



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SIENA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE NEUROLOGICHE, NEUROCHIRURGICHE  
E DEL COMPORTAMENTO

DOTTORATO DI RICERCA IN

SCIENZE NEUROLOGICHE APPLICATE  
CICLO XXV

COORDINATORE: PROF. ANTONIO FEDERICO

**Malattia celiaca e patologia del sistema nervoso centrale:  
prevalenza della malattia celiaca in una coorte di pazienti con  
sclerosi multipla**

SETTORE SCIENTIFICO-DISCIPLINARE: Pediatria generale e specialistica

TUTOR  
Prof. Salvatore Grosso

DOTTORANDO  
Dott.ssa Barbara Piccini

ANNO ACCADEMICO: 2016-2017

*Alla mia grande amica,*

*a Giada*



# INDICE

	Pagina
Introduzione .....	1
Storia della malattia celiaca .....	3
Epidemiologia .....	5
Il glutine .....	7
Patogenesi .....	11
Manifestazioni cliniche .....	25
Diagnosi .....	29
Algoritmi diagnostici .....	43
Situazioni particolari .....	47
Problemi aperti e prospettive .....	49
Trattamento .....	51
La gluten sensitivity .....	55
Malattia celiaca e SNC .....	59
Malattia celiaca e Sclerosi Multipla .....	77
Scopo del lavoro .....	83
Materiali e metodi .....	84
Casistica .....	87
Risultati .....	99
Discussione .....	105
Bibliografia .....	111

# INTRODUZIONE

La malattia celiaca (MC) è una patologia infiammatoria cronica, immunomediata, sistemica, causata dal glutine e dalle prolamine ad esso correlate contenute in grano, orzo e segale, che danno luogo ad una risposta immunitaria mediata dalle cellule T CD4+. Si manifesta in individui geneticamente predisposti ed è caratterizzata da una combinazione variabile di manifestazioni cliniche dipendenti dal glutine, dalla presenza di anticorpi specifici nel siero, dalla positività per gli aptotipi HLA DQ2 e/o DQ8 e dalla presenza di enteropatia (1). Questa nuova definizione, proposta dal gruppo di lavoro della European Society of Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition (ESPHGAN) nel 2012, ha sostituito quella precedente, basata sul concetto di MC come enteropatia glutine-dipendente, rispecchiando la radicale modifica dell'approccio clinico-diagnostico alla patologia. Infatti, mentre secondo i criteri diagnostici ESPGHAN del 1990 la diagnosi era posta sulla base del riscontro di un danno intestinale nei pazienti a dieta contenente glutine e la biopsia duodenale rappresentava una tappa ineludibile del percorso diagnostico (2), grazie alla rilevanza acquisita dalla sierologia, oggi è divenuto possibile evitare la biopsia in alcuni pazienti che soddisfino determinate condizioni discusse dettagliatamente in seguito. Istologicamente la malattia è caratterizzata da atrofia dei villi, iperplasia delle cripte e aumento dei linfociti intraepiteliali. L'enzima transglutaminasi tissutale (tTG) appartiene ad una famiglia di enzimi intracellulari implicata in vari eventi cellulari quali differenziazione, proliferazione, interazione cellulare, riparazione, apoptosi ed è coinvolto nella generazione dei peptidi tossici del glutine, in grado di stimolare le cellule T, attraverso la deaminazione dei residui di glutamina (3). La tTG 2 è inoltre l'autoantigene riconosciuto nella MC, caratterizzata dalla

produzione di anticorpi anti-transglutaminasi (anti-tTG) e antiendomisio (EMA). Quando il glutine è ingerito viene scisso in peptidi, in particolare la gliadina, che, una volta modificati dalle tTG, si legano alle cellule presentanti l'antigene, che esprimono le molecole HLA-DQ2 e HLA-DQ8. La stretta associazione della MC con le molecole HLA-DQ2 e DQ8 può essere spiegata dal fatto che tali molecole mediano l'attivazione dei linfociti T CD4+ a livello dell'intestino. I peptidi sono infatti successivamente presentati ai linfociti T della mucosa intestinale che si attivano, dando origine alla risposta infiammatoria e al danno della mucosa. L'attivazione dei linfociti T provoca la produzione di citochine di tipo Th2 (IL-4), con successiva stimolazione della sintesi di anticorpi anti-tTG da parte dei linfociti B autoreattivi (4). La prevalenza della MC varia a seconda dell'area geografica di provenienza, in Europa è variabile dallo 0.5 all'1%. Nelle ultime tre decadi si è reso evidente come la MC sia in realtà sotto diagnosticata. La classica presentazione con diarrea, perdita di peso e astenia è stata soppiantata da sintomi subdoli che inizialmente non suggeriscono la diagnosi. In passato la MC veniva considerata come un'enteropatia in senso stretto, mentre adesso viene riconosciuta come un disordine sistemico, con molti pazienti asintomatici o che presentano soltanto manifestazioni extraintestinali come l'anemia microcitica, l'osteoporosi e sintomi a carico del sistema nervoso centrale (SNC). La dieta senza glutine rappresenta ad oggi l'unica possibilità terapeutica per questi pazienti, che devono eliminare dalla loro dieta i cereali contenenti glutine per tutta la vita.

## STORIA

La storia della MC, tanto vecchia quanto il consumo di cereali, affonda le sue radici nel primo e secondo secolo a.C.. Lo sviluppo dell'agricoltura, iniziato circa 10000 anni fa, nella cosiddetta "Mezza Luna fertile", zona compresa fra Tigri, Eufrate e Nilo (Siria, Israele, Iran e Iraq), ha favorito la civilizzazione, ma ha anche dato origine a sostanziali cambiamenti della dieta come l'introduzione dei cereali (5). La prima descrizione dei sintomi risale al I secolo d.C. ed è attribuita ad **Areteo di Cappadocia**, proveniente da una zona che si trova nella parte orientale della Turchia, proprio adiacente alla cosiddetta "Mezza Luna Fertile". Fu lui il primo a parlare di "diatesi celiaca" (Koilia= ventre) in un capitolo del suo libro "Sulle Malattie Acute e Croniche", dal titolo appunto "Sulla Diatesi Celiaca", affermando che: "se lo stomaco non trattiene gli alimenti che vengono emessi indigeriti senza essere assorbiti dall'organismo, definiamo celiaci questi soggetti". La scarsa prevalenza della MC nel passato può essere spiegata con varie ragioni: i grani erano mangiati dopo essere stati tostati o fermentati per produrre birra, pane, puls (minestroni con granaglie di cereali e di legumi sottoposte a bollitura prolungata); per la panificazione si usava un lievito acido ricco di lattobacilli in grado di denaturare le proteine e inattivare le prolamine; per il pane prodotto senza lievito (pane azzimo) la cottura era prolungata e quindi anche la parte interna veniva cotta. Infine il periodo di allattamento materno era molto lungo, per cui i cereali erano introdotti nell'alimentazione del bambino molto tardi e, a causa dell'elevata mortalità infantile, era ridotta anche la trasmissione genetica dell'intolleranza alimentare. La prima descrizione della MC nel bambino è stata fornita nel 1888 da **Samuel Gee** (fig. 1), medico londinese, che ne ha magistralmente descritto la forma tipica. Il merito principale di Gee è stato quello di aver intuito che la

causa della MC andava ricercata in un alimento, anche se non è riuscito ad individuare quale. All'inizio del ventesimo secolo sono stati effettuati i primi tentativi dietetici con scarsi risultati, dal momento che non erano ancora stati identificati i componenti tossici. Soltanto nel 1950 **Willem-Karel Dicke** (fig. 2), pediatra dell'Ospedale dei bambini di Utrecht, ha attribuito la tossicità ad una componente proteica chiamata glutine ed ha stabilito che l'esclusione dalla dieta di grano, segale e avena dà luogo a miglioramento clinico. Questo medico osservò infatti un'attenuazione della diarrea nei celiaci nel corso della II guerra mondiale, in particolare durante il cosiddetto "inverno del digiuno del 1944-45", quando i suoi pazienti furono costretti a nutrirsi con una dieta a base di patate, e come, invece, la sintomatologia fosse ripresa dopo il piano ausiliare svedese che fornì agli olandesi la farina di grano. Nel 1954 **J.W. Paulley** descrisse il quadro istologico della mucosa digiunale di un paziente celiaco ottenuta non da un cadavere, ma durante un atto operatorio, segnalando le tipiche lesioni: atrofia dei villi, iperplasia delle cripte, infiltrazione linfocitaria. Nel 1957 un ufficiale medico dell'esercito USA, il colonnello **Crosby** mise a punto uno specifico strumento, che da lui prese il nome (capsula di Crosby), per effettuare le biopsie intestinali. Il termine dermatite erpetiforme è stato coniato da **Duhring** nel 1884 e la prima ipotesi di relazione con la MC fu formulata nel 1955.

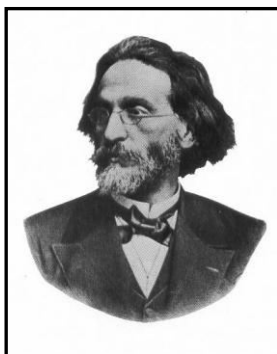


Figura 1. Samuel Gee

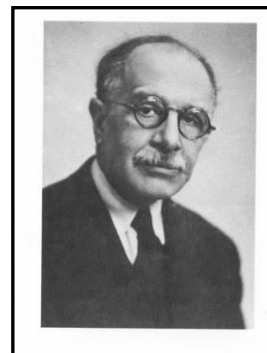


Figura 2. Willem-Karel Dick

## EPIDEMIOLOGIA

La prevalenza della MC, una delle più comuni malattie croniche geneticamente determinate, varia nella popolazione generale a seconda dell'area geografica di provenienza; in Europa, come in nord America, è stimata una prevalenza dell'1%. In altre parti del mondo la prevalenza della MC è stata meno studiata, comunque, dati disponibili dall'America Latina, Nord Africa, India nord-occidentale, Medio Oriente, mostrano come in questi paesi la prevalenza non differisca significativamente da quella dell'Europa e del Nord America (6). La prevalenza della MC sembra inoltre aumentare con l'età, come dimostra uno studio finlandese che ha evidenziato una prevalenza di 1/47 in soggetti di età superiore a 52 anni (7), oltre che tra i pazienti con anemia, malattie autoimmuni, bassa statura, sindrome di Turner, Williams e Down e tra i parenti di primo grado di soggetti affetti, per i quali varia dal 2.8% al 17.2%. La più alta prevalenza della MC, pari al 5.6% (1/17), è stata registrata in una popolazione di origine Araba-Berbera, i Saharawi, che vivono in Algeria. Le cause di questa elevata prevalenza sono molteplici. Sia nei bambini affetti che nella popolazione generale del Saharawi, gli alplotipi HLA predisponenti alla celiachia presentano un'altissima incidenza, verosimilmente in rapporto all'alto grado di endogamia di questa popolazione. Altro fattore sicuramente centrale, per chiarire una così alta prevalenza, è quello nutrizionale, infatti, lo sconvolgimento delle abitudini alimentari di questo popolo, che ha fatto seguito alla colonizzazione europea, ha certamente giocato un ruolo favorente di primaria importanza. Una forte predisposizione genetica quindi e un "carico" di glutine alimentare, in una popolazione non abituata ad apporti elevati di questo nutriente, sembrano essere i fattori responsabili della endemia celiaca nel Saharawi, che può però essere giustificata anche mediante

un'interpretazione evoluzionistica. Fin quando l'apporto alimentare di glutine di questo popolo era modesto, in pratica fino all'inizio del secolo scorso, il danno della mucosa intestinale nei celiaci ancestrali era lieve e poteva addirittura essere "protettivo". Una mucosa intestinale lievemente atrofica è infatti rivestita da enterociti parzialmente indifferenziati, che sono meno ricchi di recettori per i microrganismi intestinali. Il genotipo di predisposizione alla celiachia avrebbe quindi comportato un vantaggio selettivo, rendendo l'individuo più resistente nei confronti di infezioni intestinali gravi, quali ad esempio il colera. Il recente aumento dell'apporto di glutine avrebbe tuttavia trasformato, nei portatori del "trait celiaco", una lieve enteropatia in una grave atrofia dei villi intestinali, con conseguente malassorbimento e malnutrizione cronica (8). La MC è considerata invece estremamente rara o non esistente in alcune popolazioni africane e nei soggetti di origine cinese o giapponese, laddove la prevalenza dei sierotipi HLA-DQ2 e DQ8 è trascurabile. Altri fattori sono importanti per lo sviluppo della malattia, come le modalità di introduzione del glutine durante lo svezzamento, la durata dell'allattamento materno e il verificarsi e il ripetersi di infezioni intestinali. Vari studi dimostrano come l'introduzione del glutine prima del terzo mese di vita aumenti il rischio di sviluppare la MC, come del resto l'introduzione di elevate quantità al momento dello svezzamento (9). Inoltre, i bambini allattati con latte materno al momento dell'introduzione del glutine nella dieta e durante lo svezzamento sembrano avere un rischio inferiore di sviluppare la MC (10). Infine ripetute infezioni da Rotavirus si associano ad una maggior frequenza di MC nella tarda infanzia rispetto ai controlli (11).

# IL GLUTINE

Il glutine fu isolato per la prima volta da uno scienziato italiano, Beccari, nel 1728 e può essere definito come la massa coesiva che rimane dopo il lavaggio di un impasto farinoso in acqua. Si forma dunque durante l'impasto della farina di alcuni cereali con acqua, tra cui frumento, farro, segale, orzo, triticale, spelta, kamut e si presenta come un reticolo visco-elastico, capace di coniugare coesione ed elasticità, per la sua abilità di intrappolare il diossido di carbonio (fig. 3). Di norma, al glutine non viene attribuito alcun valore nutrizionale (12). Le sequenze di interesse per la MC sono comprese fra le proteine di deposito dell'endosperma che, in base alla loro solubilità, possono essere classificate in quattro tipi:

1. albumine, solubili in soluzioni acquose;
2. globuline, solubili in soluzioni saline;
3. gliadine, solubili in soluzioni alcoliche;
4. glutenine, solubili in soluzioni debolmente acide.

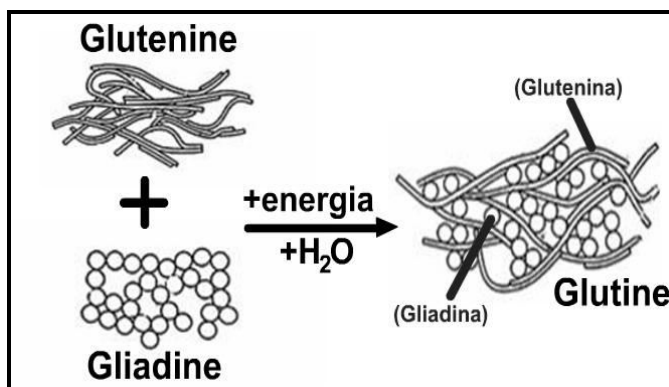


Figura 3. Struttura del glutine

Le frazioni alcool-solubili, provenienti dai semi di più cereali, vengono chiamate collettivamente prolamine, un termine che riflette la loro composizione aminoacidica, il più delle volte caratterizzata da un alto contenuto in prolina e glutamina; grazie all'elevato contenuto di prolina il glutine è molto resistente alla degradazione proteolitica attraverso il tratto gastrointestinale e, come spiegato di seguito, per il suo ricco contenuto di glutamina, è un ottimo substrato per l'attività enzimatica delle tTG. Il glutine è dunque costituito da due classi proteiche, le gluteline, chiamate glutenine nel grano e le prolamine, chiamate gliadine nel grano, secaline nella segale, ordeine nell'orzo, avenine nell'avena, zeine nel mais, etc. Le gliadine e le glutenine costituiscono circa l'80% dell'intera frazione proteica presente nella cariosside di frumento, mentre le albumine e le globuline, solubili in acqua al contrario delle precedenti, rispettivamente il 9% e il 5-7%. Le gliadine sono costituite da almeno 40 diverse proteine, sebbene con un alto grado di omologia della sequenza aminoacidica, e possono essere suddivise, per la loro diversa mobilità elettroforetica, in quattro gruppi,  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ - $\Omega$  gliadine, mentre le glutenine vengono suddivise in due gruppi in base al loro peso molecolare (glutenine ad alto e basso PM). L'unico metodo analitico ad oggi approvato a livello ufficiale (Codex Alimentarius) per il reperimento e il dosaggio del glutine negli alimenti è l'R5 Sandwich ELISA di Mendez, che utilizza un anticorpo monoclonale che reagisce con un penta-peptide della gliadina (QQPFP) (13). Sono attualmente oggetto di studio nuovi metodi come il Competitive R5 ELISA e il Competitive Gluten-TEC, messo a punto dal Prof. Frits Koning, che consentono oltre all'identificazione delle proteine native intatte, anche quella delle proteine idrolizzate e delle glutenine oltre che delle gliadine. Le nuove metodiche permetterebbero anche di identificare sequenze omologhe nell'orzo e nella segale e, dato l'utilizzo di peptidi sintetici, anche una più ampia

standardizzazione. Tutti i prodotti commercializzati in Unione Europea e in USA con la dicitura “senza glutine-gluten free” devono garantire il limite dei 20 ppm e possono quindi essere consumati con tranquillità dai celiaci. La norma per la dicitura “senza glutine” fa riferimento al regolamento europeo 828/2014. La definizione di “very low gluten” è prevista per i prodotti con contenuto di glutine tra 21 e 100 ppm. E’ doveroso precisare che la tipologia di prodotto dietetico con contenuto di glutine tra 21 e 100 ppm fino ad oggi non è mai stata commercializzata in Italia. Il Regolamento Europeo sancisce inoltre che possono essere definiti “senza glutine” anche i prodotti ottenuti con l’impiego di materie prime derivanti da cereali vietati, come l’amido di frumento per il pane. E’ stato recentemente messo a punto uno studio prospettico, in doppio cieco, con un gruppo controllo-placebo per stabilire la soglia di glutine tollerata dai soggetti celiaci, dato che i suddetti limiti si applicano agli alimenti e non alla quantità di alimenti che possono essere assunti da persone con MC: la maggior parte dei pazienti dovrebbe ingerire meno di 50 mg di glutine/die (14). Un aspetto importante a questo proposito è quello che riguarda la variabilità individuale e la necessità di stabilire se la quantità di glutine tollerata è costante nel tempo o varia con l’età o a causa di fattori ambientali. Il Regolamento Europeo ammette infine l’utilizzo dell’ “avena pura” nei prodotti definibili senza glutine. Per lungo tempo l’avena è stata considerata tossica, ma, durante l’ultima decade, numerosi autori hanno fornito evidenze scientifiche, da studi in vitro e investigazioni cliniche, che hanno consentito di concludere che l’avena è in realtà sicura per la maggior parte dei celiaci. Il motivo della non tossicità dell’avena potrebbe risiedere in alcune peculiarità strutturali proprie di questo cereale:

1. L'avena appartiene, così come il mais e il riso (cereali non tossici per il celiaco) al sottogruppo delle aveneae, mentre il frumento, la segale e l'orzo fanno parte delle triticeae.
2. Sebbene l'avenina presenti una sequenza aminoacidica simile a quella della gliadina, tuttavia, la presenza della valina al posto della prolina in posizione terminale sarebbe sfavorevole per un effetto tossico, il che renderebbe l'avena geneticamente meno simile alla gliadina.
3. La quantità di prolamine (avenine) contenute nell'avena (5-15% delle proteine totali) è decisamente inferiore rispetto a quella delle prolamine presenti nel frumento, nella segale e nell'orzo (rispettivamente 40-50%, 30-50%, 35-45%).

