131]

Utilizzando come substrato la linea cellulare *Hep-2* (cellule di carcinoma faringeo), è stata ottenuta una prevalenza degli AAA nei sieri dei soggetti celiaci, variabile tra il 25% e il 71%.[127,129,130] Impiegando invece la linea cellulare *IEC-6* (cellule di epitelio intestinale di ratto), la sensibilità raggiunta è stata dell'82,5%.[121] Risultati ancora migliori (93%) sono stati ottenuti facendo uso della linea cellulare *Hep-2* modificata (*Hep-2 actin;Inova; ref. 508090*).[122]

Molto diversi sono stati i valori di sensibilità ottenuti nell'unico studio retrospettivo. In questo caso, la prevalenza degli AAA è risultata essere del 43% tra i sieri di soggetti celiaci che erano stati conservati prima di eseguire il dosaggio a -20°C.[129]

È stata ottenuta in ogni studio una specificità molto elevata, tra il 95% e il 100%[125,129,130,133]

4.3 POSSIBILE RUOLO DEGLI AAA NELLA DIAGNOSI DI MALATTIA CELIACA

Dalla letteratura disponibile sull'argomento emerge che gli AAA sono fortemente correlati alla severità della lesione intestinale. La sensibilità e specificità risultano notevolmente elevate nella maggior parte dei lavori, pur con qualche discordanza (studio retrospettivo e studio di *Granito et al.*).[129,130,131]

Dopo un periodo di dieta senza glutine, questi anticorpi tendono a scomparire, in un intervallo di circa 5 mesi. In particolare nello studio di *Granito et al.*, 20 pazienti su 28 positivi al test sono stati analizzati nuovamente per gli AAA a distanza di un anno in dieta senza glutine e nessuno di essi è risultato positivo alla ricerca. In questi stessi soggetti, è stata eseguita anche una biopsia di controllo per verificare la correlazione tra la severità della lesione intestinale e la sierologia anche in questa fase della malattia. La mucosa intestinale è risultata integra in tutti i casi. [131]

Probabilmente gli AAA sono un marker di lesione ed appaiono essere presenti solo nella fase acuta della malattia e potrebbero, quindi, avere lo stesso significato dell'accertamento anatomopatologico di lesione intestinale fatto tramite la biopsia.

Una volta compiuti ulteriori studi di affidabilità, (standardizzazione del test, valore predittivo positivo e negativo, e la riproducibilità), gli AAA potrebbero costituire un ottimo strumento nella diagnosi di malattia celiaca. Sarebbero un test da utilizzare dopo un primo screening con anti-tTG o dopo il dosaggio degli EMA, a completamento della diagnosi di celiachia e in sostituzione della biopsia.

I soggetti positivi ad anti-tTG ed EMA, ma negativi agli AAA dovrebbero affrontare comunque l'indagine biptica a causa della bassa sensibilità degli anti-Actina. Per avere una diagnosi formalizzata, potrebbe non essere più necessaria la biopsia, ma un semplice prelievo di sangue su cui la misurazione di più auto-anticorpi garantirebbe la certezza diagnostica [132] [Figura 9].

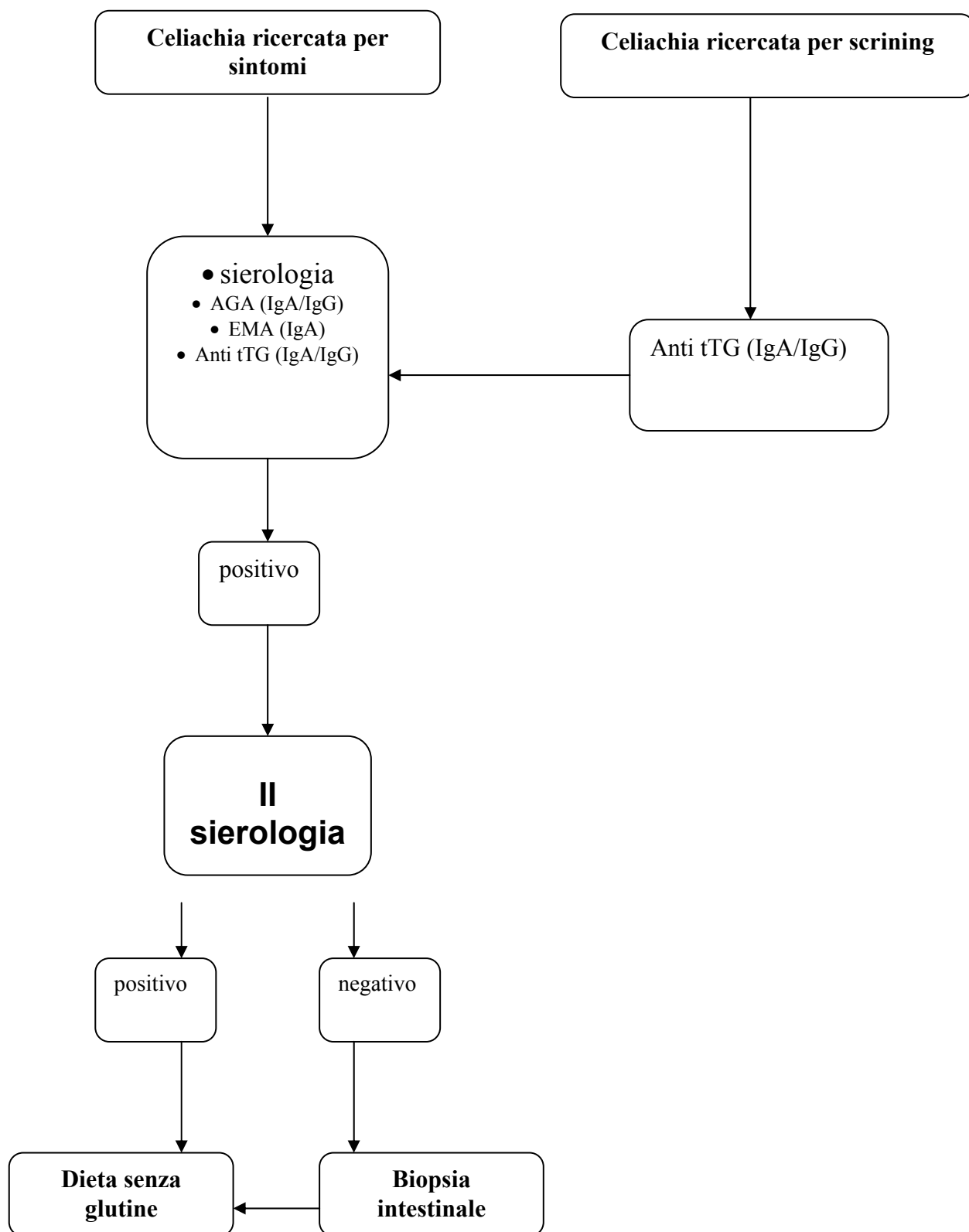


FIGURA 9—possibile protocollo diagnostico per la celiachia dopo la validazione degli AAA come marker sierologico di danno istologico.

5 OBIETTIVI DEL LAVORO

Considerando come punto di partenza i precedenti lavori, gli obiettivi del nostro studio sono:

1. Allestire una metodica di “immunofluorescenza indiretta” per dosare gli A.A.A. al fine di misurare la loro sensibilità e specificità, indipendentemente dalla durata di conservazione dei campioni, e confermare la correlazione tra la severità della lesione intestinale e la positività agli A.A.A
2. Misurare la riproducibilità di questo test i “immunofluorescenza indiretto” mediante confronto dei risultati tra più operatori.
3. Verificare il ruolo di fattori sierici (Actin Binding Protein) leganti l’ Actina, nell’inibizione del legame tra la proteina e il suo anticorpo
4. Confrontare gli A.A.A. con gli anticorpi anti Transglutaminasi tessutale nella malattia celiaca
5. Valutare la prevalenza di positività degli A.A.A. in sieri di soggetti con cardiomiopatia dilatativa idiopatica e nei loro familiari di primo grado con o senza alterazioni ecocardiografiche suggestive per CMPD diagnostici e seguiti..
6. Effettuare uno studio sulla presenza di A.A.A nella mucosa intestinale di un paziente con CD associata a cardiomiopatia dilatativa idiopatica

6 MATERIALI E METODI

6.1 DOSAGGIO DEGLI ANTICORPI ANTI ACTINA MEDIANTE IMMUNOFLUORESCENZA INDIRETTA

Allestimento del test ad immunofluorescenza indiretta: cellule di tipo “*Hep-2*” sono state piastrate (su vetrini sterili, suddivisi in otto pozzetti divisi gli uni dagli altri mediante pareti di separazione). quindi, fissate e permeabilizzate. In seguito ogni pozzetto è stato incubato con un campione di siero proveniente dai soggetti presi in esame. (ognuno dei campioni è stato trattato, e quindi testato, con tre diverse metodiche.) e successivamente è stato incubato con anticorpo antiuomo.

.Il vetrino è stato quindi osservato al microscopio ad immunofluorescenza indiretta ad un ingrandimento di 40x da tre operatori.

L’esito dell’immunofluorescenza indiretta è stato considerato positivo quando nella cella osservata sono stati evidenziati i microfilamenti di Actina in più del 50% delle cellule, (soprattutto come microprotrusioni dalle *Hep-2* ma anche come filamenti intracitoplasmatici paralleli [*Figura 10*]. Più in dettaglio il procedimento seguito è stato quanto segue.

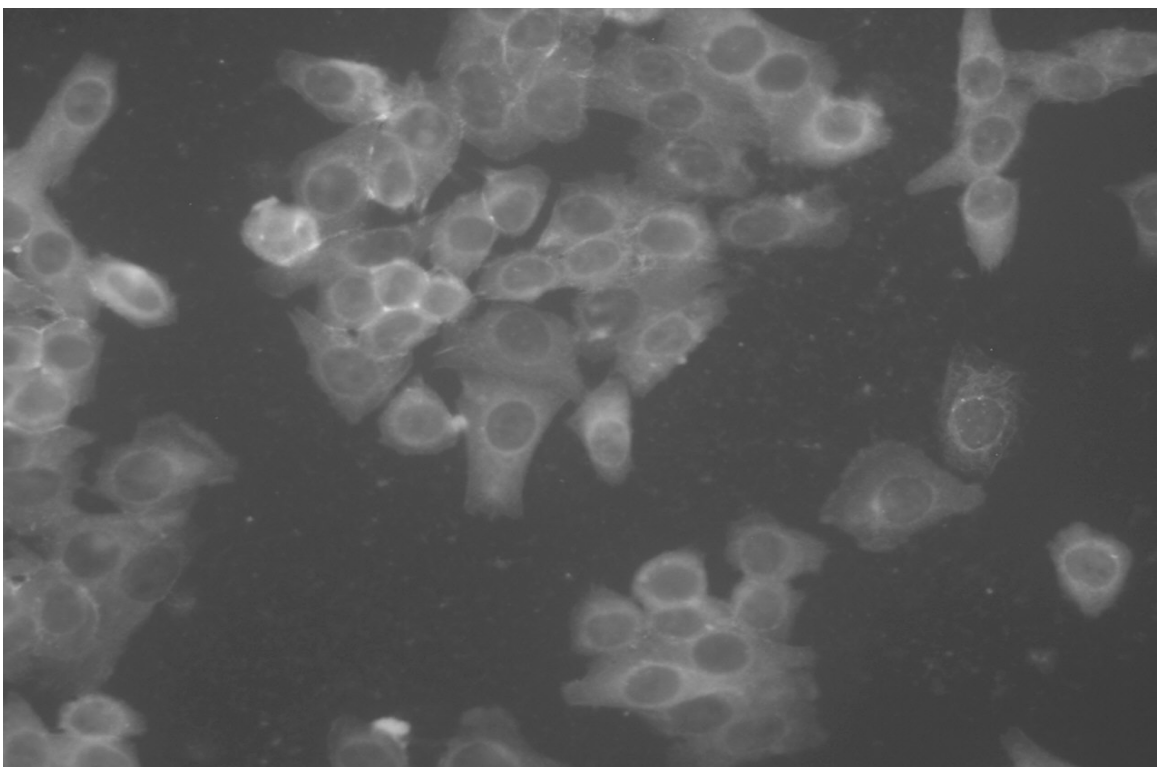
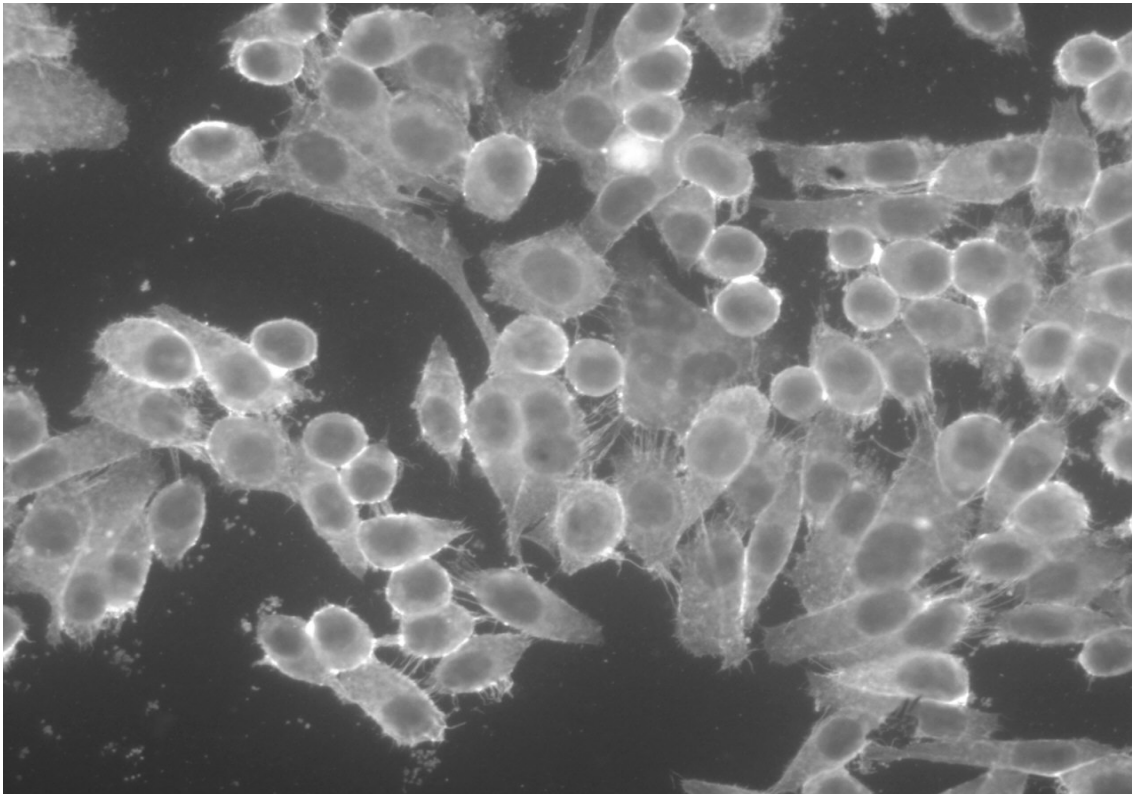


FIGURA 10– esempi di test d' immunofluorescenza indiretta per la ricerca degli AAA su linee cellulari *Hep-2*.
AAA Positivo(foto 1), AAA negativo (foto 2.)

6.2 LA CULTURA DELLE CELLULE *HEP-2b*

1. Coltivare le cellule *Hep-2b* in flask da 25 ml, incubate a 37°C, al 5% di CO₂, in liquido di cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) addizionato con glucosio (4500 mg/l), 1% di glutammina, 1% di antibiotici (penicillina e streptomicina) e 10% di FBS (Fetal Bovine Serum).
2. Al raggiungimento di una confluenza di circa 80%, staccare le cellule dalla flask mediante incubazione breve con 1ml di Tripsina allo 0,25%.
3. Lavare le cellule per 2 volte in PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline), per rimuovere proteine eventualmente presente provenienti dal terreno
4. Portare le cellule ad una concentrazione di 10⁶/ml.
5. Distribuire 40 µl di questa soluzione madre negli otto pozzetti, forniti di pareti di separazione (Lab-Tek chamber slide 177402 Nalge Nunc International).
6. Incubare i vetrini a 37°C, al 5% di CO₂ per 48 ore fino al raggiungimento della confluenza di circa il 50% - 80% in ogni pozzetto.

6.2.1 IMMUNOFLUORESCENZA SU CELLULE *HEP 2b* IN CULTURA

1. Aggiungere ad ogni pozzetto Colchicina 0,1 mM in soluzione fisiologica per poter rendere più evidenti i filamenti di Actina e incubare per due ore a temperatura ambiente.
2. Lavare le cellule per due volte con PBS
3. Fissare le cellule con Paraformaldeide al 4% incubare per 15 minuti RT
4. Lavare 2 volte con PBS e
5. Permeabilizzare le cellule incubando per 15 minuti con *Triton X 100* 0,5%-PBS a RT.
6. .Eeguire tre lavaggi con PBS
7. Addizionare 120 µl di siero (diluito e trattato con le tre diverse metodiche) ad ogni pozzetto e incubare per 35 minuti a RT.
8. Effettuare altri tre lavaggi con di PBS -Tween 0,05% in agitazione per circa 5 minuti.

9. Incubare con l' anticorpo secondario anti-IgA Human (*Jakson Immunoresearch*) diluito 1:100 in PBS Tween 0,05% per 40 minuti a temperatura ambiente e al buio.
10. Lavare nuovamente di PBS Tween 0,05% in agitazione al fine di
11. Asciugare e ricoprire il vetrino con glicerolo (50% in PBS) e proteggerlo con coprioggetto.
12. Osservare al microscopio ad immunofluorescenza ad un ingrandimento pari a 40x.

6.2.2 ALLESTIMENTO DI VETRINI ATTIVATI CON CELLULE *HEP-2b*

1. Aggiungere ad ogni pozzetto Colchicina 0,1 mM in soluzione fisiologica per poter rendere più evidenti i filamenti di Actina e incubare per due ore a temperatura ambiente.
2. Lavare le cellule per due volte con PBS
3. Aggiungerei Paraformaldeide al 4% incubare per 15 minuti a temperatura ambiente. al fine di fissare le cellule al vetrino.
4. Effettuare due lavaggi PBS e incubare con *Triton X 100*, 0,5% a temperatura ambiente. Tramite questa procedura, la membrana plasmatica diviene permeabile agli eventuali anticorpi presenti nel siero.
5. Eseguire tre lavaggi con PBS e quindi addizionare 120 µl di siero (diluito e trattato con le tre diverse metodiche) ad ogni pozzetto e incubare per 35 minuti a temperatura ambiente.
6. Effettuare altri tre lavaggi con di PBS -Tween 0,05% in agitazione per circa 5 minuti.
7. Incubare con l' anticorpo secondario anti-IgA Human (*Jakson Immunoresearch*) diluito 1:100 in PBS Tween 0,05% per 40 minuti a temperatura ambiente e al buio.
8. Lavare nuovamente di PBS Tween 0,05% in agitazione al fine di eliminare l'anticorpo secondario in eccesso .
9. Ricoprire il vetrino con glicerolo (50% in PBS) e proteggerlo con vetrino coprioggetto.
10. Osservare al microscopio ad immunofluorescenza ad un ingrandimento pari a 40x.

6.3 UTILIZZO DI TRATTAMENTI CHIMICO-FISICO PER AUMENTARE LA SENSIBILITA' DEL TEST

Come suggerito da diversi lavori sul tema, l'azione mascherante delle proteine leganti l'Actina [*Capitolo 3.2*] può essere inibita tramite il riscaldamento del siero oppure attraverso la diluizione del campione in soluzione addizionata con calcio-chelante ad elevata concentrazione. .

Per questo motivo ogni siero preso in esame è stato testato per tre volte, una volta per ciascun trattamento preso in considerazione:

1. Siero diluito 1:5 in PBS Tween 0,05%.
2. Siero diluito 1:5 in PBS Tween 0,05% e riscaldato per 45'a 56°C.
3. Siero diluito 1:5 in soluzione EDTA (calcio-chelante) 0,1mM in PBS Tween 0,05%

6.4 VALUTAZIONE DELLA LESIONE INTESTINALE

È stato eseguito un prelievo biotico in tutti i pazienti celiaci appartenenti a questo studio. La biopsia è stata eseguita in fase di esofagogastroduodenoscopia (EGDS), svolta in sedazione o meno in base al tipo di paziente. Il prelievo è multiplo eviene effettuato al raggiungimento della parte discendente del duodeno. Il materiale ottenuto viene posto su un filtro millipore acetato di cellulosa e questo incluso in modo standard in un blocchetto di paraffina. Questa procedura serve per orientare correttamente il pezzo biotico, in modo tale che si possano evidenziare correttamente tutti gli stati della parete. I campioni vengono suddivisi in due parti che verranno analizzate in maniera diversa.

La prima quota di tessuto viene conservata e fissata secondo i classici sistemi utilizzati per i tessuti e successivamente viene processata con ematossilina-eosina e impiegata per l'esame microscopico, al fine di osservare la morfologia dei villi intestinali, delle cripte, il rapporto villo/crypta e l'infiltrato cellulare eventualmente presente. La descrizione istopatologica viene riassunta dai criteri di Marsh

La seconda porzione del campione bioptico, viene congelata in azoto liquido e conservata a -80°C . con il citocromo congelatore, si fanno delle sezioni di $5\text{ }\mu\text{m}$ le quali, dopo fissazione in acetone per 10 minuti e in cloroformio per altri 30 minuti, vengono lavate, per tre volte con il tampone tris a pH 7,4, e successivamente ricoperte per 16 ore con una soluzione 1:100, contenente anticorpi monoclonali, che riconoscono le regioni costanti della catena δ del TCR presente sui linfociti T. Con questa processazione si può riconoscere la percentuale di T linfociti γ/δ positivi. L'osservazione si effettua su un millimetro lineare di biopsia utilizzando un microscopio luce a 100 ingrandimenti che permetterà di individuare la percentuale di linfociti T (CD3+) con recettore di tipo γ/δ tra gli enterociti. La densità di linfociti T con recettore di tipo γ/δ viene espressa tramite la percentuale di questi sulla totalità dei linfociti T presenti nella mucosa e valori superiori al 40% sono da considerarsi patologici. Infatti normalmente i linfociti che sono presenti nella porzione intraepiteliale e nella lamina propria della mucosa intestinale sono di tipo α/β e la percentuale di γ/δ risulta inferiore al 10%.

6.5 ANALISI STATISTICA

6.5.1 SENSIBILITA' E SPECIFICITA'

La sensibilità del test ($VP/VP+FP$) è stata calcolata come rapporto tra sieri di celiaci positivi per la ricerca degli AAA (veri positivi, VP) e la somma di questi e i soggetti positivi all'immunofluorescenza indiretta e appartenenti ai gruppi di controllo (falsi positivi, FP).

La specificità del test ($VN/VN+FN$) è stata calcolata come rapporto tra i sieri di soggetti appartenenti al gruppo di controllo risultati negativi alla ricerca degli AAA (veri negativi, VN) e la somma di questi con il numero dei sieri risultati negativi e appartenenti a soggetti celiaci (falsi negativi, FN).

Specificità e sensibilità sono state calcolate per ogni trattamento utilizzato.

6.5.2 CORRELAZIONE TRA LA PREVALENZA DEGLI AAA E LA SEVERITA DELLA LESIONE INTESTINAE

È stato utilizzato il test χ^2 per valutare se il trend di crescita del rapporto tra numero di campioni positivi all'immunofluorescenza indiretta e il numero totale di campioni di sieri di soggetti celiaci analizzati per ogni classe di lesione, risulta statisticamente significativo.

6.6 CONFRONTO TRA PIÙ OPERATORI E RIPRODUCIBILITA' DEL TEST

L'immunofluorescenza indiretta un esame operatore-dipendente, abbiamo considerato la lettura da parte di tre diversi operatori, che hanno lavorato in cieco, di 81 sieri appartenenti a soggetti celiaci e 88 sieri appartenenti a controlli sani. Ciascun siero è stato valutato per ciascuna metodica di trattamento, quindi per tre volte.

È stato quindi valutato il valore di kappa per ciascuna metodica in base alle letture dei tre operatori per misurare il livello di accordo (agreement) e quindi la riproducibilità (bontà) del test attraverso l'utilizzo delle seguenti griglie di valutazione:

Kappa	Forza della concordanza
< 0,00	Povera
0,00-0,20	Lieve
0,21-0,40	Discreta
0,41-0,60	Moderata
0,61-0,80	Sostanziale
0,81-1	Quasi perfetta

TABELLA 2– griglia di valutazione di Landis-Koch

Kappa	Riproducibilità
>0,75	Eccellente
0,40-0,74	Buona
0,00-0,039	Marginale

TABELLA 3– griglia di valutazione di Fleiss

6.7 TEST D'INIBIZIONE PER LA VERIFICA DEL RUOLO DELLA GELSOLINA SIERICA

La verifica del ruolo dei fattori sierici leganti l'Actina (*Actin Binding Protein*), che la sequestrano il legame con anticorpi specifici, inducendo risultati falsamente negativi è stata condotta con due diversi approcci secondo i seguenti protocolli:

Prima prova: Ipotizzando che i fattori depolimerizzanti l'Actina, contenuti in un pool di sieri di controlli sani, mascherino il sito di legame degli AAA utilizzando gli stessi epitopi di questi anticorpi lungo il microfilamento di Actina, ci si attende che, preincubando le cellule con un pool di sieri negativi, la positività dei campioni che contengono gli AAA venga meno al test ad immunofluorescenza indiretta. Per testare questa ipotesi, il protocollo seguito è stato:

1. Incubare 500 μ l di un pool di 8 sieri di donatori sani, negativi agli AAA, e contenente un'uniforme concentrazione di Gelsolina con un' anticorpo monoclonale anti-Gelsolina (*Sigma G4896*) a concentrazioni crescenti (1:40, 1:20, 1:10, 1:5) a RT per 60 minuti in agitazione
2. Testare il pool su una linea cellulare di *Hep 2b* attivata (vedi primo protocollo)
3. Lavare 3 volte con PBS e 3 con PBST
4. Incubare per altri 60 minuti con sieri di pazienti celiaci francamente positivi agli AAA
5. Lavare 3 volte con PBS e 3 con PBST
6. Incubare con un anticorpo secondario anti-Human IgA FITC (*Jakson immunoresearch*) diluito 1:100
7. . Lavare 3 volte con PBS e 3 con PBST
8. Osservare al microscopio ad immunofluorescenza ad un ingrandimento pari a 40x.

Seconda prova: Ipotizzando che Actina monomerica presente in un pool di sieri negativi possa legare la Gelsolina e rendere questo enzima non più disponibili al riconoscimento degli epitopi dei microfilamenti all'interno delle *Hep2*, ci si attende che la capacità di mascherare i siti di legame per gli AAA da parte dei sieri negativi venga meno. In questo modo i sieri contenenti AAA testati dopo preincubazione con sieri negativi addizionati di actina, dovrebbero risultare ugualmente positivi al test ad immunofluorescenza indiretta. Per testare questa ipotesi, il procedimento seguito è stato:

1. Incubare il pool di sieri A.A.A. negativi con dosi crescenti di Actina (*SigmaA2522*) monomerica (5-10-15-20 µg/ml) che sequestra il fattore Gelsolina

Eseguire gli stessi passaggi della prima prova

6.8 CONFRONTARE GLI ANTICORPI ANTI ACTINA CON GLI ANTI TRANSGLUTAMMINASI

La ricerca degli anticorpi anti-tTG di classe IgA per il confronto con gli AAA è stata eseguita con la metodica immunoenzimatica *ELISA* su sieri di pazienti celiaci, su controlli sani e su soggetti con altre malattie autoimmuni (Morbo di Chron, Rettocolite Ulcerosa)

Il test si è dimostrato affidabile perchè dotato di elevata di specificità (98%) e sensibilità (99%), poco costoso e non operatore dipendente.