Recentemente Kaukinen e Maki hanno valutato la tossicità dell'avena in bambini affetti da MC, durante un periodo di follow-up di 2 anni, tramite la ricerca di depositi di anticorpi anti-TG2 di classe IgA a livello del digiuno, che rappresentano un marker potenzialmente più sensibile rispetto alla sierologia e alla istologia convenzionali. Questi autori hanno concluso che, nei 23 pazienti in esame, il consumo di avena, a differenza di quello di frumento, segale e orzo, non induceva la comparsa di depositi di IgA anti-TG2 a livello della mucosa intestinale (15). Il vero problema che limita l'utilizzo dell'avena è quello della contaminazione col glutine, sia nella fase del raccolto che della mietitura e anche nella successiva manifattura, come testimoniano recenti studi che dimostrano quanto sia difficile il reperimento in commercio di avena non contaminata (16).

## **PATOGENESI**

La MC deve essere considerata una malattia ad eziologia multifattoriale determinata dalla compartecipazione di tre fattori principali:

- a) Ambientali: principalmente presenza del glutine nella dieta
- b) Genetici: suscettibilità alla reattività al glutine
- c) Immunologici: disregolazione della risposta immunologica quale responsabile del danno mucosale (risposta immunitaria innata e adattativa)

La MC rappresenta di fatto un modello di malattia autoimmune di cui si conosce, almeno in parte, la costituzione genetica (molecole HLA DQ2 e DQ8), l'agente esogeno scatenante (il glutine) e l'autoantigene (le transglutaminasi).

## **FATTORI AMBIENTALI**

### **➤ Introduzione del glutine nella dieta**

Fattori importanti per lo sviluppo della malattia sono sicuramente il momento di introduzione del glutine nella dieta e la quantità introdotta, come dimostra la cosiddetta "epidemia svedese" (incidenza di MC del 3%), che si è verificata negli anni '80, quando il glutine ha iniziato ad essere introdotto dopo che l'allattamento materno era stato interrotto ed in considerevoli quantità. Tale "epidemia" si è protratta per circa 10 anni per poi attenuarsi quando sono cambiate le linee guida nazionali per lo svezzamento (17). L'esposizione al glutine prima dei tre mesi o più tardi dei 6 mesi si è inoltre dimostrata un

fattore di rischio in uno studio di coorte con follow-up longitudinale (9). Questi ed altri recenti studi supportano l'ipotesi che vi sia una "finestra critica", durante la quale si stabilisce la tolleranza al glutine e che la sovrapposizione tra allattamento materno e l'introduzione del glutine si traduca in un effetto protettivo nei confronti dello sviluppo della MC. In tal senso potrebbe essere dunque auspicabile un intervento di prevenzione primaria (18).

### ➤ **Infezioni virali**

Gli episodi infettivi possono contribuire all'eziopatogenesi della MC poiché incrementano la permeabilità intestinale, facilitano la penetrazione antigenica ed inoltre indirizzano il sistema immunitario verso una risposta di tipo Th1. Anche osservazioni di tipo epidemiologico, che riguardano il pattern di incidenza stagionale della MC, fanno presupporre che le infezioni virali possano fungere da evento trigger, infatti i bambini nati in estate avrebbero un maggior rischio di sviluppare la MC perché più esposti alle infezioni nel momento in cui viene meno la protezione anticorpale materna (19). Le infezioni da *Adenovirus* umano di sierotipo 12 (Ad12) potrebbero rappresentare un fattore ambientale predisponente alla celiachia. La proteina Elb di Ad12 ha una regione, che include un singolo residuo di glutamina ed uno di prolina, con sequenza omologa al dominio V dell' $\alpha$ -gliadina, ricco in glutamina. Studi recenti hanno dimostrato che frequenti infezioni da *Rotavirus*, che sono la causa più comune di gastroenterite nei bambini al di sotto dei due anni d'età, aumentano il rischio di sviluppare la celiachia. E' stato identificato un peptide consensus (VVKGGSSSLGW), che viene riconosciuto da anticorpi di pazienti celiaci con malattia attiva e non da pazienti in gluten free diet (GFD) e risulta avere un'elevata omologia con la proteina neutralizzante maggiore VP7 di Rotavirus (VIQVGGSNVLDI). Questo peptide presenta, inoltre, omologia di sequenza con

la regione C-terminale della tTG (aa 476-487), con HSP60 (Heat Shock Protein) umana, con Toll Like Receptor 4 (TLR4) e con la desmoglina I. Anticorpi diretti contro questo peptide, purificati da siero di pazienti celiaci con malattia attiva, riconoscono sia l'antigene virale che le proteine omologhe. Attraverso l'interazione con TLR4 questi anticorpi attivano i monociti, stimolando la produzione di citochine pro-infiammatorie, sono in grado di alterare la permeabilità cellulare e, attraverso l'interazione con HSP60, inducono citotossicità nelle cellule epiteliali dell'intestino. Queste osservazioni suggeriscono dunque che l'infezione da Rotavirus svolga un ruolo importante nella patogenesi della celiachia e che, alla base dello sviluppo dell'autoimmunità, ci sia un meccanismo di mimica molecolare (11, 20).

## FATTORI GENETICI

La iper-risposta immunologica nei confronti dei peptidi del glutine ha una base genetica, come dimostrato dal fatto che i familiari di primo grado di pazienti celiaci hanno una prevalenza di malattia di circa 10% e tale prevalenza sale al 30% quando si considerano fratelli e sorelle HLA identici (21). La concordanza molto elevata (83-86%), ma non assoluta, tra gemelli omozigoti conferma comunque l'importanza dei fattori ambientali nell'insorgenza della MC (22). L' European Genetic Cluster on Celiac Disease ha dimostrato che il 90-95% dei pazienti celiaci sono DQ2 positivi e il 5-10% sono DQ8 positivi. L'eterodimero HLA DQ2  $\alpha/\beta$  è codificato dai geni DQA1\*0501 (catena  $\alpha$ ) e DQB1\*0201 (catena  $\beta$ ), localizzati in cis o in trans sul cromosoma 6 p21.3 (CELIAC 1 region). Questa associazione si riscontra appunto nel 95% dei pazienti, in linkage disequilibrium con DR3 o DR5/7. In una minoranza di pazienti, in cui il DQ2 non

è presente, la MC è associata al DQ8, le cui catene  $\alpha$  e  $\beta$  sono rispettivamente codificate dai geni DQA1\*0301 e DQB1\*0302. Quindi, praticamente tutti i pazienti presentano le molecole HLA-DQ2 o DQ8 o una catena dell'eterodimero DQ2  $\alpha/\beta$  o DQ 8  $\alpha/\beta$  e la MC si sviluppa solo eccezionalmente in assenza di questi alleli. La presenza delle suddette varianti delle molecole HLA-DQ non si associa allo sviluppo certo della malattia, ma modifica fortemente il rischio, mentre la loro assenza rende estremamente poco probabile lo sviluppo della MC, con un valore predittivo negativo vicino al 100% (elevata sensibilità, bassa specificità). Bisogna considerare che il 35-40% della popolazione generale e il 60-70% dei parenti di primo grado di soggetti affetti hanno questi aplotipi HLA in assenza di malattia e che l'HLA rende conto di meno del 50% del rischio genetico (23). Vi sono altri geni, ad oggi solo in parte conosciuti, preposti alla preparazione e al trasporto dell'antigene, geni che determinano il polimorfismo del recettore sui linfociti T e geni immunomodulanti, che codificano molecole di adesione, citochine e loro recettori, che amplificano o restringono la risposta immune in modo non antigene specifico, sicuramente coinvolti nella patogenesi della MC.

## IMMUNITA' ADATTATIVA

Il coinvolgimento della risposta immunitaria adattativa è stato esaustivamente descritto nel momento in cui sono state dimostrate specifiche sequenze nei peptidi del glutine in grado di legarsi alle molecole HLA-DQ2 e DQ8 (24). Una volta che gli eterodimeri DQ2 o DQ8 sulle cellule presentanti l'antigene (APC) hanno legato i peptidi del glutine, li presentano ai linfociti T CD4+. Generalmente questi epitopi sono ricchi in prolina, che ne rende difficile la

degradazione, e contengono residui di glutamina deamidata (acido glutammico) carichi negativamente. I linfociti T CD4+ specifici per il glutine, presenti a livello della lamina propria, esprimono il recettore  $\alpha\beta$  delle cellule T e possono essere isolati e coltivati in vitro. Queste cellule, una volta riconosciuti gli specifici peptidi, presentati tramite l'interazione con le molecole DQ2 e DQ8, inducono una risposta infiammatoria mediata dalle citochine Th1, primariamente tramite il rilascio di interferon  $\gamma$ , che va a sua volta a scatenare vari meccanismi effettori, quali un'aumentata secrezione di metallo-proteinasi in grado di danneggiare i tessuti e un'aumentata citotossicità dei linfociti intraepiteliali (25). Alcune citochine proinfiammatorie sono iper-esprese a livello della mucosa dei soggetti con MC in fase attiva, come appunto l'interferon  $\gamma$ , interferon  $\alpha$ , IL-6, IL-18 e IL 21 (26). L'interazione con i linfociti T CD4+ media anche l'attivazione delle cellule B autoreattive e la produzione così di anticorpi anti-TG2 (27). Gli stessi epitopi capaci attivare le cellule T rappresentano anche substrati per la degradazione proteolitica da parte degli enzimi gastrointestinali e potrebbero quindi essere completamente digeriti prima che si possa verificare l'esposizione al sistema immunitario. Shan et al hanno identificato nei pazienti con MC un peptide di 33 aa (peptide 33 mer) che contiene almeno 6 epitopi, che hanno sequenze ricche in prolina e glutamina, parzialmente sovrapponibili (28). Il peptide resiste sia in vitro che in vivo alla degradazione enzimatica delle peptidasi gastriche, pancreatiche e alla digestione da parte degli enzimi dell'orletto a spazzola della mucosa del piccolo intestino, nonostante questi enzimi normalmente riducano qualsiasi peptide a singoli aminoacidi o a piccoli peptidi di 2-3 aminoacidi prima di essere assorbiti. Questo peptide ha un'alta affinità per la tTG ed è stato dimostrato che è in grado di stimolare una risposta in tutte le linee cellulari T policlonali derivate da

differenti pazienti con MC. Simili sequenze peptidiche sono presenti nell'ordeina e nella secalina.

## RUOLO DELLE TG2

Le TGs sono una famiglia di enzimi intracellulari,  $\text{Ca}^{2+}$  dipendenti, in grado di catalizzare una reazione di crosslinking, coinvolte nelle modificazioni post-traslazionali delle proteine e in varie funzioni biologiche intra ed extracellulari. L'isoenzima più diffuso è la transglutaminasi tissutale o di tipo 2 (tTG o TG2). Le tTG catalizzano reazioni di transamidazione o di deaminazione dei residui di glutamina. La reazione di transamidazione si verifica in presenza di una amina accettrice, che può essere una lisina o una poliamina, che viene attaccata alla glutamina creando un legame isopeptidico, mentre la reazione di deaminazione si verifica con l'acqua trasformando la glutamina in acido glutammico (29). Tutte le transglutaminasi mostrano un alto grado di specificità, per cui solo un numero limitato di proteine può agire da substrato. Al contrario la maggior parte delle proteine contenenti lisina e poliamine possono fare da proteina accettrice (30). La posizione dei residui di prolina rispetto a quelli di glutamina nella catena polipeptidica si è rivelata fondamentale per l'attività enzimatica della tTG. Le proteine del glutine rappresentano un ottimo substrato per la tTG perché ricche di residui di glutamina. Le TG2 sono immagazzinate a livello intracellulare e rilasciate in seguito al danno cellulare e giocano un ruolo importante nel mantenimento dell'impalcatura del tessuto connettivo. Sono coinvolte nell'attivazione del transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) mediante il legame TGF $\beta$ -binding protein e, considerate le proprietà immunosoppressive del TGF- $\beta$ , sembra probabile un ruolo indiretto delle tTG nel controllo

dell'infiammazione. Oltre a queste attività enzimatiche le TG2 sono necessarie per i processi di ancoraggio e per la motilità dei fibroblasti e dei monociti attraverso l'interazione con la fibronectina e le integrine. L'abolizione di questa funzione risulta in un'alterata migrazione dei fibroblasti e delle cellule epiteliali. A livello extracellulare le TG2 sono coinvolte nei processi di assemblaggio della matrice, di adesione cellulare e di guarigione delle ferite. Nella mucosa dei soggetti con MC l'espressione delle tTG a livello della lamina propria è up-regolata. Enzimaticamente, come sopra spiegato, le tTG hanno un'elevata affinità per le prolamine e possiedono la capacità di deaminazione, in modo da trasformare i residui neutri di glutamina in residui di acido glutammico carichi negativamente. Le proteine del glutine nella loro forma nativa contengono pochi residui con carica negativa, per cui si legano scarsamente al DQ2 e al DQ8 (31). L'introduzione di residui carichi negativamente in specifiche posizioni nei peptidi del glutine favorisce la loro interazione con aminoacidi carichi positivamente localizzati nel sito di legame delle molecole DQ2/DQ8, agevolando così la stimolazione delle cellule T, che a loro volta inducono la differenziazione dei linfociti B in plasmacellule capaci di produrre specifici anticorpi antigliadina e anti-transglutaminasi. La deaminazione avviene soltanto se l'attività delle tTG è alta, il substrato in eccesso, i livelli di amine accettrici sono bassi e se il pH è basico o solo lievemente acido, tutte condizioni che si verificano durante l'infiammazione intestinale. La deaminazione selettiva degli epitopi intatti per i linfociti B aumenta molto la loro antigenicità, dando luogo ai nuovissimi anticorpi anti peptidi deamidati della gliadina. Il ruolo esatto degli anticorpi anti tTG nella patogenesi della MC rimane comunque da chiarire. Studi recenti hanno dimostrato, mediante l'utilizzo di anticorpi monoclonali marcati per le IgA e le TG2, la co-localizzazione a livello della regione sub-epiteliale, anche nelle biopsie normali, prima della positivizzazione

sierologica e di un paese danno cellulare, suggerendo che la deposizione locale di anticorpi potrebbe rappresentare una fase precoce del processo (32).

La figura 4 mostra il ruolo dell'immunità adattativa nella patogenesi della MC.