La transglutaminasi umana (h-tTG) utilizzata come antigene è stata ottenuta mediante la tecnologia del DNA ricombinante.

Il test ELISA è stato seguito in apposite piastre in polietilene a 96 pozzetti secondo il seguente protocollo:

1. Attivazione su piastra.- preparare una soluzione di h-tTG diluita in PBS. ad una concentrazione di 20µg/ml
2. Lasciare in incubare a +4 per almeno 14-16 ore. .In questa fase l'antigene si lega al fondo dei pozzetti.
3. Lavare la piastra per tre volte con PBS Tween 0,005%.
4. Saturazione della piastra - dispensare 300 µl di PBS Tween 0,1 % per evitare la formazione di legami specifici tra anticorpi del siero e zone rimaste prive di antigene sul fondo del pozzetto dando così risultati falsamente positivi .La saturazione deve durare 40 minuti a RT
5. Dispensare in ogni pozzetto 100 µl di siero diluito. Per il controllo bianco si dispensa un uguale volume di PBS Tween 0,1%. Per il controllo positivo ,nello studio delle IgA si usa una diluizione 1:200
6. Incubare i sieri per 60 minuti a RT. Durante questa fase gli anticorpi anti -tTG di classe IgA eventualmente presenti nel siero testati si legano all'antigene sul fondo del pozzetto
7. Lavare nuovamente con la procedura prima descritta.
8. Dispensare per ogni pozzetto gli anticorpi anti Ig A .marcati con fosfatasi alcalina (*Sigma*) Il solvente per gli anticorpi anti IgA è il PBS-BSA 1%PEG 4%. La

saturazione è pari a 1:1000 per le IgA. Si dispensano 100µl e si lascia incubare per 60 minuti a RT .Durante questo passaggio vengono riconosciuti , se presenti, gli anticorpi anti-tTG legati al pozzetto grazie all'utilizzo dell'antisiero specifico. marcato con fosfatasi alcalina.

9. Lavare nuovamente la piastra sempre con la stessa procedura.
10. Eseguire la colorazione con tampone Glicina 0,1M a cui si aggiunger p- Nitrofenil Phosphate (pNPP) in pastiglia Per ogni pozzetto si aliquota 100µl di colorante Questo substrato a contatto con l'enzima fosfatasi alcalina, legato ad anticorpi anti IgA umani vira a causa di una reazione immunoenzimatica dal colore bianco al colore giallo. L'intensità del colore così ottenuto viene misurato alla lunghezza d'onda di 405nm
11. Incubare la piastra a 37°C e vanno eseguite letture spettrofometriche ad intervalli successivi per rilevare la densità ottica dei vari pozzetti .Il *cut off* per la positività del test è del 7 % per le IgA Sopra questi due valori il test è da considerare positivo e compatibile con la diagnosi di malattia celiaca

6.9 SELEZIONi DI LIBRERIE ANTICORPALI TOTALI DI MUCOSA INTESTINALE CON ACTINA *G* e *tTG*

Per verificare la presenza di anticorpi anti-Actina a livello della mucosa intestinale sono state utilizzate librerie anticorpali totali ottenute con la tecnica del *Phage Display* da soggetti con celiachia.

Il *Phage Display* di frammenti anticorpali umani ha dimostrato di essere un metodo efficace per studiare la risposta immune nelle patologie autoimmunitarie.

Questa metodica permette di ricreare un intero repertorio anticorpale a partire dall'RNA totale estratto da un determinato tessuto tramite il clonaggio delle regioni variabili delle immunoglobuline in un vettore fagmidico e la loro espressione come proteine di fusione su fagi filamentosi . Ogni fago avrà in superficie un diverso anticorpo e contemporaneamente trasporterà il relativo gene. In breve, le regioni variabili delle catene pesanti (VH) e di quelle leggere (VL) delle immunoglobuline vengono amplificate mediante PCR a partire

dal cDNA. Le regioni VH vengono unite stabilmente alle VL mediante una reazione di ligazione, formando quello che viene definito un single-chain antibody fragment (scFv). Il scFv viene infine clonato in un vettore fagmidico a monte del gene III codificante per la proteina g3p del rivestimento del fago M13. Dopo trasformazione di E. coli e infezione con un fago helper M13, vengono prodotte delle particelle fagiche che esprimono un anticorpo funzionale sulla loro superficie. Anticorpi specifici verso un determinato antigene possono essere isolati mediante cicli ripetuti di legame su un antigene immobilizzato su fase solida, lavaggio, eluizione, infezione di batteri ed amplificazione dei fagi legati all'antigene. Infine, i cloni batterici che esprimono una specificità anticorpale contro l'antigene sono caratterizzati per l'epitopo riconosciuti

In dettaglio i protocolli che sono stati seguiti per le selezioni e per il fingerprinting sono i seguenti

SELEZIONI

1° Giorno

1. Inoculare 10-20 μ l della mini-libreria raccolta in 10 ml di 2xYT + Ampicillina (Amp) 1% + glucosio 1% in modo da partire da una DO_{600} iniziale = 0.05 ($= 5 \times 10^7$ batteri/ml; con una libreria il cui titolo è pari a 10^5 - 10^6 , la rappresentatività della diversità è garantita).
2. Far crescere in agitazione a 37°C fino a $DO_{600} = 0.5$.
3. Infettare con fago *helper* in modo che il rapporto MOI fago:batteri sia 100:1 e lasciare fermo per 45' a 37°C.
4. Centrifugare a 3000 rpm per 15' a T ambiente.
5. Eliminare il sopranatante e risospendere il *pellet* in 50 ml di 2xYT + Amp 1% + Kanamicina (Kan) 1%.
6. Far crescere in agitazione O/N a 28°- 30°C.

COATING: saturare un immunotubo con l'antigene (htTG) 10 μ g/ml diluito in 500 μ l - 1 ml di PBS 1X e lasciare O/N a 4°C.

2° Giorno

1. Centrifugare a 7000-8000 rpm per 20' a 10°C.
2. Aggiungere a 40 ml del sopranatante 10 ml di PEG-NaCl sterile.
3. Lasciar precipitare in ghiaccio per 45', agitando ogni tanto.
4. Centrifugare a 5000 rpm per 20'.
5. Eliminare il sopranatante e risospendere il *pellet* in 1 ml di PBS 1X; trasferire in un'Eppendorf da 1,5 ml.
6. Centrifugare a 13000 rpm per 5' e recuperare 900 µl di fagi presenti nel sopranatante.
7. Saturare i fagi 1:1 in latte 4% per 45'-1h a T ambiente; contemporaneamente svuotare l'immunotubo e saturarlo completamente con latte 2%.
8. Inoculare 1 colonia di DH5αF' da piastra fresca in 5 ml di 2xYT (DO₆₀₀ iniziale = 0.05). Far crescere in agitazione a 37°C fino a DO₆₀₀ = 0.5.
9. Al termine della saturazione svuotare l'immunotubo e aggiungere 500 µl - 1 ml (pari al volume usato per il *coating*) dei fagi saturati in latte.
10. Incubare in rotazione per 30' e fermo 1h 30' a T ambiente.
11. Svuotare l'immunotubo e fare 5 lavaggi con PBS 1X - Tween 0.1% e 5 con PBS 1X.
12. Svuotare l'immunotubo e mettere 500 µl - 1 ml di DH5αF' a DO₆₀₀ = 0.5.
13. Lasciare infettare per 45' a 37°C.
14. Piastrare su piastre 2xYT + Amp 1% + glucosio 1%: 200 µl di DH5αF' per controllare l'assenza di contaminazioni; 500 µl - 1 ml delle cellule DH5αF' infettate coi fagi (1° *output*); una diluizione per calcolare la titolazione della 1° selezione.
15. Far crescere le piastre O/N a 37°C.

3° Giorno

1. Raccogliere il 1° output in 1 ml di 2xYT. Aggiungere glicerolo sterile fino alla concentrazione max 20%. Conservare a -80°C.
2. Ripetere i passaggi del 1° Giorno partendo da un inoculo del 1° output.

COATING: saturare un immunotubo con l'antigene (htTG) 10 µg/ml diluito in 500 µl - 1 ml di PBS 1X e lasciare O/N a 4°C.

4° Giorno

Procedere come il 2° Giorno ma aumentando la stringenza:

1. Incubare in rotazione per 30' e fermo 1h 30' a T ambiente.
2. Svuotare l'immunotubo e fare 10 lavaggi con PBS 1X - Tween 0.1% e 10 con PBS 1X.
3. Aggiungere 2 ml di PBS 1X - Tween 0.1% e lasciare in rotazione per 30' a T ambiente.
4. Svuotare l'immunotubo e fare 5 lavaggi con PBS 1X - Tween 0.1% e 5 con PBS 1X.
5. Svuotare l'immunotubo e mettere 500 µl - 1 ml di DH5αF' a $DO_{600} = 0.5$.
6. Lasciare infettare per 45' a 37°C.
7. Piastrare su piastre 2xYT + Amp 1% + glucosio 1%: 200 µl di DH5αF' per controllare l'assenza di contaminazioni; 500 µl - 1 ml delle cellule DH5αF' infettate coi fagi (**2° output**); una diluizione per calcolare la titolazione della 2° selezione.
8. Far crescere le piastre O/N a 37°C.

5° Giorno

1. Preparare una *master plate* in una piastra da microtitolazione da 96 pozzetti mettendo in ciascuno 120 µl di 2xYT + Amp 1% + glucosio 1% + 1 colonia *piccata* dalla piastra della 2° selezione.
2. Far crescere in agitazione a 37°C.

3. Duplicare la *master plate* in una seconda piastra da microtitolazione da 96 pozzetti mettendo in ogni pozzetto 100–110 μ l di 2xYT + Amp 1% + glucosio 1% e rispettivamente 20-10 μ l del corrispondente pozzetto della *master plate*.
4. Far crescere in agitazione a 37°C fino a $DO_{600} = 0.5$.
5. Infettare con fago *helper* in modo che il rapporto MOI fago:batteri sia 100:1 e lasciare fermo per 45' a 37°C.
6. Centrifugare a 1500 rpm per 20'.
7. Eliminare il sopranatante.
8. Risospendere il *pellet* in 140 μ l di 2xYT + Amp 1% + Kan 1 %.
9. Far crescere in agitazione O/N a 28°- 30°C.

COATING: saturare i pozzetti di una piastra per ELISA con l'antigene (htTG) 10 μ g/ml diluito in 100 μ l di PBS 1X e lasciare O/N a 4°C.

6° Giorno

1. Svuotare il *coating* della piastra per ELISA e saturare la piastra con 120 μ l per pozzetto di latte 2% per 45' a T ambiente.
2. Centrifugare la seconda piastra da microtitolazione (con la coltura O/N) a 1500 rpm per 15'.
3. Svuotare il latte dalla piastra per ELISA.
4. Incubare con 100 μ l per pozzetto di anticorpo primario (fagi) dato dal surnatante diluito 1:1 in latte 4% per 1h 30' a T ambiente.
5. Svuotare e fare 3 lavaggi con PBS 1X - Tween 0.1% e 3 con PBS 1X.
6. Incubare con 100 μ l per pozzetto di anticorpo secondario (anti M13-HRP) diluito 1:2000 in latte 2% per 1h-1h 30' a T ambiente.
7. Svuotare e fare 3 lavaggi con PBS 1X - Tween 0.1% e 3 con PBS 1X.
8. Sviluppare con 65 μ l per pozzetto di TMB (3',3',5',5' tetrametilbenzidina diidrocloreuro) - tampone di sviluppo per la perossidasi.
9. Bloccare la reazione con 35 μ l per pozzetto di acido solforico (H₂SO₄) 1M.
10. Eseguire la lettura a 450 nm.

I cloni risultati positivi vanno riconfermati. La *master plate* e i singoli cloni vanno conservati a -80°C aggiungendo glicerolo sterile fino alla concentrazione massima 20%.

6.9.1 FINGERPRINTING

a) PCR

- Buffer 1X
- MgCl₂ 1,5 mM
- dNTP 200 µM
- primer 0,5 µM
- DNA (1 µl da 50 µl di 2xYT in cui è stata risospesa 1 colonia)
- Taq DNA polimerasi 0,03 U/µl
- H₂O bidistillata sterile a 20 µl

Primer forward **VHPT2**: 5' TGG TGA TGG TGA GTA CTA TCC AGG CCC AGC
AGT GGG TTT G 3'

Primer back **VHPTL**: 5' GGA GGG TCG ACC ATA ACT TCG TAT AAT GTA
TAC TAT ACG AAG TTA TCC TCG AGC GGT A 3'

Condizioni di amplificazione:

denaturazione lunga - 94° per 5'

30 cicli:

- denaturazione breve - 94°C per 30"
- appaiamento - 60°C per 30"
- allungamento - 72°C per 45"
- allungamento finale - 72°C per 10'

Controllare l'amplificato su gel di agarosio 2% in tampone TBE 1X.

b) DIGESTIONE

- Buffer 2 1X
- BSA 1X
- PCR
- *Bst*NI
- H₂O bidistillata sterile

La concentrazione dell'enzima di restrizione da usare dipende dalla concentrazione dell'amplificato.

Digestione: 3h a 60°C.

Controllare il campione digerito su gel di agarosio 3% in TBE 1X.

6.9.2 SEQUENZIAMENTO

a) PRE-PCR DI SEQUENZA

- Buffer 1X
- MgCl_2 1,5 mM
- dNTP 200 μM
- primer 0,5 μM
- DNA (1 μl da 50 μl di 2xYT in cui è stata risospesa 1 colonia del clone da analizzare)
- Taq DNA polimerasi 0,025 U/ μl
- H_2O bidistillata sterile a 20 μl

Primer forward **VHseq:** 5' CAA CTT TCA ACA GTA GCG GC 3'

Primer back **VHPTL:** 5' GGA GGG TCG ACC ATA ACT TCG TAT AAT GTA
TAC TAT ACG AAG TTA TCC TCG AGC GGT A 3'

Condizioni di amplificazione:

denaturazione lunga - 94°C per 5'

30 cicli:

- denaturazione breve - 94°C per 30"
- appaiamento - 60°C per 30"
- allungamento - 72°C per 45"

- allungamento finale - 72°C per 10'

Controllare l'amplificato su gel di agarosio 2% in tampone TBE 1X.

b) PURIFICAZIONE DELLA PRE-PCR DI SEQUENZA

- pre-PCR di sequenza (80-100 ng di DNA)
- mix di purificazione 2,5 µl
- H₂O bidistillata sterile a 5 µl

Mix di purificazione:

- 0,05 µl di *ExoI* (20 U/µl)
- 0,2 µl SAP (1 U/µl)
- 0,4 µl Buffer PCR 10X (con MgCl₂)
- 1 µl MgCl₂ 25 mM

Programma:

- 1h a 37°C
- 20' a 80°C (inattivazione enzima)

c) PCR DI SEQUENZA

- BIG DYE TERMINATOR Buffer 1X
- primer 0,32 µM
- BIG DYE TERMINATOR RR PREMIX
- pre-PCR di sequenza purificata
- Taq DNA polimerasi 0,025 U/µl
- H₂O bidistillata sterile a 10 µl

Condizioni di amplificazione:

denaturazione lunga - 96°C per 1'

25 cicli:

- denaturazione breve - 96°C per 30"
- appaiamento - 50°C per 15"
- allungamento - 60°C per 4'

d) PRECIPITAZIONE DELLA PCR DI SEQUENZA

- 1) Aggiungere 3 μ l di NaAc 3M pH=5 + 57 μ l di EtOH 100% e agitare.
- 2) Tenere in ghiaccio per 15'.
- 3) Centrifugare a 13000 rpm per 15' a 4°C.
- 4) Eliminare il surnatante.
- 5) Aggiungere 200 μ l di EtOH 70% freddo.
- 6) Tenere in ghiaccio per 5'.
- 7) Centrifugare a 13000 rpm per 15' a 4°C.
- 8) Eliminare il surnatante.
- 9) Asciugare per 10' in stufa a 60°C.
- 10) Risospendere in 10 μ l di H₂O mQ calda (60°C).

6.10 POPOLAZIONE STUDIATA

Nella prima parte del nostro studio sono stati analizzati 281 campioni di siero appartenenti a tre diversi gruppi di soggetti (soggetti con CD in fase acuta, controlli malati e controlli sani), con le seguenti caratteristiche:

Celiaci: 102 soggetti (69 femmine e 33 maschi) in fase florida di malattia, diagnosticati tra marzo 2000 e luglio 2005. Ogni paziente è stato sottoposto a biopsia intestinale per la formalizzazione della diagnosi: 2 avevano una lesione di tipo 1, 12 una lesione di tipo 3 a , 40 di tipo 3b e 48 di tipo 3c. 21 dei sieri presi in analisi appartenevano a soggetti adulti (età media 36 anni, intervallo 20 - 53) ed il resto a bambini (età media 7 anni, intervallo 9 mesi – 16 anni). L'età media dell'intero campione è di 13,7 anni (intervallo 9 mesi - 53 anni). Tutti i sieri sono stati conservati a -20°C per un periodo variabile prima dell'esecuzione del test.

Controlli malati. 76 (35 femmine e 41 maschi) pazienti con diverse patologie (38 con morbo di Crohn, 9 con Rettocolite ulcerosa, 3 con Diabete Mellito di tipo 1, 2 con Tiroidite autoimmune, 1 con Esofagite da reflusso, 1 con Gastrite, 1 con Ritardo della crescita, 1 con Febbri Ricorrenti), di età media di 26 anni (intervallo 1-71 anni). I sieri, che sono stati da noi testati senza tenere conto della fase di malattia dei soggetti al momento del prelievo, sono stati conservati a -20°C prima del test.

Controlli sani 103. sieri donatori di sangue apparentemente sani (80 F, 23 M, età media 42, intervallo 18-60 anni) afferenti ai centri immuno-trasfusionali di Trieste ed Udine e tutti negativi per gli anticorpi IgA anti-endomisio.

7 RISULTATI DELLO STUDIO

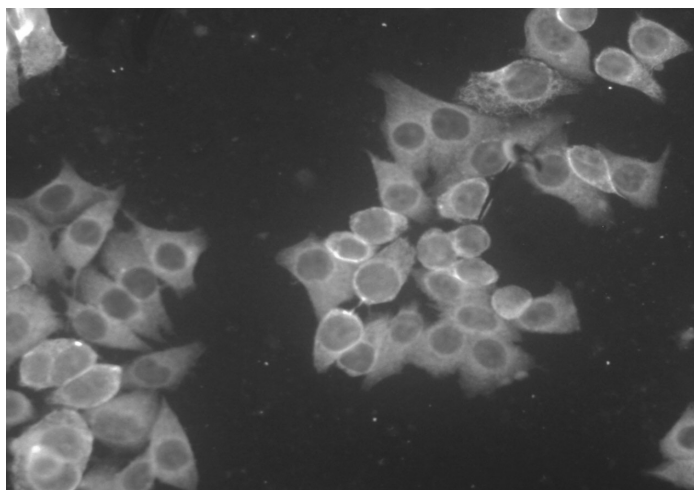
7.1 SENSIBILITA'E SPECIFICITA'DEL TEST

Lo scopo principale della prima parte del lavoro è stato quello di allestire una metodica di “*immunofluorescenza indiretta*” per dosare gli A.A.A. al fine di misurare la loro sensibilità e specificità, indipendentemente dalla durata di conservazione dei campioni, e .confermare la correlazione tra la severità della lesione intestinale e la prevalenza degli A.A.A. La ricerca di questi ultimi è risultata positiva in 49/102 (48%) sieri non trattati di celiaci; risultato di gran lunga differente da quanto invece riscontrato nei trattamenti mediante EDTA da un lato e riscaldamento dall'altro, i quali hanno dato prova di esiti positivi , rispettivamente, di 78/102 (76,5)e 84/102 (82,4) campioni.

Dall'analisi dei risultati, dunque, emerge che il pre-trattamento del siero,-sia mediante il riscaldamento sia con aggiunta di 'EDTA- facilita notevolmente l'osservazione al microscopio e rende il test più sensibile. Questo dato si spiega con l'esistenza di un fattore sierico, la Gelsolina, depolimerizzante l'Actina, che lega, se non inibita (dal calore e dal calcio chelante), i siti di legame degli AAA sul microfilamento dando una falsa positività.del test.

Tra i sieri dei soggetti sani, sono risultati negativi al test: 88/103 (85,4%) campioni che non hanno subito alcun trattamento, 89/103 (86,4%) degli stessi a cui è stato aggiunto EDTA e 78/103 (75,7%) se i sieri sono stati riscaldati prima dell'esame.

1



2

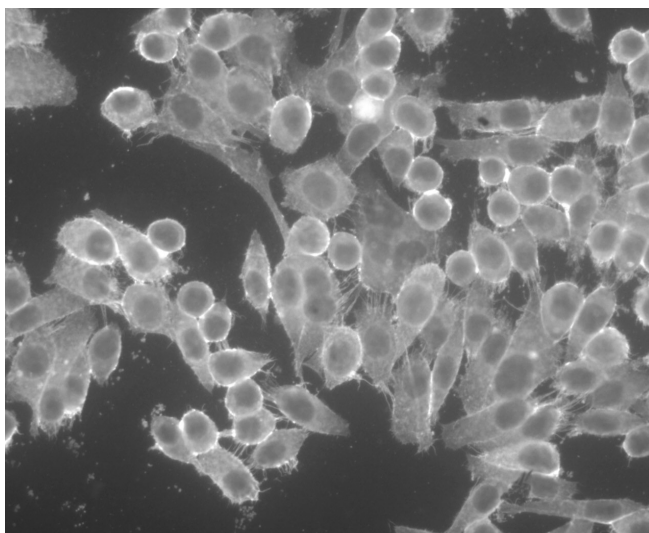
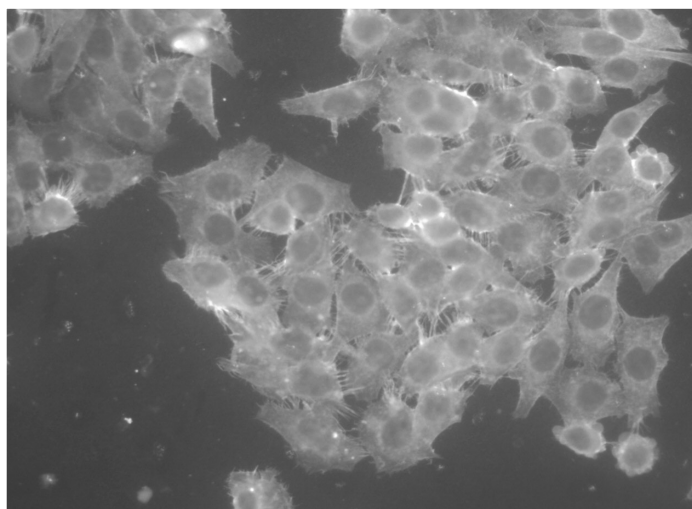


FIGURA 11—*le 3 foto (x40) illustrano la reattività di un siero di celiaco (con lesione istologica 3b): 1 siero diluito 1/5 in PBST; 2 siero diluito 1/5 in PBST e riscaldato per 45'a 56 °C; 3 siero diluito 1/5 in PBST con EDTA 0.1mM. La positività del test è evidente nei fotogrammi 2 e 3, mentre risulta essere poco visibile nella foto 1. Il pretrattamento del siero con il riscaldamento o con l'EDTA facilita notevolmente l'osservazione al microscopio e rende il test più sensibile.*

3



Nella ricerca degli AAA, tra i sieri di soggetti affetti da altre patologie, 62/76 (81,6%) trattati mediante la sola diluizione con PBS non ne hanno evidenziato la presenza; laddove gli stessi sieri trattati chimicamente e fisicamente hanno dato esito negativo al test in 54/76 (71%) e 39 (51,3%) dei casi.

Appare evidente come la specificità del test sia stata diversa per le tre metodiche. Infatti essa è risultata uguale a 84% nel caso di sieri non trattati, mentre gli stessi sieri, sottoposti ad aggiunta di EDTA, o soggetti a riscaldamento hanno dato un valore della stessa pari a rispettivamente l'80% ed il 65,4%. [Figura 12]

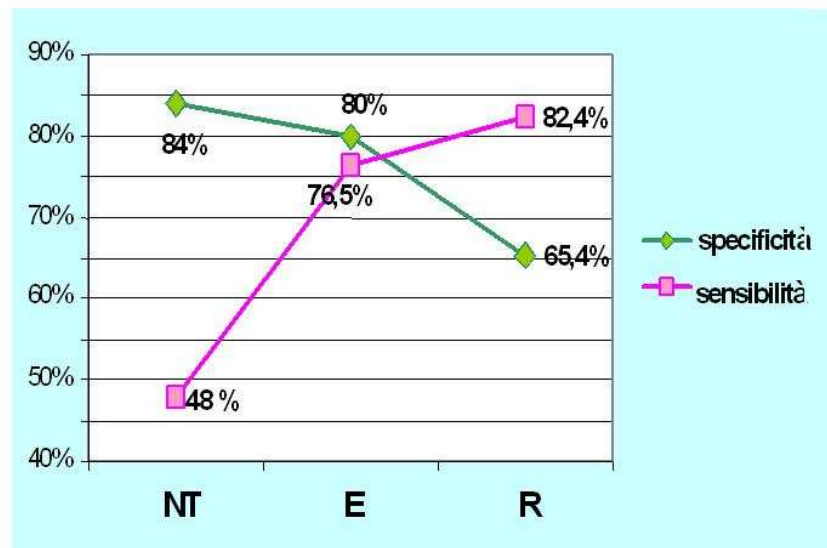


FIGURA 12– sensibilità e specificità del test considerate per i tre diversi trattamenti: NT= non trattato; E= siero con EDTA alla diluizione e R= che il siero riscaldato.

I dati sin qui esposti sono riportati nella tabella sottostante, dove a seconda del tipo di trattamento e del gruppo di soggetti preso in esame, è stato riportato il numero di campioni risultato positivo al test [Tabella 4].

TRATTAMENTO SIERI	Pazienti celiaci 102	Controlli malati 52	Controlli sani 103
NT	49 (48)	14 (18,4)	15 (14,6)
R	84 (82,4)	37 (48,7)	25 (24,3)
E	78 (76,5)	22 (29)	14 (13,5)

TABELLA 4– *soggetti positivi (%) al test:*

NT=non trattato; R=siero riscaldato per 40' a 56°C.;E=siero trattato con EDTA mM 0,1 ;

Tra il gruppo di campioni dei soggetti con differenti patologie si riscontra una prevalenza di sieri ,positivi alla presenza degli AAA sensibilmente maggiore rispetto a quella riscontrata tra i soggetti sani; in particolare soprattutto tra i pazienti affetti dalla patologia del Morbo di Chron e Rettocolite Ulcerosa ,[Tabella 5].

TRATTAMENTO SIERI	Morbo di Crhon (tot. 38)	Rettocolite Ulcerosa (tot.9)	Esofagite da reflusso (tot.1)	Febbri ricorrenti (tot.1)	Diabete tipo1 (tot.3)
NT	12 (32,4)	1 (11,1)	0	0	1
E	13 (37)	3 (33,3)	1	1	0
R	17 (46)	3 (33,3)	1	1	1

TABELLA 5– *sieri positivi al test (%), prendendo in considerazione i tre trattamenti e le diverse patologie.*

7.2 CORRELAZIONE CON LA SEVERITA' DELLA LESIONE INTESTINALE

Si è rilevata una forte correlazione tra la severità della lesione intestinale e la prevalenza degli anticorpi AAA.

a) Trattamento fisico: *Riscaldamento*.