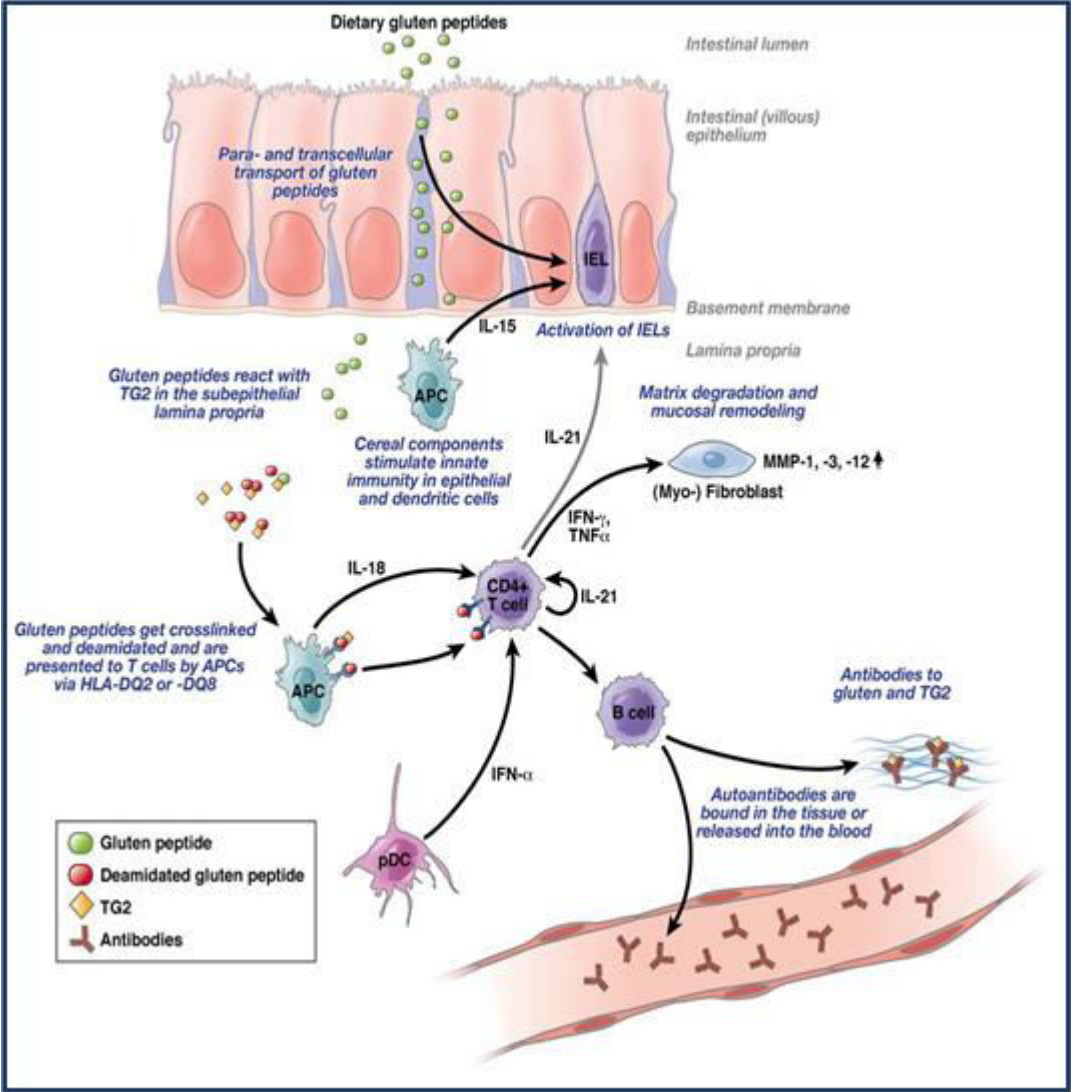


Figura 4. Patogenesi della MC: immunità adattativa (Schuppan D. 2009)

## IMMUNITA' INNATA

Il glutine è stato definito da alcuni autori (Koning, Wijmenga) un'arma a doppio taglio per la sua capacità di attivare non solo l'immunità adattativa ma anche quella innata. La gliadina contiene infatti peptidi in grado di indurre una risposta immune innata a livello dell'intestino, determinando effetti tossici sulla mucosa intestinale, indipendentemente dal loro specifico riconoscimento da parte dei linfociti T. Nell'ambito dell'immunità innata un ruolo centrale è svolto dai linfociti intraepiteliali (IEL) citotossici CD8+, CD4-, TCR  $\alpha\beta$  e CD8+, CD4-, TCR  $\gamma\delta$ , che distruggono le cellule epiteliali. Attraverso specifici recettori della linea natural killer (NKR), espressi sulla superficie, gli IEL riconoscono le molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC-I), come MICA (Major Histocompatibility Complex Class I related Chain A), codificate dai geni MHC non classici, la cui espressione sulla superficie degli enterociti è indotta dallo stress e dall'infiammazione. Le molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I si comportano come ligandi del recettore-attivante NKG2D, coinvolto nella trasmissione del segnale attraverso la proteina adattatrice DAP 10. L'interazione MIC/NKGD2 consente agli IEL di diventare cellule killer, attivate dalle linfochine, in modo da provocare la morte delle cellule epiteliali in una maniera TCR indipendente. Questa attività è potenziata dall'IL-15, una citochina pro-infiammatoria, prodotta principalmente dai monociti-macrofagi, dalle cellule dendritiche e epiteliali, che fa parte del braccio innato dell'immunità, altamente espressa nella mucosa intestinale dei soggetti celiaci. L'IL-15 favorisce l'espansione degli IEL CD8+, il rilascio di citochine pro-infiammatorie (INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ), stimola la loro azione citotossica perforin-granzyme dipendente, ne riduce la capacità di apoptosi prolungandone la sopravvivenza, aumenta l'espressione del recettore NKG2

sugli IEL CD8 + e di MICA sulle cellule epiteliali intestinali. Recentemente l'IL-21, prodotta dalle cellule T CD4+, è emersa come possibile fattore addizionale che agisce, nel contesto dell'immunità innata, in concerto con l'IL-15 (33). Gli studi sul ruolo dell'immunità innata nella MC sottolineano la funzione del peptide 31-43, localizzato all'estremità NH<sub>2</sub>-terminale della gliadina  $\alpha$ , identificato come peptide "tossico". Al contrario del peptide 56-68, cosiddetto peptide "immunogenico", identificato come uno degli epitopi dominanti riconosciuti dai linfociti T CD4+ DQ2 ristretti, il peptide 31-43 non mostra un'attività immunogenica sulle cellule T, ma può attivare meccanismi di difesa immunitaria "innata" attraverso l'aumentata produzione di IL-15, di ciclossigenasi 2 e l'attivazione dei markers CD25 e CD83 sulle cellule della lamina propria che hanno caratteristiche di macrofagi, monociti e cellule dendritiche (34). Tra gli altri protagonisti del sistema immunitario innato, l'epitelio intestinale, con le sue giunzioni intercellulari serrate (tight junction = TJs), rappresenta la principale barriera per il passaggio di macromolecole come il glutine. Se l'integrità delle TJs è compromessa, come avviene nella MC, si può verificare una risposta immune inappropriata agli antigeni endoluminali. Fasano et al hanno dimostrato che la ZOT (Zonula Occludens Toxin), una proteina del *Vibrio Cholerae*, è in grado di aumentare la permeabilità intestinale, aprendo le giunzioni serrate tra le cellule, interagendo con uno specifico recettore di superficie. Gli stessi autori nel 2000 hanno identificato la zonulina, una nuova proteina umana, analoga alla tossina ZOT del vibrione del colera, capace di controllare l'apertura e la chiusura delle giunzioni serrate tra le cellule dell'epitelio intestinale (35). Nel 2005 Fasano ha osservato un aumento del rilascio luminale di zonulina e della permeabilità intestinale in campioni biopsici intestinali di celiaci in GFD, in seguito all'esposizione alla gliadina, cambiamenti che non si verificavano dopo trattamento con

l'antagonista della zonulina FZI/0. Nei soggetti non celiaci si verifica solo un transitorio aumento del rilascio di zonulina, seguito da un incremento della permeabilità intestinale, che però non raggiunge mai il livello della permeabilità osservata nei soggetti celiaci (36). E' stato inoltre evidenziato che nei soggetti celiaci l'aumento della permeabilità intestinale è un evento precoce e non una conseguenza dell'infiammazione cronica intestinale. In quanto prima linea difensiva del sistema immune della mucosa, l'epitelio intestinale deve discriminare tra organismi patogeni e non e coordinare risposte appropriate al "milieu" batterico. Le cellule epiteliali dell'intestino devono "tollerare" la flora commensale, che è costantemente presente nel lume e mantenere l'omeostasi della mucosa, controllando le risposte infiammatorie, in modo tale che sia attivata un'appropriata risposta immune della sottostante lamina propria. I meccanismi della tolleranza epiteliale e dell'intolleranza nei confronti dei ligandi batterici intraluminali sono distintamente mediati attraverso i TLRs ed altri recettori del sistema immune innato che catalizzano una serie di eventi di segnale interdipendenti. Un altro componente del sistema immune innato dell'intestino è rappresentato dalle cellule dendritiche. Nella mucosa intestinale l'attivazione T-cellulare è in gran parte sotto il controllo delle cellule dendritiche, cellule antigene-presentanti professioniste, che svolgono un'azione di vigilanza nei confronti di antigeni luminali sia di origine batterica che alimentare. Inoltre, il tipo di risposta immunitaria dipende dal subset di cellule dendritiche coinvolto, dal loro grado di maturazione, dal tipo di antigene con cui vengono a contatto, e dalla produzione di citochine anti-infiammatorie (IL-10, TGF- $\beta$ ) vs citochine pro-infiammatorie (IL-12, IL-23). Sebbene sia recentemente emersa l'importanza delle cellule dendritiche nella regolazione dell'omeostasi tra attivazione della risposta immune e tolleranza orale, è tuttora oscuro il ruolo di tali cellule nella

patogenesi della MC: in particolare non si conosce se i peptidi del glutine siano capaci di stimolare una specifica sottopopolazione di cellule dendritiche e/o se vengono captati da popolazioni di cellule dendritiche attivate in precedenza da “segnali di danno” (37).

## RUOLO DELLE CELLULE T REGOLATRICI

Le cellule T regolatrici CD4<sup>+</sup> (Treg), scoperte alla fine degli anni novanta e implicate nei meccanismi di tolleranza immunologica, possono operare un'azione di down-regulation sulle risposte mediate dalle cellule T distruttive. Nei modelli animali queste cellule sono generate perifericamente, soprattutto a livello dei linfonodi mesenterici, e in minor misura a livello intestinale, nelle Placche del Peyer e nella lamina propria, a partire dalle cellule T CD4<sup>+</sup> native. La maturazione si verifica in presenza di cellule dendritiche che presentano l'antigene target e viene seguita dalla migrazione delle cellule Treg principalmente nell'intestino, dove appunto limitano le risposte immunitarie. Recentemente sono state prese in considerazione, per chiarire la patogenesi della MC, le cellule Treg CD8<sup>+</sup>, anch'esse coinvolte nella soppressione della risposta immune a livello intestinale. Come i linfociti T citotossici CD8<sup>+</sup>, implicati nella distruzione della mucosa, le cellule Treg CD8<sup>+</sup> risiedono principalmente nel compartimento epiteliale dell'intestino. Il ruolo delle cellule Treg CD8<sup>+</sup>, che esprimono Foxp3 e l'omodimero CD8  $\alpha\alpha$ , a differenza dei linfociti T CD8<sup>+</sup> citotossici, che esprimono il TCR  $\alpha\beta$  e  $\gamma\delta$  insieme al CD8  $\alpha\beta$ , sarebbe quello di ostacolare il suddetto processo distruttivo. Il ruolo di queste cellule nei modelli murini di autoimmunità e di malattie infiammatorie intestinali è ben stabilito, ma la loro rilevanza come soppressori delle malattie

mediate dalle cellule T nell'uomo costituisce attualmente un emergente argomento di studio.

Nella figura 5 è rappresentato il ruolo dell'immunità innata nella patogenesi della MC.

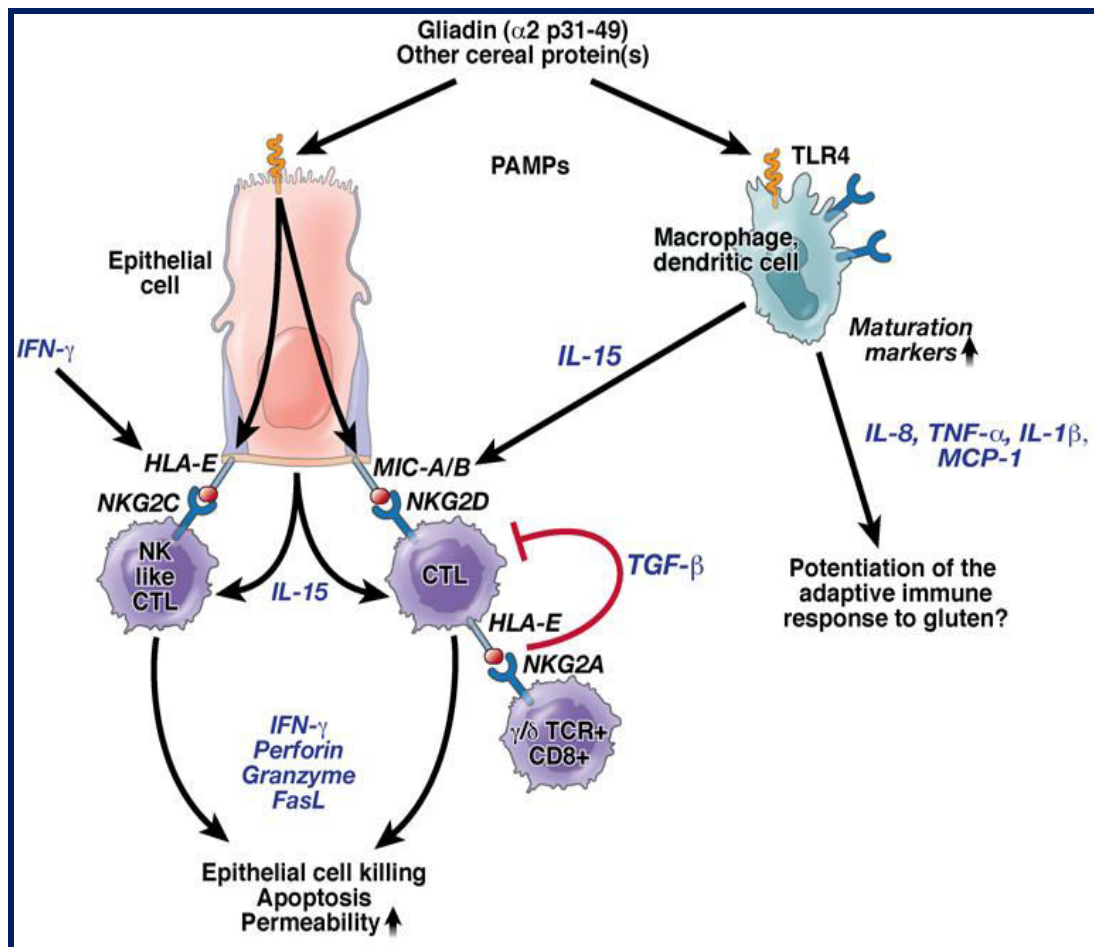


Figura 5. Patogenesi della MC: immunità innata (Schuppan D. 2009)



## MANIFESTAZIONI CLINICHE

In passato la MC veniva considerata come un'enteropatia in senso stretto, mentre attualmente viene riconosciuta come un disordine sistemico che può insorgere a qualsiasi età, con una crescente proporzione di nuovi casi diagnosticati in età adulta e con molti pazienti asintomatici o che presentano soltanto manifestazioni extraintestinali, come l'anemia microcitica, l'osteoporosi e il coinvolgimento del SNC. Nonostante la MC sia una delle malattie croniche più comuni nei paesi occidentali, molti individui affetti rimangono non diagnosticati, proprio perché presentano sintomi atipici o sono asintomatici. Il numero di casi non diagnosticati è ancora oggi molto elevato e la prevalenza di soggetti non diagnosticati in Europa è del 5%, pari a due milioni e mezzo di pazienti, mentre il rapporto tra casi diagnosticati e non è 1:7 (38). La MC si presenta con un estremo polimorfismo clinico che spazia da forme eclatanti, caratterizzate da sintomi di malassorbimento, a forme subcliniche, mono, pauci o completamente asintomatiche. Esplicativo in tal senso è il modello dell'iceberg proposto da Maki, di cui la malattia, intesa in senso tradizionale e clinicamente conclamata, costituirebbe solo la parte visibile (fig.6) (39).

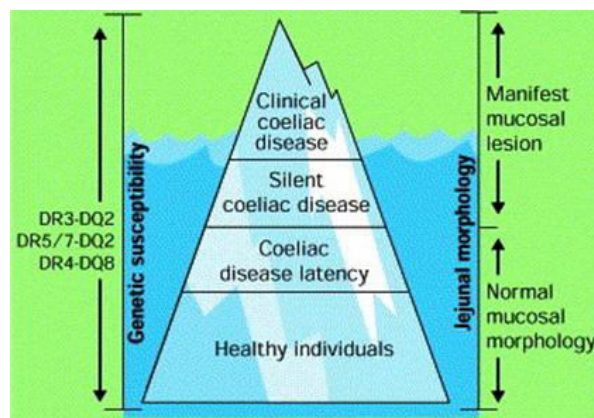


Figura 6. Iceberg della MC (Maki M., Collin P. 1997)

Possiamo distinguere 4 tipi di presentazione clinica: (i) MC con sintomi e segni gastrointestinali quali scarso accrescimento, perdita di peso, diarrea, anoressia, vomito, distensione addominale, dolori addominali, stipsi alternata a diarrea, edemi, ipotonia e ipotrofia muscolare; (ii) MC con segni e sintomi extraintestinali, caratterizzata da segni e sintomi gastrointestinali minimi o assenti e dalla presenza di altre manifestazioni cliniche quali anemia sideropenica resistente alla terapia marziale, bassa statura isolata, alterazioni dello smalto dei denti, dermatite erpetiforme, afte ricorrenti, stipsi, alopecia, artrite, osteoporosi, epilessia in pazienti con calcificazioni occipitali (sindrome CEC), ipertransaminasemia, pubertà ritardata, amenorrea, infertilità, aborti ripetuti, coinvolgimento del SNC (epilessia, cefalea, neuropatie periferiche, atassia, demenza); (iii) MC silente, quando la mucosa del piccolo intestino è danneggiata e sono riscontrati nel siero gli anticorpi associati alla MC, ma in assenza di sintomatologia; soggetti a rischio di avere una MC silente sono quelli affetti da diabete mellito di tipo 1 (DM1), tiroidite, sindrome di Sjogren ed altre connettiviti, sindrome Down, sindrome di Williams, sindrome di Turner e i parenti di primo grado di soggetti affetti (prevalenza dell'8-10%); (iv) MC latente, quando il soggetto presenta un assetto genetico compatibile con la MC, può presentare positività anticorpale, ha una mucosa intestinale normale (o Marsh 1) e può essere o meno sintomatico (40). Nell'ambito delle manifestazioni extraintestinali recentemente l'attenzione è stata focalizzata su patologie di interesse neurologico, come l'atassia cerebellare, la neuropatia periferica, il mioclono, la demenza, le mielopatie, le vasculiti, la cefalea, l'epilessia e le forme demielinizzanti. I meccanismi che sottintendono a questa associazione rimangono tuttora sconosciuti, come rimane da chiarire perché alcuni soggetti sviluppino sintomi a livello del SNC a differenza di altri e l'estrema variabilità di tali sintomi. Sono state formulate molteplici ipotesi per

spiegare il coinvolgimento del SNC: meccanismi autoimmuni, malassorbimento, ereditarietà e la tossicità da glutine. In particolare inoltre esiste una paucità di dati attinenti alle manifestazioni neurologiche dei pazienti in età pediatrica.