Mediante la metodica del riscaldamento dei sieri presi in esame è stato raggiunto un valore di casi positivi pari a 44/48 (91,7%) soggetti con lesione di tipo 3c, 31/40 (77,5%) casi presentanti lesione di tipo 3b e il 8/12 (66,7%) pazienti con lesione di tipo 3a. Il trend di crescita è risultato statisticamente significativo ($p=0,039$).

b) Trattamento chimico: *EDTA (Acido etilendiaminotetracetato)*

Aggiungendo agli stessi sieri il calcio chelante si sono potuti riscontrare esiti positivi con i seguenti valori: 43/48 (89,6%) sieri di soggetti con lesione di tipo 3c, 27/40 (65,7%) sieri di soggetti con lesione 3b e 6/12 (50%) quelli con lesione 3 a. Anche in questo caso il trend di crescita è risultato statisticamente significativo ($p=0,001$).

Quando gli stessi campioni non sono stati sottoposti a precedente trattamento chimico o fisico i risultati sono stati i seguenti: 22/48 (45,8%) positivi alla ricerca degli AAA tra i sieri di soggetti con lesione più severa, 19/40 (47,6%) tra i soggetti celiaci con lesione di tipo 3b e 4/12 (33,3%) invece tra i pazienti con lesione di tipo 3 a.

Sono stati analizzati solo due sieri di soggetti con lesione di tipo 1 e uno di questi è risultato positivo per ogni metodica di trattamento dei sieri utilizzata.[Tabella6;Figura 3.]

TRATTAMENTO SIERI	Lesione 3 a (tot.12)	Lesione 3b (tot. 40)	Lesione 3c (tot. 48)
NT	4 (33,3)	19 (47,5)	22 (45,8)
R	8 (66,7)	31 (77,5)	44 (91,7)
E	6 (50)	27 (67,5)	43 (89,6)

TABELLA 6–sieri di soggetti celiaci positivi (%) per i diversi trattamenti e per tipo di lesione

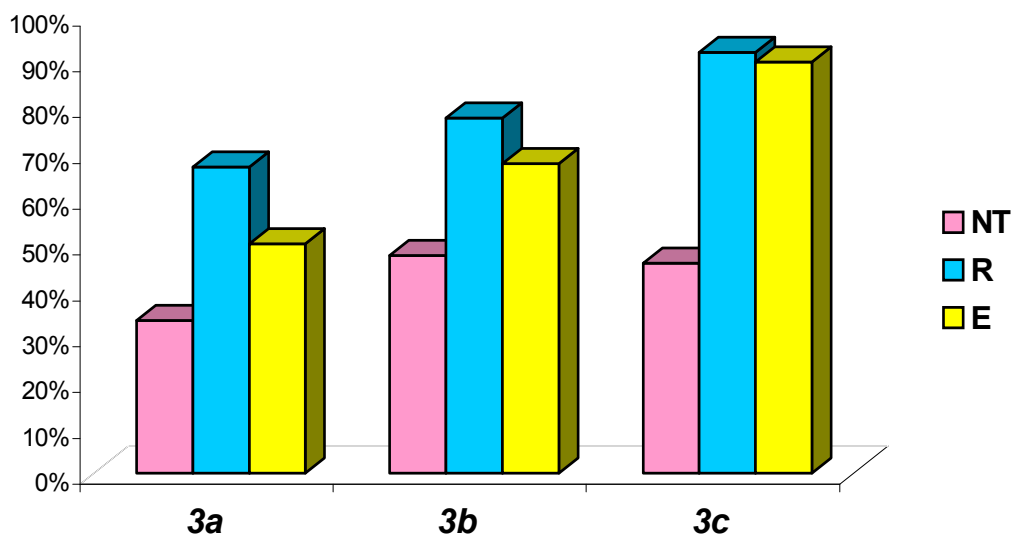


FIGURA 13— *sensibilità della ricerca degli AAA in base alla metodica utilizzata e alla severità della lesione intestinale.*

7.3 VALORE PREDITTIVO POSITIVO (VPP) E VALORE PREDITTIVO NEGATIVO(VPN)

Dall'analisi dei dati emerge che il test ha un VPP maggiore se i sieri prima dell'analisi vengono trattati con EDTA (68,4%), mentre il VPN risulta essere più elevato se i sieri sono stati trattati fisicamente prima dell'analisi (86,7%) e di poco minore (85,6%) se agli stessi è stato aggiunto EDTA. I valori di VPP e VPN per ciascuna metodica sono riportati nella tabella sottostante [Tabella 7].

TRATTAMENTO SIERI	VPP	VPN
NT	62,8%	74%
E	68,4%	85,6%
R	56%	86,7%

TABELLA 7— *VPP e VPN in base al trattamento del siero.*

7.4 CONFRONTO DELLA LETTURA TRA PIÙ OPERATORI

.In seguito alla lettura dei vetrini presi in esame – avvenuta in modo indipendentemente e in cieco-gli operatori hanno avuto modo di riscontrare valori di risultato divergenti causati dalla particolare variabilità d'interpretazione d'operatore a cui il test è soggetto.

Si è perciò ritenuto opportuno valutare questa discrepanza d'interpretazione considerando in particolare un campione di 88 sieri provenienti da controlli sani e 81 sieri di pazienti celiaci per valutare la bontà del test allestito in base alla riproducibilità dei risultati.

È stato calcolato il valore di *kappa* come stima di *agreement* per le tre metodiche di trattamento dei sieri che è risultato essere: 0,59 per il siero semplicemente diluito, 0,61 per il pretrattamento fisico e 0,64 per quello chimico. [Tabella8]:

TRATTAMENTO DEI SIERI	Kappa	Forza di agreement <i>Landis-Koch</i>	Riproducibilità <i>Fleiss</i>
NT	0,59	Moderata	Buona
R	0,61	Sostanziale	Buona
E	0,64	Sostanziale	Buona

TABELLA 8– *riproducibilità del test*

7.5 VERIFICA DEL RUOLO DELLA GELSOLINA SIERICA

Per comprendere meglio quale fosse e come agisse il fattore legante l'Actina presente nel siero, sono state fatte numerose prove d'inibizione utilizzando un anticorpo monoclonale anti Gelsolina (anticorpo che sequestra la Gelsolina sierica permettendo il legame dell'anticorpo all'Actina).

Da queste è emerso che in assenza di anticorpi anti Gelsolina il test era negativo mentre quando il pool veniva incubato con questo anticorpo (alle diluizioni di 1:40, 1:20, 1:10, 1:5) il test risultava positivo in modo direttamente proporzionale alla loro concentrazione. Inoltre è stato osservato che il test diventava positivo dopo incubazione dei sieri con dosi crescenti (5-10-15-20 $\mu\text{g/ml}$) di Actina monometrica. Da tali dati ne consegue che questa proteina, sequestrando i fattori leganti l'Actina, abolisce l'attività inibitoria dei sieri.

7.6 TESTARE LA POSITIVITA' DEGLI AAA IN UN GRUPPO DI PROBANDI CON CARDIOMIOPATIA DILATATIVA E NEI LORO PARENTI DI PRIMO GRADO

La positività agli A.A.A., è stata valutata anche in 64 soggetti con Cardiomiopatia Dilatativa Idiopatica e in 84 parenti di primo grado dei probandi, mediante il test di *immunofluorescenza indiretta*.

Il 58 % dei pazienti e il 21.5 % dei parenti è risultato positivo agli A.A.A.

Ad un' attenta analisi si è notato che la positività si distribuiva all'interno di molti nuclei familiari (come si può vedere nei 3 esempi sotto riportati. [Figura 14]. Questo ci ha fatto pensare che gli anticorpi anti-Actina potessero costituire un potenziale fattore patogenetico in queste famiglie.

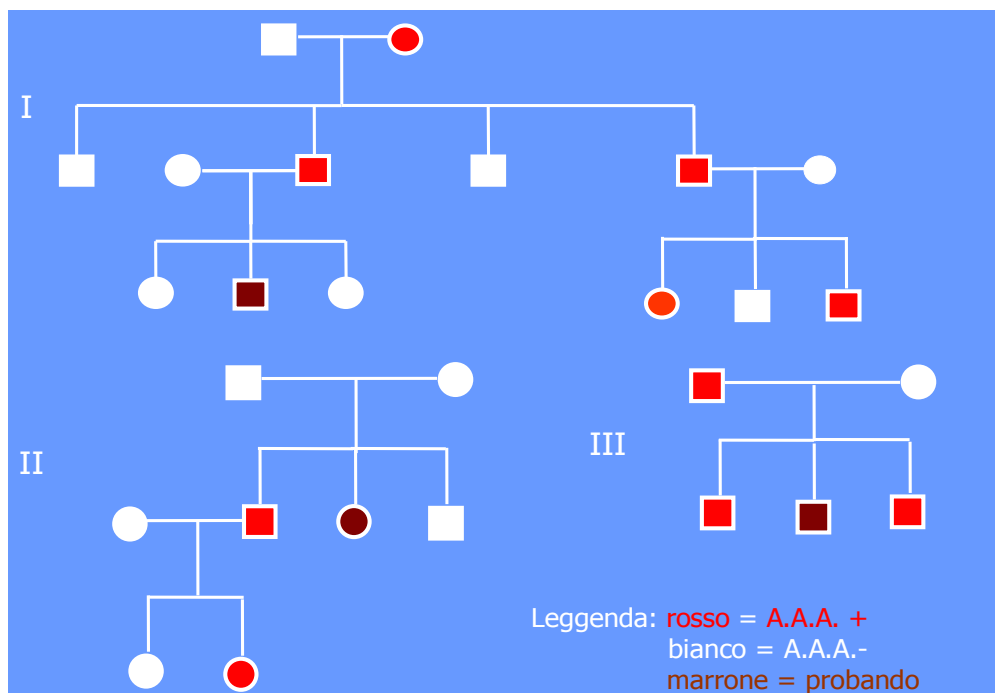


FIGURA 14– CMPD, familiarità ,autoimmunità' '

7.7 CONFRONTARE GLI AAA CON GLI ANTICORPI ANTI Ttg DIAGNOSI DI MALATTIA CELIACA

Tutti i sieri dei pazienti celiaci testati con la metodica immunoenzimatica utilizzata di *routine* sono risultati positivi per gli anticorpi anti tTG mentre i donatori sani ed i controlli malati sono risultati negativi.

La concentrazione degli anticorpi anti tTG nel siero dei pazienti con lesione intestinale 3c o 3b era significativamente più alta rispetto a quelli con un indice *Marsch* tipo 3a ma tra i celiaci con mucosa intestinale di tipo 3b e 3c la differenza non era statisticamente significativa [Figura 15]

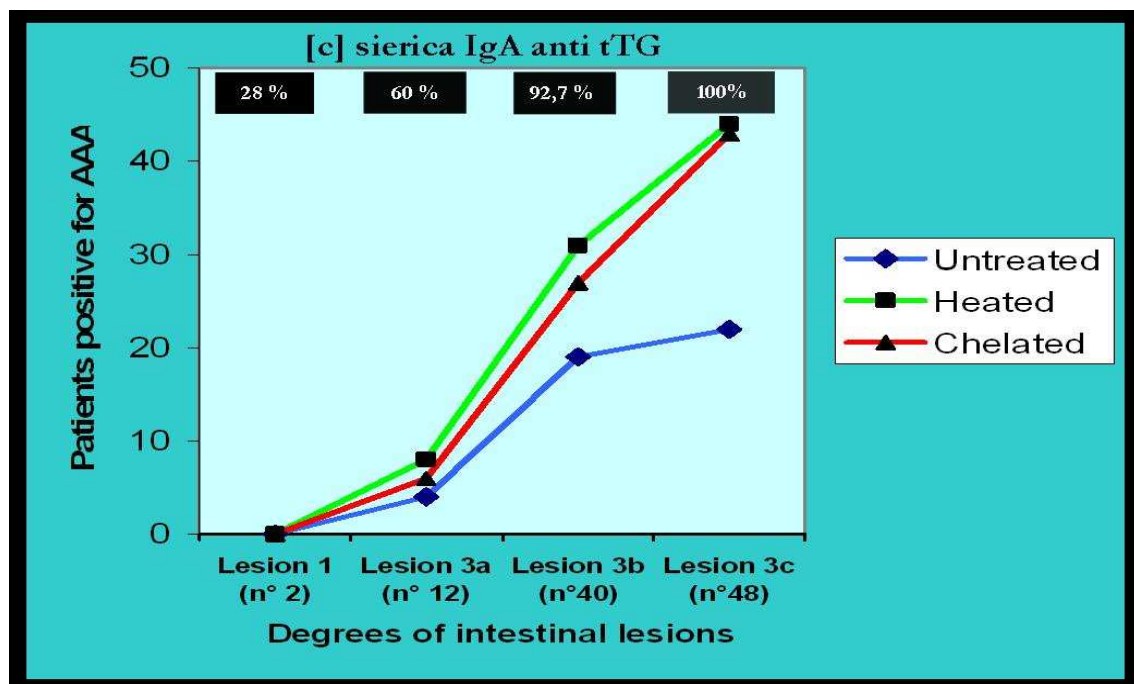


FIGURA 15—confronto tra gli anticorpi anti Actina e gli anti tTg nella correlazione con la lesione Intestinale

7.8 SELEZIONI DI LIBRERIE ANTICORPALI TOTALI DI MUCOSA INTESTINALE CON *ACTINA G* E *tTG*

Le librerie totali che si ottengono con la tecnica del *Phage Display* rappresentano l'intero repertorio anticorpale di un individuo. Nel nostro studio sono state utilizzate due diverse librerie anticorpali: una proveniente da una biopsia di mucosa intestinale di una paziente celiaca gravata da una Cardiomiopatia Dilatativa Idiopatica (con lesione intestinale grave e con elevato titolo di anticorpi anti Actina sierici) e una derivante da un soggetto sano di controllo. Le librerie sono state selezionate per identificare gli anticorpi contro due diversi antigeni: l'Actina umana monometrica (*G Actina.*) e la Transglutaminasi tessutale umana (h-tTG). Per entrambe sono stati effettuati 3 diversi cicli di selezione a partire da un mix delle librerie "VH+ Vk" e "VH+Vλ" come da protocollo[paragrafo 6.9] Nella paziente sono stati isolati 80 cloni anti-tTG positivi e 35 anti-Actina positivi su 96 mentre nel controllo sano sono stati isolati rispettivamente 4 e 6 cloni positivi su 96.