## DIAGNOSI

Gli attuali criteri diagnostici della MC sono quelli rivisitati dalla ESPGHAN (European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition) e pubblicati nel 2012 (1). Le nuove linee guida ESPGHAN del 2012 prevedono in alcune condizioni la possibilità di non praticare la biopsia duodenale e dettano regole precise per l'esecuzione e l'interpretazione della stessa biopsia. La presentazione clinica proteiforme della MC, l'aumento delle forme silenti e subcliniche, l'invasività della biopsia intestinale, hanno motivato la ricerca di test di screening più semplici, affidabili, di facile esecuzione e meno invasivi. Pertanto nelle ultime decadi sono state messe a punto numerose indagini che possono supportare la diagnosi di MC; in particolare i test sierologici e la tipizzazione HLA hanno un ruolo importante nell'algoritmo diagnostico della malattia. La sensibilità dei test sierologici si riduce enormemente nei soggetti che seguono una dieta a basso o nullo contenuto di glutine, pertanto i pazienti non dovrebbero seguire una dieta povera o priva di glutine prima di eseguire i test sierologici.

### RUOLO DELL'HLA

Affinché si manifesti la risposta immunologica caratteristica della MC è necessaria una predisposizione genetica. Il 95% dei soggetti affetti presenta infatti un aplotipo DQ2 e/o DQ8. Mentre l'associazione delle molecole HLA-DQ2 e DQ8 con il rischio di sviluppare la MC è stata ampiamente discussa, la conoscenza dell'impiego pratico della tipizzazione HLA come test genetico per la MC rimane ancora limitata e le implicazioni cliniche dei risultati ancora non

chiaramente definite. La negatività dei suddetti geni rende molto improbabile la diagnosi di MC. Viceversa la sola positività del DQ2/DQ8 non permette di porre diagnosi di MC in quanto circa il 30% della popolazione caucasica è portatrice di questi aplotipi (41). La tipizzazione HLA assume pertanto un ruolo diagnostico in alcune situazioni particolari:

1. Nei pazienti con sospetto di MC che soddisfino i criteri capaci di rendere superflua l'esecuzione della biopsia duodenale (pazienti sintomatici con elevati titoli di IgA anti-tTG), nei quali la tipizzazione HLA viene utilizzata per la conferma diagnostica;
2. Nei pazienti con condizioni associate a maggior rischio di MC, in cui la tipizzazione HLA dovrebbe rappresentare il primo step diagnostico, poiché la negatività del DQ2/DQ8 rende inutile qualsiasi ulteriore approfondimento per MC;
3. In tutti i pazienti che presentino una diagnosi dubbia (ad esempio nei casi con alterazioni istologiche e negatività anticorpale), laddove la negatività del DQ2/DQ8 permette di escludere la MC e indirizza la diagnosi verso altre cause di danno intestinale.

Oltre agli aplotipi HLA sono stati ad oggi identificati 41 loci non-HLA e 58 diversi polimorfismi genici, che sembrerebbero predisporre allo sviluppo di MC, tuttavia l'analisi di tali geni non assume al momento un ruolo diagnostico.

## TEST SIEROLOGICI

La produzione di specifici anticorpi rappresenta una manifestazione precoce della MC, che precede lo sviluppo del danno intestinale e costituisce un

biomarker caratteristico di tale patologia. Gli anticorpi utilizzati per la diagnosi di MC sono gli anti-transglutaminasi 2 (anti-TG2) di classe IgA, gli anti-endomizio (EMA) di classe IgA e gli anticorpi contro i peptidi deamidati della gliadina (DGP) di classe IgA e IgG. Gli anticorpi anti gliadina (AGA) sono stati i primi anticorpi ad essere messi in evidenza nei soggetti con MC (Berger 1958) e sono diretti contro un antigene esogeno, la  $\alpha$ -gliadina del glutine. La ricerca degli AGA IgA e IgG si effettua con metodo ELISA, ma questo test trova scarso impiego nella diagnosi di MC perché questi anticorpi possono trovarsi anche in soggetti non celiaci sani o affetti da altre patologie, come intolleranza alle proteine del latte vaccino (IPLV), malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI), eczema atopico, esofagite, gastrite, fibrosi cistica e sembrerebbero indice di un'aumentata permeabilità intestinale con maggiore passaggio di macromolecole, tra cui la gliadina, e successiva produzione di anticorpi (42).

I test sierologici sono correntemente utilizzati:

- per la diagnosi di MC in gruppi selezionati di pazienti secondo le linee guida ESPGHAN 2012
- per individuare i soggetti da sottoporre alla biopsia duodenale
- per monitorare la risposta alla dieta priva di glutine
- per lo screening di pazienti a rischio di sviluppare la MC.

## ➤ **Anticorpi anti-endomisio (EMA)**

Gli anticorpi anti-endomisio sono stati scoperti nel 1984 da Chorzelski, sono rivolti verso le proteine della matrice extracellulare, localizzate nel tessuto connettivo perivascolare che circonda le fibre muscolari lisce e sono quindi in grado di alterare l'interazione tra fibroblasti e cellule epiteliali, compromettendo la struttura del villo. Si evidenziano mediante immunofluorescenza utilizzando come substrato due particolari linee cellulari: l'endomiso della muscolatura liscia del terzo distale dell'esofago di scimmia (infatti solo il terzo inferiore è ricco di proteine non collageniche che reagiscono con gli EMA) o il cordone ombelicale umano (le fibrille reticoliniche che circondano le fibre muscolari lisce delle pareti della vena e delle arterie del cordone ombelicale umano sono sovrapponibili all'endomiso del terzo inferiore dell'esofago di scimmia). Il dosaggio degli EMA avviene mediante test ad immunofluorescenza, operatore-dipendente, che richiede rispetto ai metodi ELISA o RIA, esperienza nell'interpretazione dei risultati, inoltre il test ha costi elevati. Tale test è maggiormente specifico perché identifica gli anticorpi diretti contro gli epitopi extra-cellulari delle transglutaminasi, caratteristici della MC, e risulta negativo in quei casi in cui le IgA anti TG2 siano prodotte in seguito ad un danno tissutale o infiammazione, come può accadere in altre patologie. La specificità è superiore rispetto agli anticorpi anti-tTG e si aggira intorno al 100%, mentre la sensibilità è maggiore del 90%. Sono correlati con il grado di enteropatia e possono essere falsamente negativi nei soggetti con enteropatia lieve. La positività dipende, oltre che dall'età (sono meno sensibili al di sotto dei due anni) e dalla gravità e dall'estensione della lesione della mucosa intestinale, anche dall'associazione con il deficit di IgA. Secondo gli algoritmi dell'ESPGHAN la loro ricerca viene utilizzata quando si voglia evitare la biopsia

in pazienti sintomatici e con elevato titolo di IgA anti TG2, o può essere utilizzata nei pazienti con basso titolo di IgA anti TG2 prima di decidere se sottoporre il paziente a biopsia duodenale.

### ➤ **Anticorpi anti-transglutaminasi (anti tTG)**

Il fatto che gli EMA siano specifici nella diagnostica della MC ha fatto ipotizzare in passato che questo componente del tessuto muscolare liscio potesse contenere auto-antigeni bersaglio, coinvolti nella patogenesi della MC. Nel 1997 è stato dimostrato che la tTG è sicuramente l'auto-antigene più importante della MC (43). Le IgA anti-TG2 rappresentano gli autoanticorpi con maggiore sensibilità (superiore al 98%), motivo per il quale, nel sospetto di MC, la loro ricerca costituisce il primo step diagnostico. Bisogna però sottolineare che la positività delle IgA anti-TG2, sebbene a basso titolo, si può riscontrare in condizioni diverse dalla MC, quali alcune patologie autoimmuni o l'infezione da EBV. La differenza tra EMA e anticorpi anti-tTG è data dal fatto che i primi sono un complesso in cui sono compresi anche gli anticorpi anti muscolo liscio e gli ANA, mentre i secondi sono specifici per l'antigene transglutaminasi e quindi marcatori specifici per MC. I kit diagnostici in passato utilizzavano come antigene la TG da guinea-pig, mentre attualmente è utilizzato l'enzima umano ricombinante. Sono stati messi a punto dei POCTs (Point-of-care-tests) per la ricerca di anticorpi anti-tTG su goccia di sangue intero, ma non sono raccomandati per la diagnosi per la possibilità di falsi negativi (44).

Gli anticorpi anti-tTG, oltre ad essere usati per la diagnosi e lo screening della MC, sono i markers migliori per monitorare la compliance alla dieta senza glutine; considerando pazienti che andavano incontro ad un'ingestione

occasionale di glutine, Bazzigaluppi et al hanno evidenziato come fossero più frequentemente positivi gli anticorpi anti-tTG (misurati con RBA), rispetto agli EMA (45). Sappiamo, inoltre, da Troncone che gli EMA sono un marker inaffidabile per le trasgressioni dietetiche lievi, dal momento che solo 1/6 pazienti che ingerisce fino a 0.5 g/die di glutine presenta tali anticorpi nel siero (46).

### ➤ **Anticorpi anti-peptidi deamidati della gliadina (anti DGP)**

I rapporti intercorrenti tra peptidi della gliadina e transglutaminasi sono responsabili della formazione di nuovi epitopi antigenici, i peptidi deamidati della gliadina generati dalle TG2. La deamidazione sito-specifica di peptidi derivanti dall' $\alpha$ -gliadina aumenta il riconoscimento da parte degli AGA e questo suggerisce che i peptidi deamidati siano epitopi più specifici di quelli in forma nativa. La misurazione delle IgG anti DGP ha una maggiore sensibilità e specificità rispetto alla misurazione delle IgG anti-tTG come test di screening per la MC nei soggetti con deficit di IgA. Tali anticorpi andrebbero inoltre dosati nei pazienti in cui vi è un forte sospetto di MC, laddove si evidenzi la negatività di IgA anti-TG2 ed EMA, in particolare se si tratta di bambini di età inferiore a due anni. Tali anticorpi hanno sostituito i "vecchi" AGA, non più utilizzati perché dotati di scarsa specificità (47). Nei pazienti con negatività dei test per la ricerca degli anticorpi IgA anti-TG2 o DPG, laddove i valori di IgA siano nella norma, è ragionevole escludere la diagnosi di MC. Tuttavia nel valutare i risultati di tali test va sottolineato che la positività sierica di tali anticorpi è glutine-dipendente, motivo per il quale occorre verificare che il soggetto introduca con la dieta una sufficiente quantità di glutine.

## ➤ IgA totali

E' sempre raccomandata la determinazione delle IgA totali sieriche per individuare eventuali deficit selettivi, dal momento che vari studi clinici hanno rilevato un rischio di MC 10-20 volte più alto nei pazienti con deficit selettivo di IgA. In questi casi vengono naturalmente utilizzati gli anticorpi di classe IgG (tTG IgG, DGP IgG e EMA IgG1), che hanno dimostrato una sensibilità vicina al 100% in serie selezionate di pazienti con riconosciuto deficit di IgA (48).

Nella tabella 1 sono riportati i markers sierologici di MC e la relativa sensibilità e specificità nella diagnosi e nel follow-up (1).

Table 1. Serum Tests for the Diagnosis of Celiac Disease.*			
Test	Sensitivity (Range)	Specificity (Range)	Comments
	<i>percent</i>		
IgA anti-tTG antibodies	>95.0 (73.9–100)	>95.0 (77.8–100)	Recommended as first-level screening test
IgG anti-tTG antibodies	Widely variable (12.6–99.3)	Widely variable (86.3–100)	Useful in patients with IgA deficiency
IgA antiendomysial antibodies	>90.0 (82.6–100)	98.2 (94.7–100)	Useful in patients with an uncertain diagnosis
IgG DGP	>90.0 (80.1–98.6)	>90.0 (86.0–96.9)	Useful in patients with IgA deficiency and young children
HLA-DQ2 or HLA-DQ8	91.0 (82.6–97.0)	54.0 (12.0–68.0)	High negative predictive value

Tabella 1. Test sierologici per la diagnosi di MC (linee guida ESPGHAN 2012)

## BIOPSIA DUODENALE

Le nuove linee guida ESPGHAN del 2012 prevedono, in alcune condizioni, la possibilità di non praticare la biopsia duodenale e dettano regole precise per l'esecuzione e l'interpretazione della stessa biopsia. L'aspetto endoscopico della

mucosa duodenale dipende dal grado di severità della MC; la forma latente, ad esempio, non mostra alcuna alterazione macroscopica. Con il progredire della malattia le pliche mostrano un aspetto “scalopped”, dentellato e nelle forme severe sono diminuite in dimensione o numero e possono essere completamente assenti (fig.7). Può inoltre essere reperito un aspetto a mosaico dei vasi sanguigni. Questi aspetti macroscopici tuttavia non sono specifici della MC e spesso non sono identificabili alterazioni endoscopiche evidenti.

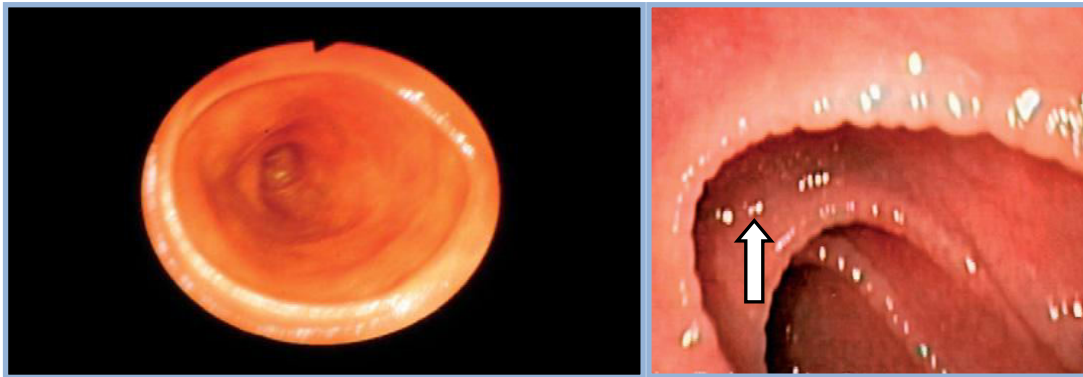


Figura 7. Pliche diminuite e con aspetto dentellato (freccia) in MC attiva

## ISTOLOGIA

E' raccomandato l'utilizzo dell'esofago-gastro-duodenoscopia (EGDS), con conseguente possibilità di raccogliere biopsie multiple, almeno 4 a livello della II o III porzione del duodeno e almeno una a livello del bulbo duodenale, che può rappresentare l'unica sede coinvolta dal danno intestinale (49). Viene

pertanto sconsigliato il ruolo della biopsia mediante capsula, benché meno invasiva, perché, raccogliendo un solo frammento bioptico, rischia di non identificare lesioni “patchy”. Lo sviluppo delle lesioni è un processo dinamico che può presentarsi in vari stadi; le lesioni formano, infatti, un continuum che va da una mucosa con architettura normale, laddove l’unica anomalia misurabile è l’aumento dei linfociti intraepiteliali, alla classica lesione piatta della mucosa intestinale.

### 1- INCREMENTO DEI LINFOCITI INTRAEPITELIALI (IELs)

Nell’intestino normale sono presenti 40 IELs/100 cellule epiteliali. Un numero maggiore di 40 è indice di un processo infiammatorio in corso. Gli IELs sono una sottopopolazione di linfociti T che differiscono per molti aspetti dalle cellule T della periferia e degli organi linfoidi e che, almeno in parte, sembrano svilupparsi nell’intestino e non nel timo. Tra le loro funzioni sono riportate l’attività citotossica contro epiteliumi tumorali, la secrezione di citochine e il rilascio di fattori di crescita epiteliali. Più del 95% sono linfociti T CD3+, CD2+ e circa il 70-90% sono CD8+. La maggior parte di essi presenta il recettore TCR- $\alpha\beta$  e solo una minoranza esprime la variante TCR- $\gamma\delta$ . Un aumento degli IELs è il primo e più sensibile segno degli effetti del glutine sulla mucosa ed è quindi un’importante caratteristica istologica che si può ritrovare anche isolata nella MC. L’aumento degli IELs è stato riconosciuto come segno di MC silente/latente o subclinica e si può riscontrare anche in corso di dieta priva di glutine, nei parenti di primo grado di pazienti celiaci e nella dermatite erpetiforme. Esso tuttavia non è indicatore specifico di MC, in quanto osservabile anche in altre enteropatie (giardiasi, IPLV, graft versus host disease) e talora reperibile anche in individui privi di patologia intestinale. Attualmente il numero di IELs considerato come limite superiore del range di normalità è 25 IELs/100 cellule

epiteliali. Gli IELs sono facilmente riconoscibili in sezioni colorate di routine con ematossilina-eosina. Al fine di evitare una sottostima del loro numero è importante l'applicazione di reazioni immuno-istochimiche, con l'utilizzo dell'anticorpo CD3, marker dei linfociti T. Normalmente la densità degli IELs nei villi diminuisce verso il terzo distale, mentre nei pazienti con MC questo pattern decrescente verso l'alto scompare, in quanto aumenta la densità degli IELs all'apice dei villi (50).

## 2- INFILTRATO INFIAMMATORIO DELLA LAMINA PROPRIA

La mucosa intestinale normale contiene un certo numero di linfociti e plasmacellule, come anche macrofagi e occasionalmente granulociti eosinofili, mentre non sono mai presenti granulociti neutrofili. Nei pazienti con MC il contenuto cellulare della lamina propria è aumentato, in particolare sono aumentate le plasmacellule che producono localmente anticorpi antigliadina e antiendomiso. I linfociti T sono aumentati in minor misura e si tratta sia di linfociti T citotossici CD8+, che di linfociti T helper CD4+. Possono inoltre essere presenti granulociti neutrofili ed eosinofili, così come mastcellule.

## 3- ENTEROCITI

Normalmente gli enterociti hanno un'altezza di 29-34 micron, con nucleo disposto alla base, brush border ben demarcato e netto PAS. Nei pazienti con architettura dei villi conservata gli enterociti appaiono normali, mentre essi possono diminuire in altezza negli stadi più avanzati della malattia. In particolare, nell'ambito di una mucosa appiattita, l'epitelio superficiale è spesso cuboide e basofilo e con citoplasma vacuolizzato.

#### 4- IPERPLASIA DELLE CRIPTI DI LIEBERKUN

Le cripte ghiandolari sono normalmente deputate ad una funzione rigenerativa, per cui è possibile riscontrarvi delle mitosi, in genere una ogni 1-2 cripte. La loro altezza è normalmente 150 micron. Nel processo dinamico di sviluppo della MC il primo cambiamento architetturale è costituito dall'iperplasia delle cripte. Inizialmente le cripte allungate sono ricoperte da villi normali, più tardi, quando la lesione è avanzata, da villi appiattiti o assenti. All'iperplasia si associa sovente un aumento dell'indice mitotico dell'epitelio criptico (numero medio di mitosi > 13-20/cripta).

#### 5- ATROFIA DEI VILLI

Normalmente i villi hanno un aspetto digitiforme, altezza superiore a 340 micron, con rapporto tra altezza del villo e quella delle cripte sempre a favore del villo (villo/cripta= 3/1 o più). La comparsa di atrofia dei villi rappresenta la lesione più grave della MC e può essere di grado variabile: lieve, severa, totale. Altre condizioni associate ad atrofia dei villi possono essere: IPLV, gastroenteropatia eosinofila, infezioni da Giardia Lamblia, linfoma intestinale, immunodeficienza primaria, enteropatia autoimmune, enteropatia da HIV, chemio e radioterapia.

### CLASSIFICAZIONE DI MARSH

La classificazione proposta dalle linee guida ESPGHAN per distinguere l'entità del danno intestinale è quella di Marsh, formulata nel 1992, che tiene conto del grado delle lesioni (51) (fig. 8).

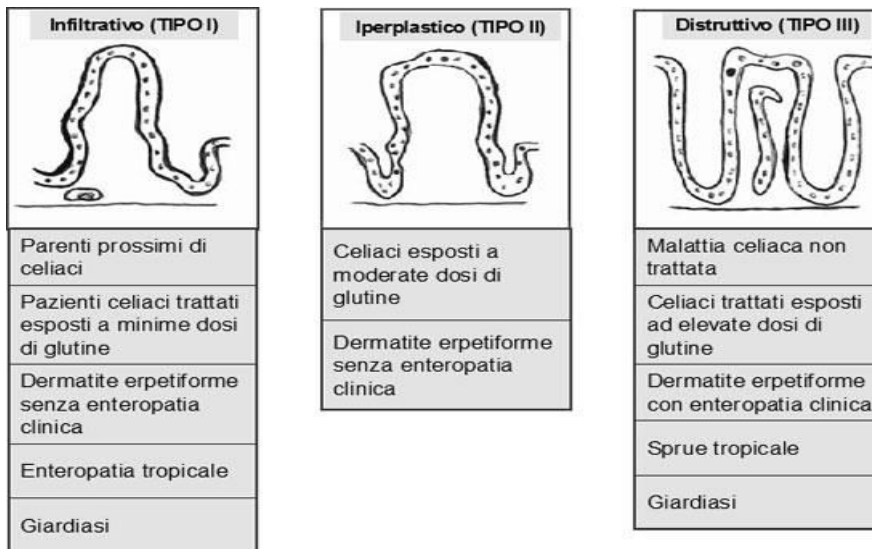
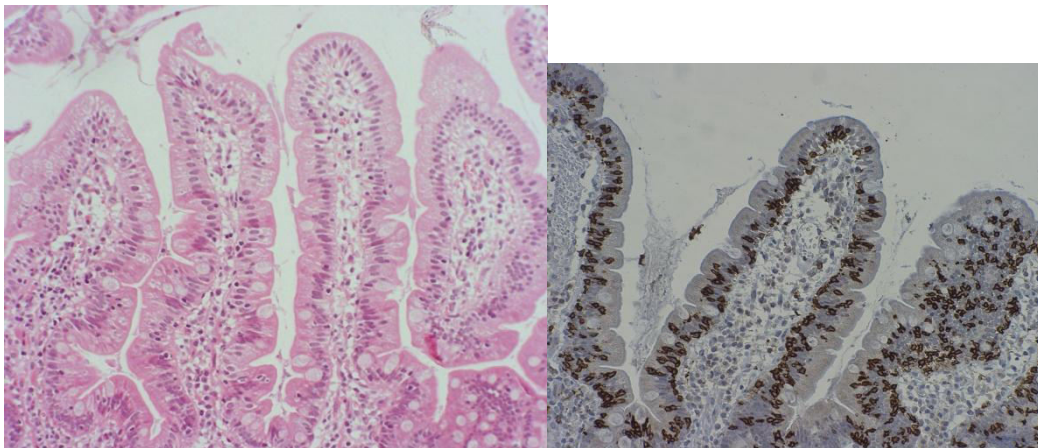


Figura 8. Classificazione di Marsh

**TIPO 0:** stadio pre-infiltrativo (mucosa normale).

**TIPO 1:** lesione di tipo infiltrativo, caratterizzata da normale architettura dei villi, normale altezza delle cripte e da un aumentato numero di IELs, con più di 25 linfociti intraepiteliali/100 cellule epiteliali (fig.9).



Ematossilina-eosina

Anti-CD3

Figura 9. Lesione di tipo I infiltrativo

**TIPO 2:** lesione di tipo iperplastico, caratterizzata da normale architettura dei villi, aumento del numero di IELs ed iperplasia delle cripte con incremento dell'indice mitotico (fig. 10).

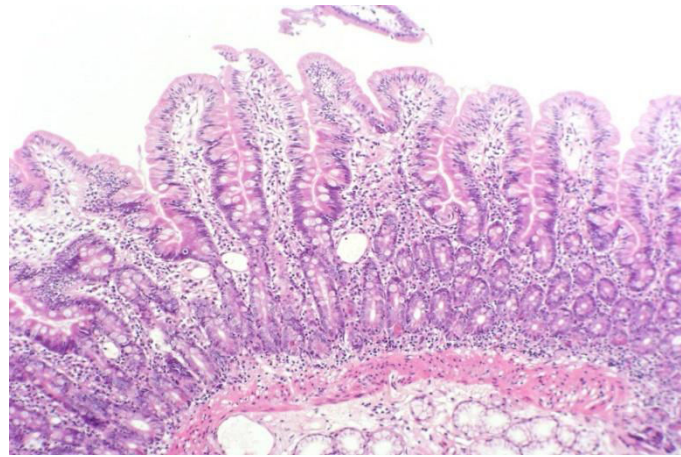


Figura 10. Lesione tipo II iperplastico

**TIPO 3:** lesione di tipo distruttivo, caratterizzata da atrofia dei villi, aumento dell'altezza delle cripte e aumento degli IELs, costituisce la vera lesione patognomica di MC.

**TIPO 4:** lesione di tipo ipoplasico. Questa lesione è rara, caratterizzata da una mucosa piatta con normale altezza delle cripte e normale numero di IELs. Si tratta di una lesione "storica", valutata in bambini con un grave quadro di malnutrizione.

Mentre il riscontro di lesioni di grado 2-3, associato a positività anticorpale, è altamente predittivo di MC, lesioni di grado 1 sono scarsamente specifiche e non patognomiche, potendosi riscontrare anche in una varietà di altre patologie. In questi casi metodiche diagnostiche aggiuntive per la diagnosi di MC sono la conta dei linfociti  $\gamma/\delta$  intraepiteliali mediante immunistochemica (la cui ricerca richiede tuttavia un frammento bioptico congelato in OCT) e la ricerca dei depositi di IgA anti-TG2 a livello mucosale in immunofluorescenza.

## CLASSIFICAZIONE DI OBERHUBER

Nella classificazione di Marsh, i casi con atrofia dei villi sono compresi in un unico gruppo (lesione di tipo 3 distruttiva), qualunque sia il grado di atrofia. Oberhuber e collaboratori hanno proposto nel 1999 una versione modificata della classificazione di Marsh, suddividendo il gruppo 3 in tre sottogruppi A-B-C, a seconda del grado di atrofia dei villi (52).

**TIPO 3A:** lesione caratterizzata da lieve appiattimento dei villi, aumento di altezza delle cripte e incremento del numero di IELs.

**TIPO 3B:** lesione caratterizzata da marcato appiattimento dei villi, aumentata altezza delle cripte e incremento del numero di IELs.

**TIPO 3C:** lesione caratterizzata da totale appiattimento dei villi, aumentata altezza delle cripte e incremento del numero di IELs.

Nel 2005 è stata proposta da Villanacci e Corazza una nuova classificazione, che diminuisce le categorie diagnostiche, con lo scopo di aumentare la riproducibilità della diagnosi tra patologi. Questa classificazione riunisce in uno stesso gruppo -GRADO A- le lesioni non atrofiche (tipo 1 e 2 di Marsh), in un altro gruppo -GRADO B- le lesioni con atrofia lieve e severa (tipo 3A e 3B di Oberhuber), e in un gruppo -GRADO C- le lesioni con completa scomparsa dei villi (3C Oberhuber). Secondo Villanacci il tipo 4 non si caratterizza tanto per le lesioni ipoplastiche, quanto per la dimostrazione della presenza di cloni di linfociti intraepiteliali aberranti comuni alla sprue refrattaria, alla digiuno-ileite ulcerativa e al linfoma intestinale a cellule T (53).

## ALGORITMI DIAGNOSTICI

Le nuove linee guida ESPGHAN prevedono due algoritmi diagnostici: uno per i pazienti sintomatici (fig.11), l'altro per quelli asintomatici (fig.12), ovvero pazienti appartenenti a gruppi a rischio che si sottopongono a screening. Nei pazienti con sintomatologia evocativa il primo test da eseguire è rappresentato dal dosaggio delle IgA anti-TG2, associato, se non è un dato già noto, al dosaggio delle IgA sieriche totali (o in alternativa al dosaggio delle DGP IgG). In caso di positività delle IgA anti-TG2, il successivo percorso diagnostico, stabilito dal gastroenterologo pediatra, dipende dai valori delle IgA anti-TG2. Se i valori sono inferiori a 10 volte i valori di riferimento ( $< 10$  ULN), per la conferma diagnostica è necessario eseguire l'esame istologico delle biopsie duodenali. Viceversa nei pazienti con valori di IgA anti-TG2 superiori a 10 volte i valori di riferimento ( $>10$  ULN), il successivo step diagnostico prevede il dosaggio degli EMA e la tipizzazione HLA, per ricercare il DQ2/DQ8. Dalle più recenti evidenze si deduce infatti che nei pazienti con valori elevati di IgA anti-TG2 e positività degli EMA, vi è una elevata possibilità di trovare atrofia dei villi intestinali, con un valore predittivo positivo che si avvicina al 100%. In questi casi, acquisita la positività di EMA e HLA, il gastroenterologo pediatra può discutere con i genitori e con il paziente la possibilità di iniziare direttamente la GFD, senza praticare preliminarmente la biopsia intestinale, monitorando il miglioramento clinico e la progressiva negativizzazione del valore di IgA anti-TG2.

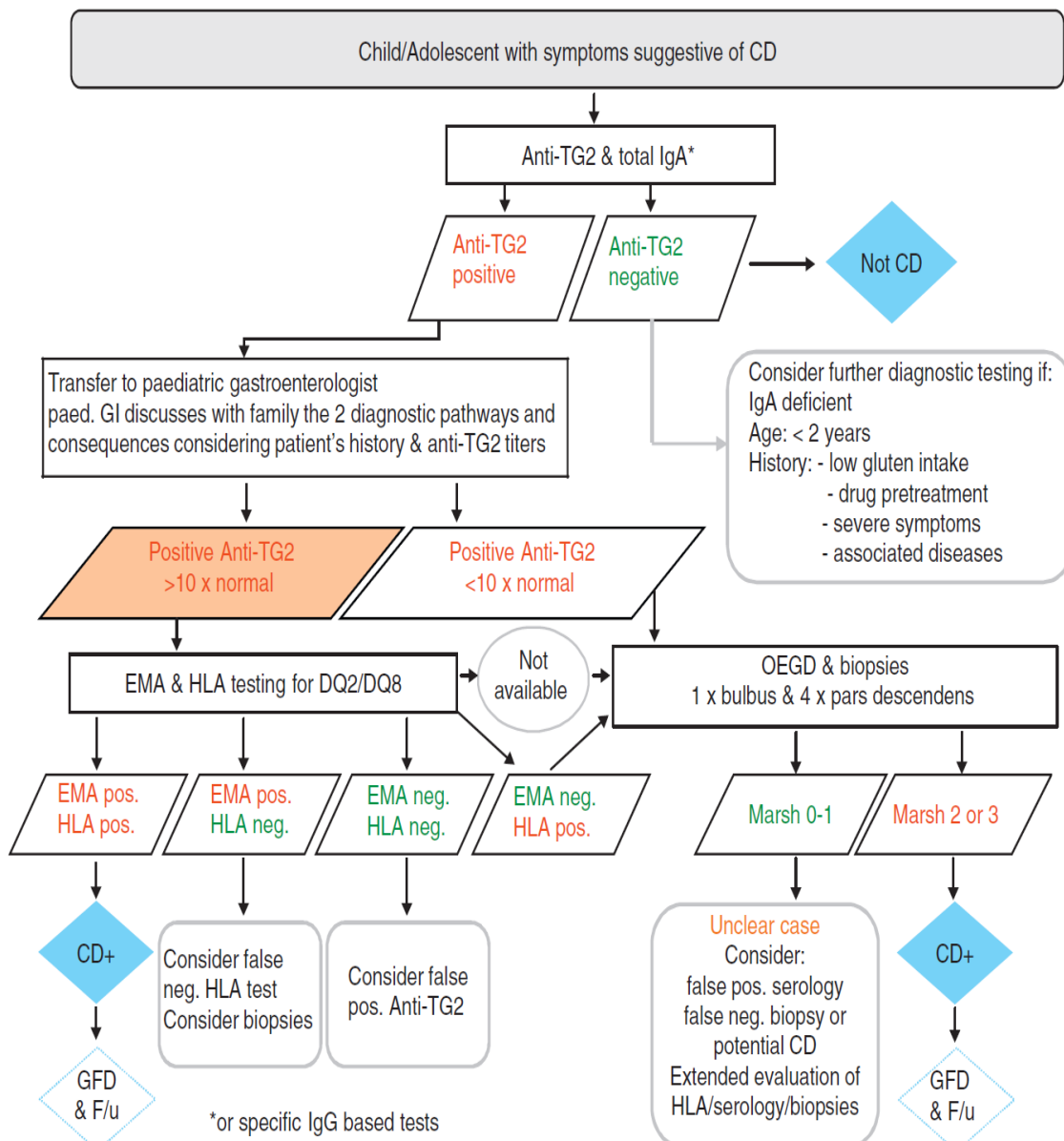


Figura 11. Algoritmo diagnostico per pazienti sintomatici (1)

Nei pazienti asintomatici nei quali venga identificata una positività delle IgA anti-tTG2, per la conferma diagnostica è invece sempre necessario ricorrere alla EGDS con biopsie multiple, indipendentemente dal valore di IgA anti-tTG2 riscontrato. Nei pazienti con condizioni associate a maggior rischio di MC il

percorso diagnostico dovrebbe partire dalla tipizzazione HLA, infatti solo nei pazienti con positività del DQ2/DQ8 risulta ragionevole il monitoraggio del possibile sviluppo di MC mediante dosaggio periodico delle IgA anti-tTG2.