Dopo ciascun out put la diversità anticorpale è stata valutata mediante *fingerprinting* amplificando, separatamente le regioni VH e VL di 10 cloni positivi scelti a caso. I prodotti di PCR sono stati digeriti con opportuni enzimi di restrizione (*BstNI* per le VH. e per le VL) ed il pattern di bande è stato valutato dopo elettroforesi su gel di agarosio. E' stata valutata una buona diversità anticorpale per entrambe le catene.

Tutti i cloni positivi sono stati riconfermati separatamente.

La conferma della positività dei cloni è stata eseguita in un saggio ELISA. Tutti i cloni risultati positivi sono stati riconfermati con lo stesso test e poi sottoposti a *fingerprinting* per le catene VH e VL per valutare nuovamente se si trattava di anticorpi diversi o dello stesso sovraespresso.

Si è voluto dare riprova di questa positività con la metodica d' immunofluorescenza indiretta; i scFv resi in forma solubile e concentrati circa 200 volte, sono stati testati su vetrini attivati con cellule *Hep-2b* .In seguito, quando esaminati al microscopio a fluorescenza questi ripresentavano lo stesso disegno strutturale(a raggiera) tipico dell' Actina filamentosa da noi precedentemente osservato con i sieri di pazienti celiaci

Questi cloni sono stati poi utilizzati come controllo positivo nella metodica *d'immunofluorescenza indiretta*

tTG				
Soggetto	Fonte libreria	Cicli selezione	Cloni testati	Cloni positivi
malato	IBL	3	96	80
sano	IBL	3	96	4

TABELLA 9—risultati delle selezioni in *ELISA* su *tTG* ricombinante delle librerie totali da intestino (IBL) di un paziente con CD e cardiomiopatia

Actina G				
Soggetto	Fonte libreria	Cicli selezione	Cloni testati	Cloni positivi
malato	IBL	3	96	35
sano	IBL	3	96	5

TABELLA 10—risultati delle selezioni in *ELISA* su *Actina G* di una libreria totali da intestino (IBL) di un paziente con CD e cardiomiopatia

20 dei 35 scFvs sono stati sequenziati. Le sequenze sono state analizzate utilizzando il database V-BASE Sequence Directory Tomlison et al, MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK (<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/DNAPLOT.php?menu=901>).

CLONE	VH	Gene V	Score	CDR3
B5	VH 1	DP-14/V1-18+	1173	GLGYCAGGCQVPYYALDV
B7	VH1	DP-14/V1-18+	1173	GLGYCAGGCQVPYYALDV
E8	VH1	2M27/11M27...	1110	EEVRPTGDSYTTGLDV
C10	VH1	DP-14/V1-18	1164	GLGYCAGGCQVPYYALDV
H8	VH1	DP-14/V1-18	1173	GLGYCAGGCQVPYYALDV
C8	VH1	2M27/11M27	1092	EEVRPTGDSYTTGLDV
H10	VH5	VHVCW/COS-24	1263	HSDSYGSYYFDY
H9	VH3	COS-6/DA-8	1281	DLRRSDY
A5	VH6	DP-74/VH-VI	1236	GAPLCAL
B8	VH1	2M27/11M27	1110	EEVRPTGDSSCLV
H11	VH1	DP-14/V1-18	1173	GLGYCAGGCQVPYYALDV
A9	VH5	VHVCW/COS-24+	1254	HSDSYGSYYFDY
H2	VH1	DP-14/V1-18+	1128	GLGYCAGGCQVPYYALDV
H5	VH1	DP-14/V1-18+	1146	GLGYCDGGCQVPYSALDV
C9	VH2	S12-10	1233	TGCSGDCSYYSYYGLDV
E10	VH3	DP-35/V3-11...	1236	GRVSGWLFPDY
A3	VH3	DP-47/V3-23..	1182	LTSKYYHRMDV
A6	VH6	DP-74/VH-VI...	628	GSYRNTWVW
B11	VH3	V3-48/hv3d1	1218	DVHYGFDL
F9	VH1	DP-7/21-2...+	1263	DVDGSGSFSPHSSYKYRMDV
H7	VH4	VIV-4/4.35+	1239	YNWNDAPDGYDI

TABELLA 11– risultati delle sequenze dei scFvs anti-Actina G ottenuti da una-libreria intestinale E' indicato il nome del clone della famiglia della VH , il nome del segmento genico e la sequenza amminoacidica del CDR3 (Complementary Determining Region 3)

La maggior parte (11/21) dei scFvs isolati dal soggetto celiaco appartengono alla famiglia VH1:

- 7 appartengono al segmento genico DP-14/V1-18+ e mostrano lo stesso CDR3
- 3 appartengono al segmento genico 2M27/11M27; di questi 2 condividono il medesimo CDR3 mentre 1 ha il CDR3 differente
- 1 appartiene al segmento DP-7/21-2...+

Compaiono inoltre 4 scFvs della famiglia VH3, 2 della VH6, 1 della VH2 e 2 della VH5.

8 DISCUSSIONE TECNICA

Questo studio dimostra che gli AAA correlano fortemente con la severità della lesione stinale. Infatti, gli AAA non sembrano essere presenti nelle prime fasi della malattia e pare che il loro ruolo nella patogenesi della malattia celiaco sia più tardivo e correlato a necrosi ed apoptosi degli enterociti, quando il danno all'epitelio intestinale è già diventato macroscopico. Circa nell' 80% di casi, secondo questo lavoro, il significato degli AAA è diverso da quello degli anti-tTG: la loro positività indicherebbe che la mucosa è già stata danneggiata.

Si è riscontrato che il trattamento fisico (riscaldamento a 56°C per 45') e quello chimico (aggiunta di EDTA 0,1mM) aumentano di molto la sensibilità del test. Questo sarebbe spiegabile con la presenza di una proteina sierica, la Gelsolina appartenenti alla famiglia delle *Actin Binding Proteins* che lega l' Actina e interferisce con il legame tra la proteina e il suo anticorpo specifico..

In particolare, il riscaldamento dei sieri risulta essere la metodica che rileva il maggior numero di soggetti positivi.

Questo però a scapito di una minor specificità. Infatti rispetto agli studi precedenti, che davano una specificità molto prossima al 100%, questo studio ne ha riportata una assai minore risultante, considerando la metodica che offre una maggiore sensibilità, del 76% se si prendono in considerazione i controlli sani e del 65,4% prendendo in considerazione anche i controlli malati. Questo è il motivo principale per cui gli anticorpi anti Actina non possono assolutamente sostituire la biopsia intestinale che rimane tutt'oggi e il gold standard nella diagnosi di celiachia.

Un altro importante problema è che la metodica ad immunofluorescenza è fortemente operatore dipendente ed è assai poco riproducibile, come dimostra il confronto delle letture di tre diversi operatori. A questo proposito sarebbe utile organizzare una rete di laboratori per la standardizzazione e i controlli di qualità della ricerca degli AAA. È stato proposto, in diversi lavori precedenti il test ELISA, che utilizzata come substrato l'Actina monometrica, o la sua forma filamentosa ma la sensibilità delle due metodiche è risultata alquanto bassa e differente con un range dal 80 % al 87%.

Il dosaggio delle tTG, invece, attraverso la metodica ELISA classica e routinaria, che raggiunge una specificità e sensibilità prossima al 100% e che è anche in grado di

distinguere le lesioni intestinali gravi (tipo 3b e 3c) da quelle più lievi (3a e 2) rimane ancora il test di gran lunga più efficace e valido per la conferma della diagnosi di celiachia. Se si considerano questi anticorpi come epifenomeno di un danno d'organo, risulta più facile comprendere la prevalenza, pari al 48,7%, degli AAA tra i soggetti affetti da altre patologie con danno d'organo, che è superiore all'atteso se si considera quella rilevata tra i soggetti sani. Come tutti gli studi precedenti sono concordi nell'affermare, questi anticorpi svaniscono in un tempo di circa cinque mesi, dall'inizio della dieta senza glutine. Si potrebbe analogamente pensare, almeno per i soggetti affetti da malattie quali il morbo di Crohn, che questi anticorpi siano presenti nel siero dei soggetti in fase acuta di malattia. In questo lavoro sono stati testati sieri di soggetti affetti da questo tipo di patologia indipendentemente dalla fase della malattia stessa. Potrebbe forse essere un'elevata "up regulation" di cellule epiteliali in apoptosi che rende l'Actina immunogenica attraverso la sua esposizione sulla superficie della cellula e quindi genera una risposta immunitaria anomala; questo meccanismo è già stato osservato nel Lupus Eritematosus Sistemico, patologia in cui lo smascheramento di antigeni intracellulari sulla superficie delle cellule apoptotiche induce la produzione di autoanticorpi.

Nei pazienti celiaci in dieta libera la determinazione degli anticorpi anti Actina è stata sempre trovata associata all'atrofia severa dei villi intestinali glutine dipendente; la produzione di autoanticorpi può dipendere dalla generazione di neoepitopi prodotti dalla reazione di cross linking della tTG come l'Actina che infatti è un buon substrato per la Transglutaminasi tissutale con self antigeni criptici nel tratto gastrointestinale.

Lo screening di una libreria totale di paziente celiaco ha permesso di identificare scFv anti Actina che producono un pattern d'immunofluorescenza del tutto identico a quello dei sieri AAA positivi trattati. Questo dimostra che gli anticorpi selezionati da librerie totali sono gli stessi di quelli presenti nel siero dei pazienti celiaci e che il trattamento chimico e fisico non altera il sito di legame antigenico ma va a inibire esclusivamente la Gelsolina sierica che altrimenti maschera il sito di legame dell'antigene all'anticorpo rendendo il test poco sensibile.

In conclusione da questo studio si evince che il trattamento chimico-fisico dei sieri migliora la sensibilità a scapito di una ridotta specificità ma anche che questo nuovo test ha poco da offrire per lo screening diagnostico della celiachia soprattutto se comparato alla

metodica classica e routinaria che ricerca gli anticorpi anti Transglutamminasi tissutale in termini di sensibilità ,specificità e correlazione con il danno della mucosa intestinale

Gli anticorpi anti Actina anche se sicuramente nel prossimo futuro non avranno un ruolo cardine nella diagnosi di malattia celiaca possono tuttavia essere considerati importanti per accertare la patogenesi autoimmune della cardiomiopatia dilatativa idiopatica. La patologia ha un'eziopatogenesi per lo più sconosciuta; probabilmente si tratta di una condizione a patogenesi eterogenea tuttavia in un sottoinsieme di soggetti la Cardiomiopatia Dilatativa Idiopatica potrebbe rappresentare una malattia autoimmune organo specifica in cui il processo distruttivo è ristretto all' organo bersaglio e gli autoanticorpi riconoscono e reagiscono con lo specifico antigene. Gli anticorpi anti Actina assieme ad altri anticorpi specifici per il miocardio sono sempre stati considerati come un' epifenomeno dell' infiammazione tissutale nella sua fase acuta, mentre non è stato dimostrato un ruolo patogenetico nella progressione della cardiomiopatia. Da questo lavoro emerge che pazienti affetti da Cardiomiopatia Dilatativa Idiopatica e i loro familiari, presentano autoanticorpi diretti verso i filamenti di Actina; Il dato originale che appare evidente da ciò è che la positività agli AAA non è casuale ma, ad una attenta analisi, raggruppata per famiglie; si può quindi ipotizzare che gli anticorpi anti-Actina siano un potenziale fattore patogenetico. Nel prossimo futuro saranno necessari studi prospettici per l' identificazione dei meccanismi patogenetici alla base di questa associazione, adatti a valutare quanto la precoce presenza di questi anticorpi anti Actina tra i familiari di soggetti con Cardiomiopatia Dilatativa Idiopatica possa modificare la storia naturale di questa patologia gravata da una severa prognosi.

La disponibilità di questi cloni anti Actina selezionati da una libreria totale di mucosa intestinale di celiaco ci potrà far comprendere meglio il ruolo di questi autoanticorpi nella patogenesi del danno intestinale della malattia celiaca.