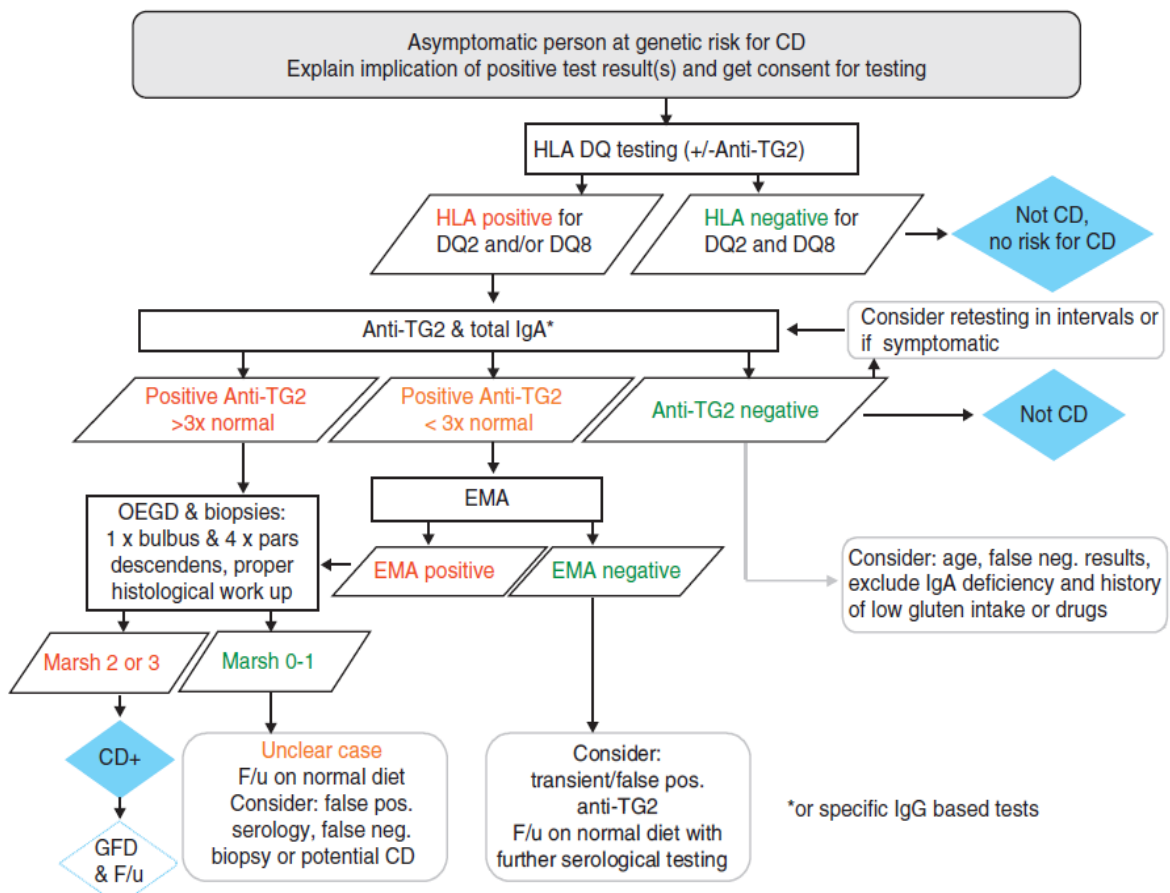


Figura 12. Algoritmo diagnostico per pazienti asintomatici (1)



## SITUAZIONI PARTICOLARI

### DEFICIT DI IgA

Nei pazienti con deficit di IgA la negatività delle IgA anti-TG2 non permette di escludere la MC. Pertanto, nel caso in cui il valore di IgA totali sia inferiore a 0.2 g/L, è necessario ricorrere al dosaggio degli anticorpi anti-TG2, EMA e DGP di classe IgG. Per la conferma diagnostica, indipendentemente dal valore delle IgG anti-TG2, è necessario ricorrere alla biopsia duodenale. Occorre sempre verificare la capacità del paziente di produrre IgA, dal momento che il deficit di IgA è una delle condizioni associate alla MC: il 10% dei soggetti con deficit di IgA è affetto da MC.

### MALATTIA CELIACA LATENTE/POTENZIALE

Questa condizione è definita dalla presenza di un assetto genetico compatibile con la MC ed eventualmente di autoanticorpi propri della MC, in assenza di atrofia intestinale, in presenza o meno di sintomi clinici associati. La decisione di iniziare una dieta priva di glutine va dunque ponderata caso per caso e uno dei principali fattori che guidano tale decisione è la presenza o meno di sintomi associati, che possono migliorare o regredire dopo l'inizio della dieta senza glutine. Nonostante manchino linee guida precise, è generalmente accettato proporre la dieta senza glutine ai pazienti sintomatici, mentre per quelli asintomatici, considerato il rischio elevato di evoluzione verso l'atrofia intestinale, è indispensabile, laddove il paziente sia mantenuto a dieta libera,

un regolare e stretto follow-up clinico e laboratoristico ed eventualmente anche istologico.

## **BAMBINI DI ETA'INFERIORE A 2 ANNI**

In questa fascia di età il dosaggio delle IgA anti-TG2 per la diagnosi di MC mostra una minore sensibilità. Circa un bambino celiaco su 10 non presenta aumento di questi anticorpi. In caso quindi di forte sospetto clinico e assenza di IgA anti TG2 è opportuno procedere al dosaggio delle IgG/IgA anti DGP.

## PROBLEMI APERTI E PROSPETTIVE

Le nuove linee guida ESPGHAN rappresentano un'importante novità sulla gestione della MC. A livello nazionale un tavolo di lavoro del Ministero della Salute sta procedendo ad una revisione delle linee guida nazionali, con conseguenti ricadute sulle modalità di certificazione e prescrizione (fig.13).

Dal punto di vista clinico-scientifico restano aperte alcune questioni:

- La sierologia ha assunto una crescente rilevanza nell'iter diagnostico, pertanto la qualità dei test necessita di essere perfezionata. La riproducibilità dei risultati con i diversi kit e la validità della soglia scelta pari a 10 volte i valori normali attendono di essere rivalutati.
- Esiste un problema di qualità sulle biopsie (soprattutto legata al loro orientamento) e di riproducibilità dei referti preparati in base alla classificazione di Marsh.
- La reale necessità di avere i dati HLA ed EMA per bypassare la biopsia duodenale deve essere ridiscussa sulla base dei dati che si stanno attualmente raccogliendo. Ciò vale anche per il mantenimento di due algoritmi separati per pazienti sintomatici e non.

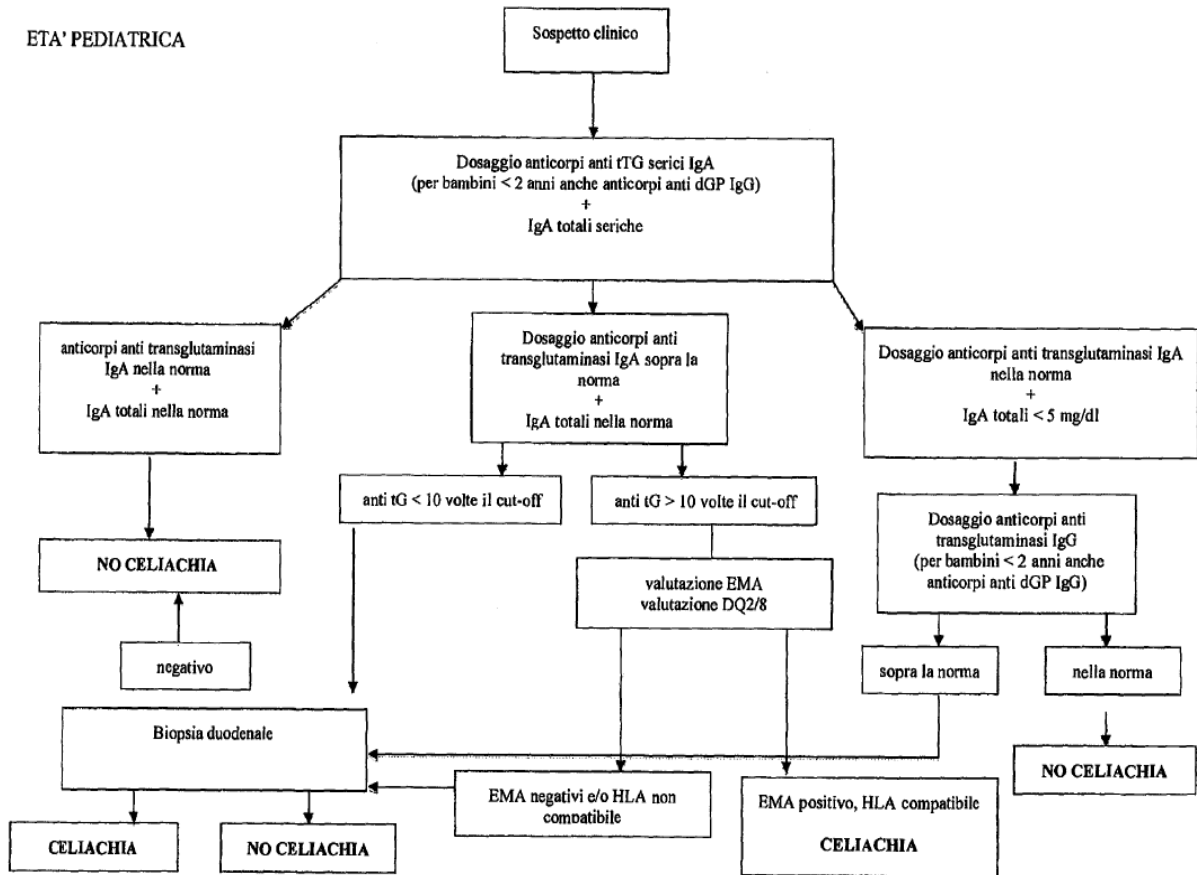


Figura 13. Algoritmo diagnostico proposto dal ministero della salute per l'età pediatrica

## TRATTAMENTO

L'unico trattamento ad oggi disponibile per la MC è la dieta priva di glutine, da seguire per tutta la vita, che consente sia il miglioramento sul piano clinico, sia una riduzione delle alterazioni istologiche, con un andamento da distale a prossimale. Benché sia raccomandata una politica di "zero tolleranza", è ampiamente riconosciuto che la sensibilità all'ingestione del glutine varia molto da paziente a paziente. Una recente meta-analisi ha stimato che una quantità di glutine inferiore a 10 mg/die è sicura in tutti i casi, mentre quantità superiori a 100 mg/die provocano nella maggior parte dei pazienti segni di riattivazione immunitaria e/o sintomi (54). Può essere utile ricordare che una tipica dieta occidentale contiene circa 30-40 gr/die di glutine. Quando un paziente sintomatico intraprende la dieta senza glutine solitamente le manifestazioni gastrointestinali si risolvono in poche settimane, con normalizzazione dei valori nutrizionali, miglioramento della crescita e normalizzazione dei parametri ematologici e biochimici. Il trattamento con la dieta priva di glutine inoltre fa in modo che l'eventuale ridotta mineralizzazione ossea regredisca. I pazienti sintomatici migliorano dunque il benessere fisico e psichico.

## COMPLIANCE CON LA DIETA

La compliance fra gli adolescenti è stimata tra il 56% e l'83%, fra gli adulti tra il 17% e il 45%, mentre la dieta è seguita solo da 1/4 dei pazienti diagnosticati con lo screening. Anche se la stretta aderenza alla dieta senza glutine è importante per la prevenzione delle complicanze della MC, recenti studi mostrano come

pazienti che non seguono la dieta esistono e che i pazienti con una compliance solo parziale o assente hanno una qualità di vita correlata alla salute comparabile con quella dei soggetti che seguono scrupolosamente la dieta (55).

## MONITORAGGIO E FOLLOW UP

Per valutare la risposta alla dieta priva di glutine vengono utilizzati i test sierologici; la prima classe di anticorpi che scompare è costituita dalle IgA anti tTG e poi dalle IgA EMA. Anche se la normalizzazione degli anticorpi anti tTG e EMA non garantisce necessariamente un'assoluta compliance alla dieta o il recupero delle lesioni della mucosa intestinale, generalmente non si ritiene necessario eseguire altre biopsie, tranne che in casi selezionati in cui persista la sintomatologia. Ci sono numerose evidenze a supporto del fatto che nell'adulto, anche in seguito ad una dieta priva di glutine correttamente impostata, la mucosa intestinale può non recuperare completamente. Come precedentemente detto, il marker più affidabile per monitorare l'aderenza alla dieta è rappresentato dalle IgA anti-tTG; sappiamo infatti che gli EMA sono un marker inaffidabile per le trasgressioni dietetiche lievi, dal momento che solo 1/6 pazienti che ingerisce fino a 0.5 g/die di glutine presenta tali anticorpi nel siero (46). E' raccomandata la valutazione degli anticorpi anti-tTG dopo 6 mesi di trattamento, per dimostrare una riduzione del titolo anticorpale, indicatore indiretto di aderenza alla dieta. La valutazione delle tTG è inoltre raccomandata negli individui con sintomi persistenti o ricorrenti in qualsiasi momento dopo l'inizio della dieta senza glutine. Negli individui asintomatici la misurazione

delle tTG deve essere effettuata ad intervalli di un anno per monitorare l'aderenza alla dieta.

## MALATTIA CELIACA REFRATTARIA

La Malattia Celiaca Refrattaria (MCR) è definita dalla persistenza o ricorrenza dell'atrofia dei villi intestinali, iperplasia delle cripte e aumento degli IEL, nonostante la dieta priva di glutine. Si tratta di un'enterite severa, sintomatica, che non risponde alla dieta di esclusione di glutine dopo 6 mesi, non giustificata da altre cause di enteropatia o da un linfoma intestinale. Gli studi sierologici sono in genere negativi in questa rara condizione e i pazienti possono richiedere un trattamento con steroidi e immunosoppressori (azatioprina, ciclosporina, anti-IL15, infliximab e cladribina), o anche un trapianto di midollo osseo autologo o eterologo (56). Esistono due tipi di MCR, il tipo 1 caratterizzato dall'assenza di IEL aberranti e il tipo 2 con IEL aberranti, che non esprimono i markers CD3, CD4, CD8, TCR. Questa forma di MCR può essere considerata come una condizione pre-maligna, che conduce allo sviluppo dell'enteropathy associated T-cell lymphoma (EATL), che si verifica nel 50% dei casi entro 5 anni. In caso di sviluppo di EATL la sopravvivenza a due anni è del 15-20%. La MCR è una condizione ad esclusivo appannaggio dell'età adulta e si riscontra nel 2-5% dei celiaci, più frequentemente in caso di diagnosi dopo i 50 anni e nei soggetti con aplotipo HLA-DQ2DR3 omozigote. La persistente atrofia dopo un congruo periodo di dieta aglutinata non sempre è sinonimo di celiachia refrattaria, ma può dipendere da una scarsa compliance alla dieta o da altre cause di atrofia dei villi, responsabili di un'errata diagnosi di MC ab initio: bacterial overgrowth, giardiasi, amiloidosi, gastroenterite

eosinofila, linfangectasia intestinale, ipogammaglobulinemia, enteropatia autoimmune, morbo di Crohn. Bisogna infine ricordare che, qualora i pazienti seguano scrupolosamente una dieta priva di glutine per 5 o più anni, il rischio di sviluppare un linfoma intestinale si allinea con quello della popolazione generale (57).