(Fabbro E et al, ***“Uselessness of anti-actin antibody in celiac disease screening”*** *Clinica Chimica Acta* 390; 2008 134–137)

BIBLIOGRAFIA

1. Gee S. **On the coeliac affection**. St. Bartholomew Hosp Rep 1888;24:17-20.
2. Dicke WK, Weijer HA, Van de Kamer JH. **Celiac disease. II. The presence in wheat of the factor having a deleterious effect in cases of celiac disease**. Acta Paediatr 1953;42:34-42.
3. Van de Kamer JH, Weijer HA, Dicke WK. **Celiac disease. IV. An investigation into the injurious constituents of wheat in connection with their action on patients with celiac disease**. Acta Paediatr 1953;42:223-231.
4. Sollid LM, McAdam SN, Molberg O, Queasten H, Arentz-Hansen H, Louka AS, Lundin KEA. **Genes and environment in celiac disease**. Acta Odontol Scand 2001;59:183-186.
5. Murray JA. **The widening spectrum of celiac disease**. Am J Clin Nutr 1999;69:354-365.
6. Greco L, Maki M, Di Donato F, Visakorpi JK. **Epidemiology of coeliac disease in Europe and in the Mediterranean area in “Common food intolerances 1: epidemiology of coeliac disease”**. Auricchio S e Visakorpi JK in “Dynamic Nutrition Research”, Karger, Basel, vol. 2, pp. 25-44, 1992.
7. Greco L. **From the Neolithic revolution to gluten intolerance: benefits and problems** 1997;24:S14-S16
8. Maki M, Collin P. **Coeliac disease**. Lancet 1997;349:200-203.
9. Picarelli A, Sabbatella L, Di Tola M, Anania MC. 2001 **Odyssey in celiac disease**. Gastroenterol Internat 2000;13:154-158.
10. Fasano A, Catassi C. **Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum**. Gastroenterology 2001;120:636-651.
11. Ciclitira PJ. **AGA technical review on celiac sprue**. Gastroenterology 2001;120:1526-1540.
12. De Block CEM, De Leeuw IH, Vertommen JJF, Rooman RPA, Du Caju MVL, Van Campenhout CM, Weyler JJ, Winnock F, Van Autreve J, Gorus FK. **Beta-cell, thyroid, gastric, adrenal and coeliac autoimmunity and HLA-DQ types in type I diabetes**. Clin Exp Immunol 2001;126:236-241.
13. Not T, Tommasini A, Tonini G, Buratti E, Pocecco M, Tortul C, Valussi M, Crichiutti G, Berti I, Trevisiol C, Azzoni E, Neri E, Torre G, Martelossi S, Soban M, Lenhardt A, Cattin L, Ventura A. **Undiagnosed coeliac disease and risk of autoimmune disorders in subjects with type I diabetes mellitus**. Diabetologia 2001;44:151-155.
14. Valentino R, Savastano S, Tommaselli AP, Dorato M, Scarpitta MT, Gigante M, Micillo M, Paparo F, Petrone E, Lombardi G, Troncone R. **Prevalence of coeliac disease in patients with thyroid autoimmunity**. Horm Res 1999;51:124-27.
15. Hadjivassilou M, Gibson A, Davies-Jones GA, Lobo AJ, Stephenson TJ, **Associated with the cultivation of wheat**. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1997;24:S14-S16
16. Ventura A, Magazzù G, Greco L **For the SIGEP Study Group for autoimmune disorders in celiac disease. Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease**. Gastroenterology 1999;117:297-303.

17. Kristiansen OP, Larsen ZM, Pociot F. **CTLA-4 in autoimmune diseases: a general susceptibility gene to autoimmunity?** *Genes Immun* 2000;1:170-184.
18. Wucherpfennig KW. **Insight into autoimmunity gained from structural analysis of MHC-peptide complexes.** *Curr Opin Immunol* 2001;13:650-656.
19. Catassi C, Ratsch IM, Fabiani E, Rossin M, Bordicchia F, Candela F, Coppa GV, Giorgi PL. **Coeliac disease in the year 2000, exploring the iceberg.** *Lancet* 1994;343:200-203.
20. Davidson LSP, Fountain JR. **Incidence of sprue syndrome with some observations on the natural history.** *BMJ* 1950;1:1157-1161.
21. Mylotte M, Egan-Mitchell B, McCarthy CF, McNicholl B. **Incidence of celiac disease in the West of Ireland.** *BMJ* 1973;1:703-705.
22. Logan RFA, Rifking EA, Busuttil A, Gilmours HM, Ferguson A. **Prevalence and incidence of celiac disease in Edinburgh and the Lothian region of Scotland.** *Gastroenterology* 1986;90:334- 342.
23. Van Stirum J, Baerlocker K, Fanconi A, Gugler E, Shmerling DH. **The incidence of celiac disease in children in Switzerland.** *Helv Pediatr Acta* 1982;37:421-430.
24. Catassi C, Fabiani E, Ratsch IM, Coppa GV, Giorgi PL, Pierdomenico R. **The coeliac iceberg in Italy. A multicentre antigliadin antibodies screening for coeliac disease in school-age subjects.** *Acta Paediatr Suppl* 1996;412:29-35.
25. Talley NJ, Valdovinos M, Petterson TM, Carpenter HA, Melton L Jr. **Epidemiology of celiac sprue: a community-based study.** *Am J Gastroenterol* 1994;89:843-846 59
26. Kolho KL, Farkkila MA, Savilahti E. **Undiagnosed celiac disease is common in Finnish adults.** *Scand J Gastroenterology* 1998;33:1280-1283.
27. Not T, Horvath K, Hill D, Partanen J, Hammed A, Magazzu G, Fasano A. **Celiac disease risk in the USA: high prevalence of antiendomysium antibodies in healthy blood donors.** *Scand J Gastroenterol* 1998;33:494-498.
28. Farrell RJ, Kelly CP. **Diagnosis of celiac sprue.** *Am J Gastroenterol* 2001;96:3237-3246.
29. Logan RFA. **Problems and pitfalls in epidemiological studies of celiac disease.** *Din Nutr Res* 1992;2:14-24.
30. Walker-Smith JA, Guandalini S, Schmitz J, Schmerling DM, Visakorpi JK. **Revised criteria for diagnosis of coeliac disease.** *Arch Dis Child* 1990;65:909-911.
31. Corrao G, Corazza GR, Andreani ML, Torchio P, Valentini RA, Galatola G, Quaglino D, Gasbarrini G, Di Orio F. **Serological screening of celiac disease: choosing the optimal procedure according to various prevalence values.** *Gut* 1994;35:771-775.
32. Bottaro G, Volta U, Spina M, Rotolo N, Sciacca A, Musumeci S. **Antibody pattern in childhood celiac disease.** *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997;24:559-562.
33. Picarelli A, Triglione P, Mariani P, Di Giovambattista F, Greco M, Gurnari M, Paoluzi P, Bonamico M, Ballati G. **Use of a threshold serum level of anti-gliadin antibodies improves diagnostic efficiency of the test in adult coeliac disease but is unreliable as a screening test.** *Ital J Gastroenterol* 1996;28:70-75.

- 34 . Ferreira M, Lloyd Davies S, Butler M, Scott D, Clark M, Kumar P. **Endomysial antibody: is it the best screening test for celiac disease?** Gut 1992;33:1633-1637.
35. Karpati S, Stolz, Meurer M, Krieg T, Braun-Falco O. **Extracellular binding sites of IgA antijejunal antibodies on normal small bowel detected by immunoelectronmicroscopy.** J Invest Dermatol 1991;96:228-233. 36.
- 36 Karpati S, Burgin-Wolff A, Krieg T, Meurer M, Stolz W, Braun-Falco O. **Binding to human jejunum of serum IgA antibody from children with celiac disease.** Lancet 1990;336:1335-1338.
37. Lock J, Gilmour JEM, Unsworth DJ. **Anti-tissue transglutaminase, anti-endomysium and anti-R1-reticulin autoantibodies- the antibody trinity of coeliac disease.** Clin Exp Immunol 1999;116:258-262.
38. Rostami K, Kerckhaert JP, Tiemessen R, Meijer JW, Mulder CJ. **The relationship between antiendomysium antibodies and villous atrophy in coeliac disease using both monkey and human substrate.** Eur J Gastroenterol Hep-2atol 1999;11:439-442.
39. Cataldo F, Lio D, Marino V, Picarelli, Ventura A, Corazza GR. **IgG(1) antiendomysium and IgG antitissue transglutaminase (anti-tTG) antibodies in coeliac disease patients with selective IgA deficiency.** Working Groups on Celiac Disease of SIGEP and Club del Tenue. Gut 2000;47:366-369.
- 40 . Picarelli A, Sabbatella L, Di Tola M, Gabrielli F, Greco R, Di Cello T, Mastracchio A, Anania MC. **Celiac disease diagnosis in misdiagnosed children.** Pediatr Res 2000;48:590-592.
41. Picarelli A, Di Tola M, Sabbatella L, Mastracchio A, Trecca A, Gabrielli F, Di Cello T, Anania MC, Torsoli A. **Identification of a new coeliac disease subgroup: antiendomysial and antitransglutaminase antibodies of IgG class in the absence of selective IgA deficiency.** J Intern Med 2001;249:181-188.
42. Valdimarsson T, Frazen L, Grodzinsky E, Skogh T, Strom M. **Is small bowel biopsy necessary in adults with suspected coeliac disease and IgA antiendomysial antibodies?** Dig Dis Sci 1996;41:83-87.
43. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, Schuppan D. **Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease.** Nat Med 1997;3:797-801.
44. Dieterich W, Laag E, Shopper H, Volta U, Ferguson A, Gillett H, Riecken EO, Schuppan D. **Autoantibodies to “tissue”-transglutaminase as predictors of celiac disease.** Gastroenterology 1998;115:1317-1321.
- 45 . Sulkanen S, Haltunen T, Laurika K, Kolho KL, Korponay-Szabo IR, Sarnesto A, Savilahti E, Collin P, Maki M. **Tissue transglutaminase antibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease.** Gastroenterology 1998;115:1222-1228.
46. Uhlig HH, Lichtenfeld J, Osman AA, Richter T, Mothes T. **Evidence for existence of coeliac disease autoantigens apart from tissue transglutaminase.** Eur J Gastroenterol Hep-2atol 2000;12:1017-1020.
47. Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H. **The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme fro pathologists.** Eur J Gastroenterol Hep-2atol 1999;11:1185-94.

- 48 . Picarelli A, Maiuri L, Frate A, Greco M, Auricchio S, Londei M. **Production of antiendomysial antibodies after in-vitro gliadin challenge of small intestine biopsy samples from patients with coeliac disease.** Lancet 1996;348:1065-1067.
49. Picarelli A, Di Tola M, Sabbatella L, Anania MC, Di Cello T, Greco R, Silano M, De Vincenzi M. **31-43 amino acid sequence of the alpha-gliadin induces antiendomysial antibody production during in vitro challenge.** Scand J Gastroenterol 1999;34:1099-1102.
- 50 . Picarelli A, Sabbatella L, Di Tola M, Vetrano S, Maffia C, Picchi C, Mastracchio A, Paoluzi P, Anania MC. **Forty-eight hours of biopsy culture improve the sensitivity of the in vitro gliadin challenge in the diagnosis of celiac disease.** Clin Chem 2001;47:1841-1843.
- 51 . Loft DE, Marsh MN, Crowe PT. **Rectal gluten challenge and diagnosis of coeliac disease.** Lancet 1990 ;336:953.
52. Lahteenoja H, Maki M, Viander M, Raiha I, Vilja P, Rantala I, Toivanen A, Syrjanen S. **Local challenge on oral mucosa with an alpha-gliadin related synthetic peptide in patients with celiac disease.** Am J Gastroenterol. 2000;95:2880-7.
53. Lahteenoja H, Maki M, Viander M, Toivanen A, Syrjanen S. **Local challenge of oral mucosa with gliadin in patients with coeliac disease.** Clin Exp Immunol. 2000;120:38-45. ok
- 54 Picarelli A, Maiuri L, Mazzilli MC, Coletta S, Ferrante P, Di Giovambattista F, Greco M, Torsoli A, Auricchio S. Gluten-sensitive disease with mild enteropathy. Gastroenterology 1996;111:608-616.
- 55 Ellis A. **Coeliac disease: previous family studies.** In: McConnell RB, editor. The genetics of coeliac disease. Lancaster: MTP Press, Copenhagen, pp. 197-199, 1981.
- 56 Sollid LM, Thorsby E. **HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis.** Gastroenterology 1993;105:910-922.
- 57 Risch N. **Assessing the role of HLA-linked and unlinked determinants of disease.** Am J Hum Genet 1987;40:1-4
- 58 Petronzelli F, Bonamico M, Ferrante P, Grillo R, Mora B, Mariani P, Apollonio I, Gemme G, Mazzilli MC. **Genetic contribution of the HLA region to the familial clustering of coeliac disease.** Ann Hum Genet 1997;61:307-317.
- 59 Kagnoff MF. **Coeliac disease: genetic, immunological and environmental factors in disease pathogenesis.** Scand J Gastroenterol Suppl 1985;114:45-54.
- 60 Picarelli A, Maiuri L, Mazzilli MC, Coletta S, Ferrante P, Di Giovambattista F, Greco M, Torsoli A, Auricchio S. **Gluten-sensitive disease with mild enteropathy.** Gastroenterology 1996;111:608-616.
- 61 Ellis A. **Coeliac disease: previous family studies.** In: McConnell RB, editor. The genetics of coeliac disease. Lancaster: MTP Press, Copenhagen, pp. 197-199, 1981.
62. Sollid LM, Thorsby E. **HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis.** Gastroenterology 1993;105:910-922.
- 63 Sollid L M **Molecular basis of celiac disease.** *Ann Rev Immunol* 18: 53-81 ,2000
- 64 Catassi C **Where is celiac disease coming from and why?** *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 40 (3): 279-282 ,2005