## LA SENSIBILITÀ AL GLUTINE (GLUTEN SENSITIVITY)

Con il termine non-celiac gluten sensitivity - sensibilità al glutine diversa dalla celiachia (NCGS), si definisce una sindrome caratterizzata dalla presenza di sintomi intestinali ed extra intestinali, in rapporto all'ingestione di alimenti contenenti glutine, in pazienti in cui la MC e l'allergia alle proteine del frumento IgE-mediata siano state escluse. E' ancora oggetto di dibattito, dalla prima descrizione di questa entità clinica avvenuta nel 2010, se si debba piuttosto parlare di non-celiac wheat sensitivity (NCWS), ma questo escluderebbe dalle cause alcuni cereali quali la segale e l'orzo. Non è stato ancora identificato con certezza il componente della dieta responsabile della NCGS, infatti, anche se sembra essere scatenata dal glutine, potrebbero essere coinvolte alcune proteine differenti dal glutine stesso, quali la "cereal protein amylase-trypsin inhibitors" (ATIs). Inoltre è possibile che nella comparsa dei sintomi associati alla NCGS possano svolgere un ruolo anche i FODMAPs (fermentable oligo-, di-, and mono-saccharides and polyols), ovvero i cibi contenenti carboidrati a catena corta (fruttani, galattani, fruttosio) e polioli (xilitolo, mannitolo, sorbitolo). Bisogna però tenere conto del fatto che i cibi ricchi di glutine, in particolare il grano, contengono quantità abbondanti di FODMAPs. I sintomi caratteristici della NCGS sono quelli della sindrome del colon irritabile, quali dolori addominali, gonfiore addominale, alterazioni dell'alvo variabili dalla diarrea alla stipsi e manifestazioni sistemiche quali "foggy mind", astenia, cefalea, dermatite. Recentemente la NCGS è stata inoltre messa in relazione con manifestazioni neurologiche e psichiatriche quali atassia, neuropatia periferica, depressione, ansia, allucinazioni (gluten psychosis). Rimane da chiarire anche il meccanismo patogenetico che può

coinvolgere un'iper-risposta dell'immunità innata all'ingestione di glutine, come anche un'esagerata permeabilità intestinale che dia luogo all'eccessivo assorbimento di peptidi del glutine. La latenza tra ingestione del glutine e comparsa dei sintomi è di solito breve (ore o giorni). E' stimato che la GS abbia una frequenza 6 volte maggiore rispetto alla MC. Questi soggetti non presentano atrofia dei villi intestinali, anticorpi anti tTG o EMA, ma piuttosto gli anticorpi AGA. Inoltre, mentre praticamente tutti i soggetti affetti da MC presentano l'HLA-DQ2 o DQ8, solo il 50% dei soggetti con sensibilità al glutine è positivo per questi alplotipi (58). Pazienti con tali caratteristiche sono noti da anni ma è necessario premettere che, nonostante un numero crescente di soggetti riferisca quadri di questo tipo, l'esistenza stessa della sindrome è ancora messa in dubbio da numerosi esperti. Più in particolare, il fatto che i disturbi (quasi tutti soggettivi) migliorino all'esclusione del glutine e peggiorino alla sua reintroduzione viene da alcuni considerato come derivante dal ben noto effetto placebo e nocebo delle diete da eliminazione e provocazione. D'altra parte studi "in cieco" sono resi difficili e scarsamente affidabili dalla riconoscibilità (mai adeguatamente testata "a priori") del glutine, quando aggiunto o mescolato ad altri alimenti. Tutti, pertanto, concordano sul fatto che i risultati finora ottenuti si riferiscono a pazienti presunti, ma non sicuramente portatori di tale sindrome, e sulla necessità di studi ulteriori e più approfonditi. Sul piano clinico è fondamentale combattere l'autodiagnosi ed evitare che il paziente abbia già escluso il glutine prima ancora di un consulto medico. Tale comportamento impedisce l'accertamento di una MC vera, con tutte le conseguenze del caso e rende assolutamente necessaria la riesposizione al glutine. In accordo con la definizione di NCGS, la prima cosa da fare è escludere un'allergia alle proteine del frumento attraverso la ricerca delle IgE specifiche mediante metodica di "ImmunoCAP" e, soprattutto, la MC attraverso la ricerca

degli anticorpi anti-tTG o EMA. Come già accennato, non esistono algoritmi standardizzati e validati per la diagnosi positiva di NCGS, che resta dunque una diagnosi di esclusione. In assenza di "biomarker" specifici, esiste largo consenso sull'opportunità di test dietetici controllati ed in "doppio cieco", che possano stabilire eventuali rapporti causa-effetto tra ingestione di glutine e comparsa della sintomatologia. Restano tuttavia da precisare modalità, dosi, tempi di somministrazione e criteri per la valutazione dei risultati. Qualora il medico ritenga di disporre di evidenze sufficienti per diagnosticare una NCGS, al paziente potrà essere cautelativamente consigliato di evitare il glutine, con la finalità di controllare i sintomi. Non vi sono evidenze che la NCGS sia soggetta a complicanze o di una sua conversione a MC. La NCGS può essere una condizione transitoria ed è pertanto necessario testare periodicamente la tolleranza al glutine. Nella tabella 2 sono riassunte le caratteristiche cliniche e laboratoristiche della MC, della NCGS e dell'allergia al grano.

	CD	NCGS	WA
Time interval between gluten exposure and onset of symptoms	Weeks–years	Hours–days	Minutes–hours
Pathogenesis	Autoimmunity (innate and adaptive immunity)	Immunity? (innate immunity?)	Allergic immune response
HLA	HLA-DQ2/8 restricted (~97% positive cases)	Not HLA-DQ2/8 restricted (50% DQ2/8-positive cases)	Not HLA-DQ2/8 restricted (35–40% positive cases as in the general population)
Autoantibodies	Almost always present	Always absent	Always absent
Enteropathy	Almost always present	Always absent (slight increase in IEL)	Always absent (eosinophils in the lamina propria)
Symptoms	Both intestinal and extra-intestinal (not distinguishable from GS and WA with GI symptoms)	Both intestinal and extraintestinal (not distinguishable from CD and WA with GI symptoms)	Both intestinal and extra-intestinal (not distinguishable from CD and GS with GI symptoms)
Complications	Co-morbidities, long-term complications	Absence of co-morbidities and long-term complications (long follow-up studies needed to confirm it)	Absence of co-morbidities, short-term complications (including anaphylaxis)

GI = Gastrointestinal; GS = gluten sensitivity; IEL = intraepithelial lymphocytes.

Tabella 2. Caratteristiche cliniche e laboratoristiche della MC, della NCGS e dell'allergia al grano



## MALATTIA CELIACA E SNC

Lo spettro clinico della MC è estremamente vario, sia per quel che riguarda l'età di esordio della malattia, che le modalità di presentazione clinica. Le manifestazioni cliniche della MC comprendono infatti anche sintomi extraintestinali, che possono potenzialmente coinvolgere qualsiasi organo e seguire o precedere i sintomi gastrointestinali e la diagnosi di MC. Nell'ambito delle manifestazioni extraintestinali recentemente l'attenzione è stata focalizzata sull'associazione della MC con patologie di interesse neurologico, come l'atassia cerebellare, la neuropatia periferica, il mioclono, la demenza, le mielopatie, le vasculiti, la cefalea, l'epilessia e le malattie demielinizzanti. La relazione tra manifestazioni di tipo neurologico e MC è stata descritta per la prima volta nel 1966 da Cooke e Smith (59). Nell'ambito della letteratura scientifica dal 1966 al 2015 si ritrovano 162 "original article" riguardanti l'associazione MC-NCGS-complicanze neurologiche. 36 articoli trattano di epilessia, 20 di atassia e degenerazione cerebellare, 26 di neuropatia, 20 di schizofrenia, 14 di depressione, 12 di cefalea e il resto di disturbi d'ansia, disturbo da deficit di attenzione/iperattività (ADHD), autismo, sclerosi multipla (SM), miastenia gravis, miopatia e alterazioni aspecifiche della sostanza bianca (SB). La maggior parte delle ricerche condotte non ha comunque scisso la MC dalla NCGS, rendendo difficile quantificare la vera prevalenza dei disturbi neurologici e psichiatrici associati a ciascuna condizione. I meccanismi che sottendono a questa associazione rimangono tuttora sconosciuti, come rimane da chiarire perché alcuni soggetti sviluppino sintomi a livello del SNC a differenza di altri e l'estrema variabilità di tali sintomi. La prevalenza delle manifestazioni neurologiche è infatti difficile da stimare per i diversi criteri adottati negli studi e per il fatto che tali aspetti vengono indagati soprattutto in

centri di III livello. I diversi meccanismi chiamati in causa nella patogenesi delle complicanze neurologiche della MC comprendono: (i) deficit di acido folico, vitamina E, vitamina D, vitamina B12, biopterina (ii) danno immunomediato da anticorpi cross-reagenti con epitopi del SNC (iii) danno tossico diretto da parte del glutine. Sono necessari ulteriori studi per capire se le manifestazioni neurologiche sono causate dalla MC o sono epifenomeni e se rispondono a una dieta priva di glutine. Le tTG sono espresse anche a livello cerebrale ed è stato dimostrato che la loro espressione aumenta in seguito al danno eccito-tossico. Sono state identificate negli ultimi anni le TG6, simili alle TG2 connesse con la MC e alle TG3 associate alla dermatite erpetiforme, ma principalmente espresse nei neuroni del SNC. E' stato inoltre proposto che l'acido glutammico decarbossilasi (GAD) agisca come antigene comune che lega la MC al coinvolgimento neurologico. Anche i soggetti con NCGS presentano complicanze neurologiche e psichiatriche e, dato l'assente coinvolgimento intestinale, queste ultime potrebbero essere le principali manifestazioni cliniche (60). Per quanto riguarda la patogenesi dei disturbi neurologici nei soggetti con GS è stata ipotizzata una cross-reattività tra epitopi presenti sulle cellule del Purkinje e i peptidi del glutine, inoltre gli AGA possono immunoreagire con la sinapsina I, una fosfoproteina espressa in molti neuroni del SNC e del sistema nervoso periferico, coinvolta nella formazione delle vescicole sinaptiche. Rimane infine da stabilire il ruolo della dieta priva di glutine nel trattamento e nella prevenzione delle manifestazioni neurologiche. Esiste un ampio studio prospettico di coorte del 2008 (61) che mette in evidenza come in realtà i bambini con sensibilità al glutine abbiano un basso rischio (1.79%) di sviluppare malattie neurologiche, ma comunque più alto rispetto alla popolazione generale (0.41%). Nello stesso studio si evidenzia come, nella popolazione di bambini esaminata, vi sia una bassa frequenza di

tutte le manifestazioni neurologiche associate alla sensibilità da glutine riportate negli adulti. In particolare nessun bambino (835 in totale) presentava disfunzione cerebellare. Sia che la neurotossicità si espliciti con meccanismi diretti, sia immunomediati, i bambini potrebbero essere protetti per la più breve durata della malattia o da una più stretta aderenza alla dieta. Un'altra ipotesi da prendere in considerazione è che lo spettro antigenico possa modificarsi nel tempo, in modo tale che le proteine della gliadina e gli epitopi presenti sulle cellule del SNC potrebbero essere riconosciuti dagli stessi anticorpi ma più tardi nel corso della vita. La prevalenza delle complicanze neurologiche nella popolazione adulta con MC è attestata al 26% e anticorpi correlati con la MC sono evidenziabili in una percentuale di pazienti con disfunzioni neurologiche variabile dal 16 al 57% (62). Come suddetto, lo spettro di disturbi neurologici associati alla MC è in continua espansione. Recentemente uno studio condotto su adulti affetti da MC di nuova diagnosi (30 pazienti) e su adulti che avessero seguito per almeno un anno la dieta senza glutine (30 pazienti), ha mostrato una maggior prevalenza di disturbi del sonno rispetto alla popolazione di controllo costituita da 30 volontari sani, fatta eccezione per la durata del sonno che era la stessa nei tre gruppi. Gli autori propongono che anche i disturbi del sonno debbano essere inclusi nello spettro di sintomi della MC. Per quanto il punteggio ottenuto con il Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI) infatti diminuisca dopo l'inizio della dieta senza glutine, rimane comunque più elevato rispetto ai controlli (63). Moccia et al hanno riportato una maggior prevalenza di Restless Legs Syndrome (RLS) in 100 soggetti adulti (18-49 anni) affetti da MC rispetto alla popolazione controllo (31% vs 4%). Non è stata trovata alcuna correlazione tra RLS e aderenza alla dieta senza glutine o assetto marziale (64).

## MALATTIA CELIACA E CEFALEA

Per quanto riguarda l'associazione cefalea-MC, pochi dati evidence-based sono disponibili per i pazienti in età pediatrica e l'incidenza riportata in letteratura è variabile a seconda dei criteri di selezione e delle caratteristiche dei pazienti. Recenti studi epidemiologici attestano una prevalenza della cefalea nei bambini del 10%, basata sui criteri dell'International Headache Society (HIS). La MC ha invece in Italia una prevalenza nella popolazione generale dell'1.2%, in molti casi in forma asintomatica (65). Inoltre non disponiamo di informazioni riguardanti la frequenza della cefalea come unica manifestazione nei bambini affetti da MC ed è controverso se la dieta priva di glutine possa influenzarne il decorso. Lionetti et al hanno riportato un'aumentata frequenza di cefalea nei bambini affetti da MC rispetto al gruppo di controllo (24.8% vs 8%). Gli stessi autori hanno descritto una maggior frequenza della MC in pazienti con cefalea (5%) rispetto alla popolazione pediatrica generale (66). Questi dati sono concordi con quelli presentati da Zelnik et al che attestano una prevalenza della cefalea in pazienti affetti da MC del 29.7% (67). Uno studio pubblicato nel 2008 su Cephalalgia ha dimostrato la presenza di anticorpi anti tTG nel 5.5% dei pazienti con emicrania (4/73) e solo nello 0.6% nel gruppo di controllo (68). Nenna et al nel 2016 hanno riscontrato una prevalenza di MC del 2.04% in una coorte di 883 pazienti con cefalea e hanno quindi concluso che la prevalenza della MC in bambini con cefalea cronica è doppia rispetto alla popolazione generale e che pertanto sarebbe utile inserire nel FU di questi bambini lo screening per MC, in particolare per i non responders alla terapia farmacologica (69). In tutti i pazienti in cui era stata posta la diagnosi di MC, la GFD ha prodotto un miglioramento della sintomatologia algica. La cefalea nei pazienti con MC può essere attribuita a vari meccanismi patogenetici come ad

esempio i fattori comportamentali (disagio psico-fisico), che sappiamo essere coinvolti nella fisiopatologia della cefalea. Del resto una condizione di malnutrizione si associa a carenze vitaminiche (B12, E, D, acido folico e piridossina) e/o minerali (magnesio) e a livelli più bassi di serotonina che possono contribuire alla genesi della cefalea. E' stato inoltre ipotizzato, per spiegare questa associazione, che un processo di tipo immuno-infiammatorio, con una disregolazione in favore delle citochine pro-infiammatorie, possa indurre alterazioni nel tono vascolare e che la dieta priva di glutine migliori la cefalea riducendo tale fenomeno.

### **Esperienza della Clinica Pediatrica di Siena:**

Andando a valutare la casistica della clinica pediatrica di Siena dal 1985 al 2011, la diagnosi di MC è stata posta in 310 soggetti, in accordo con i criteri ESPHGAN modificati del 1990, sulla base delle caratteristiche alterazioni istologiche evidenziate nei campioni bioptici duodenali. Mediante l'analisi dei dati desunti dalle cartelle cliniche, è emerso come solo 1/4 dei pazienti presentasse tra i sintomi diarrea e che la MC con sintomi tipici era presente in meno della metà dei casi, 47.5% (fig. 14). Il 24% dei pazienti aveva un'anamnesi positiva per cefalea, che nei 2/3 dei casi era inquadrabile come cefalea tensiva. Nel 58% dei casi di MC associata a cefalea i sintomi clinici presenti a corredo erano atipici e la cefalea poteva essere l'unico sintomo. Nel 69% dei casi la cefalea è migliorata con la dieta senza glutine. Quindi, possiamo concludere che la cefalea può essere considerata uno dei sintomi atipici di MC e può anche essere l'unica manifestazione clinica in individui affetti. I pazienti pediatrici con cefalea sono da considerarsi una popolazione a rischio di MC, meritevoli di approfondimento diagnostico mediante screening sierologico con dosaggio delle IgA TG2.

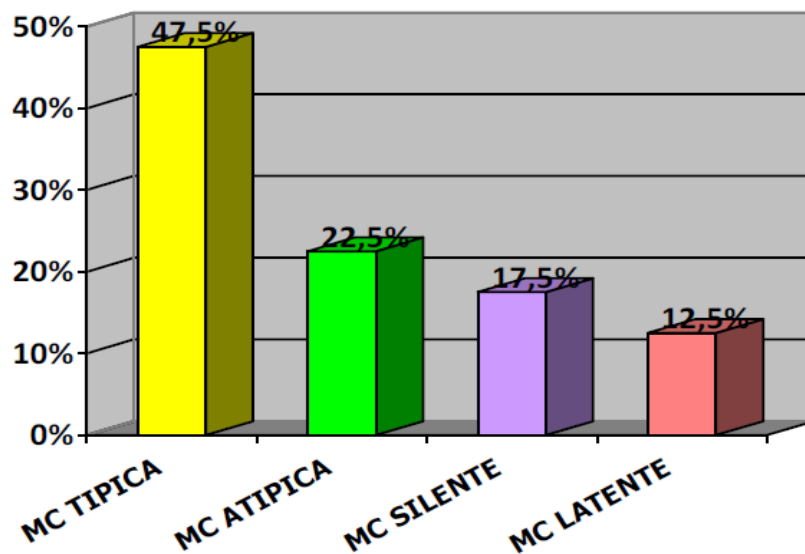


Figura 14. Presentazione clinica della MC nei pazienti della clinica pediatrica di Siena

## MALATTIA CELIACA ED EPILESSIA

E' ancora controversa l'associazione epilessia-celiachia. Numerosi studi riportano un'aumentata prevalenza dell'epilessia nei pazienti con MC e viceversa. In un ampio studio multicentrico condotto da Vascotto et al, la prevalenza dell'epilessia in una serie di 3969 pazienti con MC è risultata dell'1%, in linea con la prevalenza dell'epilessia nella popolazione generale (0.6-1.7%). L'analisi di diversi sottogruppi ha però evidenziato come la prevalenza dell'epilessia nella MC tipica fosse dello 0.79%, mentre nei soggetti con MC atipica dell'1.6% e nei soggetti con MC silente del 3.5%. Questo suggerirebbe che tanto più tardi viene posta la diagnosi di MC e tanto più prolungata è l'esposizione al glutine, maggiore è il rischio di sviluppare epilessia (70). Pratesi

et al (71), che hanno sottoposto a screening per MC 255 pazienti epilettici (119 bambini e 136 adulti), hanno messo in evidenza un'aumentata prevalenza di celiachia (2.3 volte più alta nei pazienti epilettici rispetto al gruppo di controllo). Luostarinen et al hanno individuato 5 casi di MC esaminando 199 pazienti epilettici (2.5%), mentre la prevalenza della MC nell'area di provenienza era 0.3% (72). Giordano et al hanno analizzato 272 bambini con epilessia (64 con epilessia idiopatica, 63 criptogenetica, 145 secondaria) e 300 controlli ricercando la presenza di AGA e anti-tTG di classe IgG e IgA, senza rilevare differenze significative nella prevalenza degli anticorpi anti-tTG (73). Altri studi (Ranua et al, 968 pazienti con epilessia) hanno dimostrato che la prevalenza degli anticorpi associati alla MC non differisce tra i soggetti con epilessia e il gruppo di controllo (74). Pengiran Tengah et al hanno valutato 801 pazienti celiaci senza trovare una maggiore prevalenza di epilessia rispetto alla popolazione generale (75). Le possibili spiegazioni, che stanno alla base di questi dati contraddittori, includono l'età dei pazienti in esame, il fatto che entrambe le condizioni sono piuttosto comuni nella popolazione generale, con una considerevole probabilità di casuale comorbidità, le differenti metodologie di analisi, il piccolo numero di soggetti esaminati, le differenze esistenti nel background genetico e nella distribuzione geografica e la selezione di pazienti con specifici tipi di epilessia. Da alcuni studi infine è emerso che una precoce diagnosi di MC migliorerebbe l'evoluzione dell'epilessia e potrebbe influire favorevolmente sullo sviluppo cognitivo. Mavroudi et al (76) hanno concluso che deve essere posta grande attenzione alla possibile coesistenza della MC nei bambini con epilessia e che i pazienti con epilessia idiopatica dovrebbero essere sottoposti ad indagini volte ad escludere una celiachia silente. La MC dovrebbe comunque essere presa in considerazione nella diagnosi differenziale di manifestazioni neurologiche di origine sconosciuta, anche se attualmente

non possiamo proporre uno screening per MC in tutti i pazienti con epilessia per i rapporti costi-benefici, ma andrebbero sottoposti a screening i pazienti con epilessia idiopatica, anche in assenza di manifestazioni gastro-intestinali. Recentemente è stata messa in luce una correlazione tra epilessia refrattaria del lobo temporale (TLE) e la presenza dell'HLA-DQ2 e di AGA (77). Ci sono studi che suggeriscono che un processo autoimmune sarebbe coinvolto nella genesi dell'epilessia del lobo temporale associata a sclerosi ippocampale, infatti in questi pazienti è stata notata un'aumentata prevalenza di Ab anti GluR3, anti GAD e un polimorfismo del gene dell'IL 1 $\beta$ . L'autoimmunità è dunque uno dei meccanismi proposti per spiegare lo sviluppo della sclerosi ippocampale, la cui eziopatogenesi rimane sconosciuta. In conclusione una recente metanalisi, che ha considerato 15 studi per un totale di 11772 partecipanti, ha dimostrato che il rischio relativo di epilessia nei soggetti con MC e di MC nei soggetti con epilessia, rispetto alla popolazione generale era di 2.1 e 1.7 rispettivamente e la differenza di rischio era prossima allo zero indicando che probabilmente siamo di fronte ad un'associazione casuale (78).