- 65 Van de Wal Y, Kooy Y, Van Veelen P, Vader W, Koning F, Pena S **Coeliac disease: it takes to three to tango!**. *Gut* 46 (7): 734-737 ,2000
- 66 Greco L, Romano R, Coto I et al **The first large population based twin study of coeliac disease**. *Gut* 50 (5): 624-628 ,2002
- 67 King A L, Moodie S J, Fraser J S, Curtis D, Reid E, Dearlove A M, Ellis H J, Ciclitira P J **CTLA-4/CD28 gene region is associated with genetic susceptibility to coeliac disease in UK families**. *J Med Genet* 39 (1): 51-54 ,2002
- 68 Greco L, Babron M C, Corazza G R et al **Existence of a genetic risk factor on chromosome 5q in Italian coeliac disease families**. *Ann Hum Genet* 65 (Pt1): 35-41,2001
- 69 Clot F, Babron MC. **Genetics of celiac disease**. *Molec Genet Metabol* 2000;71:76-80.
- 70 Zhong F, McCombs CC, Olson JM, Elston RC, Stevens FM, McCarthy CF, Michalsky JP. **An autosomal screen for genes that predispose to celiac disease in the western countries of Ireland**. *Nat Genet* 1996;14:329-333.
- 71 Houlston RS, Tomlinson IP, Ford D, Seal S, Marossy AM, Ferguson A, Holmes GK, Hosie KB, Howdle PD, Jewell DP, Godkin A, Kerr GD, Kumar P, Logan RF, Love AH, Johnston S, Marsh MN, Mitton S, O'Donoghue D, Roberts A, Walker-Smith JA, Stratton MF. **Linkage analysis of candidate regions for coeliac disease genes**. *Hum Mol Genet* 1997;6:1335-1339.
- 72 Babron MC, Truy F, Eichenbaum-Voline S, Clerget-Darpoux F. **Behavior of the maximum likelihood score when many affected sibpairs are issued from a few untyped patients**. *Genet Epidemiol* 1997;14:518,A4.
- 73 Greco L, Corazza GR, Clot F, Babron MC, Fulchignoni-Lataud MC, Percopo S, Zavattari P, Bouguerra F, Dib C, Tosi R, Troncone R, Ventura A, Mantovani W, Magazzù G, Gatti R, Lazzari R, Giunta A, Perri F, Iacono G, Cardi E, De Virgiliis S, Cataldo F, De Angelis G, Musumeci S, Ferrari L, Balli F, Bardella MT, Volta U, Catassi C, Torre G, Eliaou JF, Serre JL, Clerget-Darpoux F. **Genome search in coeliac disease**. *Am J Hum Genet* 1998;62:669-675.
- 74 Djilali-Saiah I, Schmitz J, Harfouch-Hammoud E, Mougnot JF, Bach JF, Caillat-Zucman S. **CTLA-4 gene polymorphism is associated with predisposition to coeliac disease**. *Gut* 1998;43:187-189.
- 75 Torinsson Naluai Å, Nilsson S, Samuelsson L, Gudjonsdottir AH, Ascher, Ek J, Hallberg B, Kristiansson B, Martinsson T, Nerman O, Sollid LM, Wahlström J. **The CTLA4/CD28 gene region on chromosome 2q33 confers susceptibility to celiac disease in a way possibly distinct from that of type I diabetes and other chronic inflammatory disorders**. *Tissue Antigens* 2000;56:350-355.
- 76 Holopainen P, Arvas M, Sistonen P, Mustalahti K, Collin P, Maki M, Partanen J. **CD28/CTLA4 gene region on chromosome 2q33 confers genetic susceptibility to celiac disease. A linkage and family-based association study**. *Tissue Antigens* 1999;53:470-475.

77. Clot F, Fulchignoni-Lataud MC, Renoux C, Percopo S, Bouguerra F, Babron MC, Djiali-Saiah I, Caillat-Zucman S, Clerget-Darpoux F, Greco L, Serre JL. **Linkage and association study of the CTLA-4 region in coeliac disease for Italian and Tunisian populations.** Tissue Antigens 1999;54:527-530.
78. De La Concha EG, Fernandez-Arquero M, Vigil P, Rubio A, Maluenda C, Polanco I, Fernandez C, Figueredo MA. **Celiac disease and TNF promoter polymorphism.** Hum Immunol 2000;61:513-517.
79. Uibo O, Lambrechts A, Mascart-Lemone F. Human oesophagus: a **convenient antigenic substrate for the of antibodies in the serological diagnosis of coeliac disease.** Eur J Gastroenterol Hepatol 1995;7:37-40
80. Brusco G, Muzi P, Ciccocioppo R, Biagi F, Cifone MG, Corazza GR. **Transglutaminase and coeliac disease: endomysial reactivity and small bowel expression.** Clin Exp Immunol 1999;118:371-375
81. Monteleone G, Pender SLF, Alstead E, Hauer AC, Lionetti P, MacDonald TT. **Role of interferon- α in promoting T helper cell type 1 responses in the small intestine in coeliac disease.** Gut 2001;48:425-429.
82. Monteleone G, Pender SLF, Wathen NC, MacDonald TT. **Interferon- α drives T cell-mediated immunopathology in the intestine.** Eur J Immunol 2001;31:2247-2255.
83. Salvati VM, MacDonald TT, Bajaj-Elliott M, Borrelli M, Staiano A, Auricchio S, Troncone R, Monteleone G **Interleukin 18 and associated markers of T helper cell type 1 activity in coeliac disease** Gut. 2002 ;50:186-90.
84. Perry I, Tselepis C, Hoyland J, Iqbal TH, Sanders DSA, Cooper BT, Jankowski JAZ. **Reduced Cadherin/Catenin complex expression in celiac disease can be reproduced in vitro by cytokine stimulation.** Lab Invest 1999;79:1489-1499.
85. Schulzke JD, Bentzel CJ, Schulzke I, Riecken EO, Fromm M. **Epithelial tight junction structure in the jejunum of children with acute and treated celiac sprue.** Pediatr Res 1998;43:435-441. 86. Fasano A, Not T, Wang W, Uzzau S, Berti S, Tommasini A, Goldblum SE. **Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease.** Lancet 2000;355:1518-1519.
87. Strober W, Kelsall B, Marth T. **Oral tolerance.** J Clin Immunol. 1998 ;18:1-30
88. Nilsen EM, Lundin KEA, Krajci P, Scott H, Sollid LM, Brandtzaeg P. **Gluten-specific, HLA-DQ restricted T cells from coeliac mucosa produce cytokines with Th1 or Th0 profile dominated by interferon γ .** Gut 1995;37:766-776.
89. Lahat N, Shapiro S, Karban A, Gerstein R, Kinarty A, Lerner A. **Cytokine profile in coeliac disease.** Scand J Immunol 1999;49:441-446.

90. Przemioslo RT, Lundin KEA, Sollid LM, Nelufer J, Ciclitira PJ. **Histological changes in small bowel mucosa induced by gliadin sensitive T lymphocytes can be blocked by anti-interferon antibody.** Gut 1995;36:874-879.
91. Pender SL, Tickle SP, Docherty AJ, Howie D, Wathen NC, McDonald TT. **A major role of matrix metalloproteinases in T cell injury in the gut.** J Immunol 1997;158:1582-1590.
92. Schuppan D. **Current concepts of celiac disease pathogenesis.** Gastroenterology 2000;119:234-242.
93. Maiuri L, Auricchio S, Coletta S, De Marco G, Picarelli A, Di Tola M, Quarantino S, Londei M. **Blockage of T-cell costimulation inhibits T-cell action in celiac disease.** Gastroenterology 1998;115:564-572.
94. Maiuri L, Picarelli A, Boirivant M, Coletta S, Mazzilli MC, De Vincenzi M, Londei M, Auricchio S. **Definition of the initial immunological modifications upon in vitro gliadin challenge in the small intestine of celiac patients.** Gastroenterology 1996;110:1368-1378.
95. Moss SF, Attia L, Scholes JV, Walters JR, Holt PR. **Increased small intestinal apoptosis in coeliac disease.** Gut 1996;39:811-817.
96. Maiuri L, Ciacci C, Raia V, Vacca L, Ricciardelli I, Raimondi F, Auricchio S, Quarantino S, Londei M. **FAS engagement drives apoptosis of enterocytes of coeliac patients.** Gut 2001;48:418-424.
97. Ciccocioppo R, Di Sabatino A, Parroni R, Muzi P, D'Alo S, Ventura T, Pistoia MA, Cifone MG, Corazza GR. **Increased enterocyte apoptosis and Fas-Fas ligand system in celiac disease.** Am J Clin Pathol 2001;115:494-503.
98. Maiuri L, Ciacci C, Auricchio S, Brown V, Quarantino S, Londei M. **Interleukin 15 mediates epithelial changes in celiac disease.** Gastroenterology 2000;119:996-1006.
99. Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V, Auricchio S, Picard J, Osman M, Quarantino S, Londei M. **Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease.** Lancet. 2003;362:3-4.
100. Molberg Ø, McAdam SN, Körner R, Quarsten H, Kristiansen C, Madsen L, Fugger L, Scott H, Norén O, Roepstorf P, Lundin KEA, Sjöström H, Sollid LM. **Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognised by gut-derived T cells in celiac disease.** Nat Med 1998;4:713-717.
101. Marsh MN. **Transglutaminase, gluten and celiac disease: food for thought.** Nat Med 1997;3:725-726.
102. Berti I, Not T, Trevisiol C. et al. **Celiac disease and autoimmune thyroiditis.** Dig Dis Sci 1999
103. Cronin CC, Shanahan F. **Insulin dependent diabetes mellitus and celiac disease.** Lancet 1997; 349:1096-1097
104. Petaros P, Martellosi S, Torre G, Ventura A. **Prevalenza di malattie autoimmuni e neoplasie in pazienti celiaci.** Medico e Bambino 1999; 17:283.
105. Ventura A, Magazzu G, Greco L. **Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patient with celiac disease.** Gastroenterology 1999; 117:297-303

- 106 .Ventura A., Neri E, Ughi C et al. **Glutin dependent diabetes-related and thyroid –related autoantibodies in celiac patients: a prospective study.** J Pediatric Gastroenterology and Nutrition 1999;28:473
107. Rakan S., Sinagra G., Di Lenarda A. et al.: **Epidemiology of dilated cardiomyopathy.A prospettic post-mortem study of 5252 necropsies.** Eur. Hearth J. 1997; 18:117-123.
108. Caforio A. L. P. **Role of autoimmunity in dilated cardiomyopathy.** B Br. Hearth J.1994; 72 (sup.pl.): S 30-S 34
109. Botazzo G. F., Todd I., Mirakian R., Belfiore A., Pujol-Borrel R. **Organ specific Autoimmunity. A 1986 erview.** Immunol rev. 1986; 94: 137-169.
110. Rose N.R., Bona C. **Defining criteria for autoimmune diseases (Witebski's postulates Revisited).** Immunol today 1991; 14:426-428.
111. Magnusson Y., Wallukat G., Waagstein F. et al.: **Autoimmunity in idiopathic dilated Cardiomyopathy .** Circulation 1994; 89: 2760/2767.
- 112 Costantinos J. Limas: **Autoimmunity in dilated cardiomyopathy and the Major Histocompatibility complex.** International Journal of cardiology 54 (1996, 113-116).
113. Limas C., Limas J., Boudoulas H., Bair R., Sparks LN., Graber H., Wooly C.F.**HLA-DQA1 and DQB1 gene haplotyps in familar cardiomyopathy.**Am J Cardiol 1994 74:510-572.
- 114 Limas C. J., Limas C., Goldenberg I. F., Blair R. **Possible involvement of the HLA-DQβ1 gene in susceptibility and resistance human dilated cardiomyopathy.**Am Hearth J. 1995; 129: 1141-1144
- 115 . Neuman D. A. **Autoimmunity and idiopathic dilated cardiomyopathy.**Mayo Clin. Proc. 1994; 69: 24-27.
116. Caforio A. L. P., Goldman J. H., Haven A. J., Baig K. M., McKenna W. J.**Evidence for autoimmunity to myosin and other hearth-specific autoantigens Impatience with dilated cardiomyopathy and their relatives.** International J.Of Cardiology 54 (1996) 157-163.
117. Knip M. **Prediction and prevention of type 1 Diabetes.** Acta paediatric suppl. 425: 54-62 1998.
118. Curone M., Barbato M., De Biase ., Viola F., Lo Russo L., Cardi E **Prevalence of coeliac disease idiopathic dilated cardiomyopathy.**Lancet July 1999; 354: 222-223.
- 119 Moon A, Drubin DG. **The ADF/cofillin proteins: stimulus responsive Modulators of Actin Dynamics. Molecular Biology of the cell** 1995;6 1423-31
- 120 Janmey PA, Lind SE. **Capacity of human serum to depolymerize actin filaments.** Blood.1987;70:524-30
- 121 Thorstesson R, Utter G, Norberg R. **Further Characterisation of the Ca²⁺-dependent F-actin – depolymerizing protein of human serum.**
- 122 Dos Remedios,D. Chhabra, M. kekic,I.V.Dedova,M.Tsubakihara, D.A.Berry, and N.J.Nosworthy **Actin Binding Proteins: Regulation of Cytoskeletal Microfilaments**
- 123 McGough A, Staiger CJ, Min JK,Simonetti KD.**The gelsolin family of actin regulatory proteins:modular structures, versatile functions.**FEBS letters 2003 552: 75-81

- 124 Smith DB, Janmey PA, Herbert TJ, Lind SE. **Quantitative misurement of plasma gelsolin and its incorporation into fibrin clots.** J Lab Clin Med.1987;110:189-95
- 126 Cancado ELR, Vilas Boas LS, Abrantes Lemos CP,Novo Neil Ferriera, Porta G., Da Silva LG,Laudanna AA. **Heat serum inactivation as a mandatory procedure for anti actin antibody detection in cell culture.** Hepatology 1996;23:1099-1103
127. Clemente MG, Musu MP, Frau F, Brusco G, Sole G, Corazza GR, De Virgiliis S. **Immune reaction against the cytoskeleton in celiac disease.** Gut 2000;47:520-526
- 128 Clemente MC, De Virgilis, Kang JK, Macatagny R, Musu MP, Di Pierro, Drago S, Congia M, Fasano A. **Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function.** Gut 2003;52:218-33.
129. Clemente MG, Musu, Volta, Congia, Ciacci, E.Neri, Not T., Maggiore, Strisciuglio, Corazza, Gasbarrini, Cicotto, Sole, Fasano e De Virgilis. **Enterocyte Actin Autoantibody Detection: a new diagnostic tool in celiac disease diagnosis:Results of a multicenter study.**American J. of Gastroenterology 2004;99:1551-1556
- 130 Carroccio A.,Brusca I., Iacono G., Di Prima L., Teresi S., Pirrone G., Florena AM, La Chiusa SM, Averna MR. **Anti-actin antibodies in celiac disease: correlation with intestinal Mucosa damage and Comparison of ELISA with the immunofluorescenza Assay.** Clinical Chemistry 2005; 51, 917-920
131. Granito A, Muratori P, Cassani F, Pappas G., Muratori L, D. Agostinelli, Veronesi L., Bortolotti R., Petrolini N., Bianchi FB, Volta U. **Anti actin antibodies in severe celiac disease..**
- 132 De Virgilis S.**Ancora Biopsia? Forse no! Gli anticorpi anti-actina.** Medico e Bambino 2005;24:437-9.