## CELIACHIA, EPILESSIA E CALCIFICAZIONI CEREBRALI

La prima descrizione, di Sammaritano et al, della sindrome CEC (celiac disease, epilepsy and cerebral calcification) risale al 1985 (79). Attualmente sono riportati 171 casi in letteratura. Una revisione della letteratura a partire dal 1996 permette di individuare tre gruppi di pazienti: (i) pazienti con CEC classica, (ii) pazienti con MC ed epilessia senza calcificazioni, (iii) pazienti con malattia celiaca e calcificazioni senza epilessia (80). Infine esiste un quarto gruppo che comprende i pazienti con epilessia e calcificazioni cerebrali senza celiachia (celiachia latente?). Se l'associazione tra MC, epilessia e calcificazioni cerebrali

è una mera coincidenza o una condizione genetica, o se l'epilessia e/o le calcificazioni cerebrali sono la conseguenza di una celiachia non trattata deve essere ancora dimostrato. Il genotipo HLA predisponente alla CEC è sovrapponibile a quello che predispone alla MC (HLA-DQ2). Le possibilità di ottenere un controllo dell'epilessia con una dieta priva di glutine sono inversamente proporzionali alla durata dell'epilessia prima della GFD e all'età di inizio della dieta. Vascotto et al (70) hanno dimostrato che la prevalenza dell'epilessia con calcificazioni cerebrali aumenta dallo 0.79% dei casi con celiachia tipica diagnosticata ad una età media di 5.9 anni, all'1.7% dei casi con MC silente diagnosticata all'età di 10 anni, suggerendo che l'epilessia e le calcificazioni cerebrali possono derivare da una MC non trattata. Sappiamo inoltre che la risposta immunitaria nella MC, sia umorale che cellulare, è regolata dall'espressione di citochine pro-infiammatorie (Th1 e Th2 correlate), come IL1, IL2, INF $\gamma$ , TNF $\alpha$ . Esperimenti su animali hanno evidenziato che le citochine circolanti possono avere azione pro-convulsivante con vari meccanismi, come riducendo il reuptake del glutammato da parte degli astrociti, interferendo con i recettori NMDA e riducendo la trasmissione GABAergica. Rimane ancora una questione irrisolta lo specifico coinvolgimento del lobo occipitale.

## ATASSIA DA GLUTINE

Nell'ultima decade è stata posta sempre maggiore attenzione all'atassia da glutine, cioè al coinvolgimento cerebellare nell'ambito della MC-GS, che comprende manifestazioni cliniche eterogenee, indipendenti dalle classiche lesioni intestinali che caratterizzano la MC. L'atassia da glutine era

originariamente definita come un'atassia cerebellare sporadica, associata alla presenza di AGA circolanti, in assenza di altra eziologia nota. Recentemente sono stati identificati nuovi e più specifici markers immunologici, anche se non immediatamente disponibili. L'atassia da glutine rende conto del 15% di tutte le atassie e del 40% delle forme idiopatiche. Clinicamente questi pazienti, che sono per lo più adulti, con un'età media di insorgenza dei sintomi di 53 anni, si presentano con andatura atassica e interessamento degli arti inferiori, quasi sempre in assenza di sintomi gastrointestinali e solo 1/3 presenta segni di enteropatia alla biopsia duodenale (81). Come la dermatite erpetiforme, l'atassia da glutine risponde ad una dieta priva di glutine, ma il grado della risposta dipende dalla durata dell'atassia, che a sua volta correla col danno irreversibile alle cellule del Purkinje. Questa è una delle fondamentali differenze tra MC, dermatite erpetiforme e atassia da glutine, infatti sia la cute che l'intestino hanno capacità rigenerativa, a differenza del tessuto nervoso. Per quanto riguarda la patogenesi dell'atassia da glutine numerosi dati suggeriscono che il danno sia di tipo immunomediato. I soggetti con atassia da glutine hanno anticorpi anti cellule del Purkinje circolanti e più del 50% dei pazienti presentano bande oligoclonali nel liquor cefalorachidiano (LCR), evocative di una sintesi anticorpale intratecale. Inoltre, la somministrazione di immunoglobuline per via endovenosa determina miglioramento clinico. Indagini postmortem di pazienti hanno evidenziato la perdita di cellule del Purkinje a livello della corteccia cerebellare ed è stata dunque ipotizzata l'esistenza di una cross-reattività tra epitopi presenti sulle cellule del Purkinje e derivanti dai peptidi del glutine. Nell'ambito della SB cerebellare sono stati evidenziati infiltrati perivascolari di cellule infiammatorie prevalentemente costituite da linfociti T. Rimane ancora sconosciuto l'autoantigene a livello del SNC. Recentemente Hadjivassiliou (82) ha identificato una nuova

transglutaminasi, TG6, che è espressa in maniera predominante a livello del SNC, ma non possiamo escludere che siano coinvolti altri antigeni. Rimane comunque in discussione il fatto che gli anticorpi collegati con la MC possano avere un ruolo patogenetico diretto nella atassia da glutine o piuttosto rappresentino un epifenomeno di un altro processo patologico. Nella **casistica della Clinica Pediatrica di Siena** nessuno dei soggetti con diagnosi di MC presentava atassia da glutine (0/310).

## MALATTIA CELIACA ED AUTISMO

La possibilità di stabilire un rapporto tra MC e autismo è stata ed è oggetto di controversie. E' stato suggerito che un processo autoimmune condiviso potrebbe unificare le due patologie, tramite un comune pattern fisiopatologico, infatti, nei soggetti con autismo sono stati evidenziati livelli aumentati di immunoglobuline, citochine e anticorpi anti elementi neuronali. L'ipotesi che la MC possa essere coinvolta nella patogenesi dell'autismo nasce dall'osservazione di un'alterata permeabilità intestinale in soggetti con tale condizione, che consentirebbe un anomalo assorbimento di molecole e un continuo ed aberrante passaggio di antigeni attraverso la barriera intestinale, in grado di evocare una reazione autoimmune e di interferire direttamente con il sistema degli oppioidi endogeno e la neurotrasmissione a livello del SNC (61). L'aumento della permeabilità intestinale e la teoria del "leaky gut", secondo alcuni autori, potrebbero rappresentare l'anello di congiunzione tra le due patologie. In letteratura è recentemente emerso come la sintesi della zonulina, precursore dell'aptoglobina 2 e proteina implicata nella regolazione della permeabilità intestinale, da parte di un gene sul cromosoma 16, sia un bio-

marker per patologie autoimmuni, neurologiche e alcune forme tumorali (83). Tuttavia, sono necessari studi che confermino l'esistenza di un deficit di barriera intestinale nei soggetti con autismo e ne chiariscano la fisiopatologia. Inoltre l'autismo è una patologia dello sviluppo cerebrale precoce ed è difficile stabilire la correlazione con un danno glutine-derivato. Pavone et al (84), esaminando 120 pazienti pediatrici con MC e 20 controlli e 11 pazienti con autismo e 11 controlli, non hanno evidenziato positività del test per autismo nei soggetti con celiachia (DSM-III-R) né, viceversa, casi di celiachia nei soggetti con autismo. Nell'ampia casistica di Ruggieri et al (61) nessuno dei bambini con sensibilità al glutine presentava tratti autistici. Nella **casistica della Clinica Pediatrica di Siena** nessuno dei soggetti con diagnosi di MC presentava autismo (0/310). Non ci sono quindi al momento dati che supportino l'ipotesi che l'autismo possa essere una manifestazione neurologica di MC e i pazienti con autismo non sono da considerarsi una categoria a rischio di sviluppare MC. Non esistono evidenze in favore di uno screening sierologico per MC in questa popolazione di soggetti, né in favore di restrizioni dietetiche. Benchè la dieta priva di glutine e caseina (GFCF diet) sia molto popolare, la sua efficacia deve essere ancora provata. Una Cochrane del 2008 ha riportato che solo due trial randomizzati controllati hanno investigato l'effetto della dieta GFCF sui bambini con autismo e l'evidenza dell'efficacia di questo tipo di regime dietetico è assai scarsa (85).

## MALATTIA CELIACA E DISTURBI DELL'APPRENDIMENTO

E' stato pubblicato uno studio condotto dalla Neuropsichiatria Infantile dell'ospedale di Rodewisch in Germania, in cui 67 soggetti affetti da ADHD, diagnosticato sulla base dei criteri del DSM-IV e dell' ICD-10, sono stati sottoposti a screening sierologico per la MC (EMA, tTG di classe IgA). 10 pazienti erano affetti da MC e dopo 6 mesi di dieta priva di glutine hanno mostrato un miglioramento dei sintomi connessi con l'ADHD. Questi dati indicano che sintomi ADHD-like potrebbero essere over-espressi in pazienti con MC non trattata e che la MC dovrebbe essere aggiunta alla lista dei disordini associati con una sintomatologia ADHD-like (86). Zelnick et al hanno individuato 23 soggetti affetti da ADHD su 111 pazienti con MC (67). Gli autori hanno proposto di considerare in età pediatrica uno spettro di disturbi neurologici potenzialmente associati alla MC più ampio e di severità minore rispetto a quelli descritti in età adulta, quali appunto cefalea, ipotonia, disturbi dell'apprendimento e ADHD. Pynnonen et al nel 2004 hanno condotto uno studio su 29 adolescenti con MC per verificare l'associazione con disturbi mentali, dimostrando una maggior prevalenza di disturbi depressivi maggiori rispetto alla popolazione di controllo (31% vs 7%), nel periodo precedente la diagnosi di MC e l'inizio della dieta senza glutine. In 2 pazienti erano presenti, oltre a disturbi depressivi maggiori, problemi di apprendimento. La prevalenza dei disturbi mentali dopo la diagnosi di MC era invece la stessa nei due gruppi e non erano presenti differenze significative per quanto riguarda il rendimento scolastico. Il meccanismo alla base dell'associazione tra MC e disturbi depressivi rimane da chiarire, per quanto l'ipotesi più accreditata sia quella di una disfunzione serotoninergica con riduzione dei livelli di triptofano (87). Una bassa prevalenza di disturbi cognitivi e di apprendimento in pazienti

pediatrici affetti da MC (2/835 casi) è stata invece riportata da Ruggieri et al (61).

### **Esperienza della Clinica Pediatrica di Siena:**

Fra i 310 soggetti con MC diagnosticati tra il 1985 e il 2011, abbiamo registrato due casi di dislessia e due di deficit di attenzione con problemi di apprendimento scolastico. La dislessia era presente in due bambine diagnosticate entrambe all'età di 9 anni e 7 mesi. Nel primo caso (E.V., 12 anni e 3 mesi) lo screening per MC è stato consigliato dalla neurologa che aveva in carico la bambina appunto per la dislessia, anche se, andando ad indagare retrospettivamente, è stata evidenziata una storia di dolori addominali ricorrenti, cefalea e disturbi del sonno (sonniloquio e frammentazione del sonno con frequenti risvegli). Non era presente alvo diarroico, né deficit staturò-ponderale. L'esame istologico della mucosa duodenale ha mostrato una lesione di tipo 3B secondo Marsh modificata da Oberhuber. Dall'anamnesi familiare è emerso un ritardo del linguaggio nello zio materno e familiarità per discalculia nel ramo paterno. L'EEG eseguito era nella norma. Dopo 10 mesi di GFD persistevano difficoltà all'addormentamento e sonniloquio e saltuari episodi di cefalea non meglio precisati. Nel secondo caso (E.C., 11 anni e 2 mesi) lo screening sierologico per MC è stato effettuato per il riscontro di ematochezia associata ad eccesso ponderale. L'esame istologico della mucosa duodenale ha mostrato una lesione di tipo 3C secondo Marsh modificata da Oberhuber. Dopo l'inizio della GFD non si sono più verificati episodi di ematochezia. Il problema della dislessia è emerso dopo 2 anni di GFD.

Per quanto riguarda il paziente affetto da deficit di attenzione (D.S., 14 anni e 7 mesi), la diagnosi di MC è stata posta in altra sede all'età di 10 anni e 4 mesi, in

seguito al riscontro di positività delle tTG IgA ed EMA, eseguiti per dolori addominali ed astenia. L'assetto HLA di classe II mostrava la presenza dell'eterodimero DQ2. L'esame istologico della mucosa duodenale ha documentato una lesione di tipo 3B secondo Marsh modificata da Oberhuber. A 11 anni il bambino è stato valutato da una Neuropsichiatra Infantile, a fronte di difficoltà scolastiche. Gli accertamenti strumentali (MRI, EEG) erano nella norma. La valutazione neuropsicologica ha mostrato un'organizzazione cognitiva nella norma per l'età (WISC-R Q.I. Tot. 104), senza discrepanze significative tra prove di performance e verbali. E' stata posta diagnosi di disturbo neuropsicologico interessante le competenze mnesiche e attentive e consigliata riabilitazione. D.S. è giunto alla nostra osservazione per la prima volta a Giugno 2012 e gli esami ematochimici effettuati mostravano tTG IgA borderline e EMA debolmente positivo, che potevano indirizzare verso una dieta senza glutine non rigorosa.

L'ultimo caso è quello di una bambina (M.F., 8 anni e 11 mesi) in cui la diagnosi di MC è stata posta all'età di 6 anni e 9 mesi, in seguito a due accessi al P.S. del nostro ospedale per dolori addominali e cefalea, che la bambina lamentava da circa due mesi con frequenza plurisettimanale, associati a calo ponderale. In seguito al riscontro di intensa positività delle tTG IgA e dell'EMA è stata programmata la biopsia duodenale che ha mostrato un quadro atrofico con lesione di tipo 3B secondo la classificazione di Marsh modificata da Oberhuber. E' stato inoltre evidenziato, dopo valutazione logopedica e psicologica, intraprese per le difficoltà di apprendimento scolastico riferite, un deficit cognitivo (WISC-R Q.I. Tot. 69), con netta prevalenza delle abilità pratico-concrete (Q.I.P. 81) su quelle di tipo teorico-astratto (Q.I.V. 60). Il background familiare si è dimostrato difficoltoso e la piccola paziente presentava disturbi

del sonno e dell'alimentazione pre-esistenti alla diagnosi di MC. Ai successivi controlli per il follow-up è emersa una scarsa compliance alle norme dietetiche.

In conclusione nella nostra casistica abbiamo riscontrato due casi di dislessia e due di disturbi dell'apprendimento scolastico. In uno dei due casi di dislessia (E.V.) era presente familiarità per discalculia e ritardo del linguaggio ed in uno dei due casi di problemi di apprendimento (M.F.) è emerso un contesto familiare non adeguato. Nel secondo caso di dislessia, la diagnosi è stata posta dopo 2 anni di GFD. La GFD ha dato luogo alla scomparsa dei sintomi gastro-intestinali presenti nei pazienti di cui sopra, ma le difficoltà scolastiche sono persistite, seppure con lievi miglioramenti, imputabili verosimilmente al percorso riabilitativo intrapreso. I nostri dati sono dunque concordi con gli studi in letteratura che riportano una bassa prevalenza di disturbi cognitivi e di apprendimento in pazienti pediatrici affetti da MC (61). La maggior parte degli studi presenti in letteratura è retrospettivo con un numero di pazienti e controlli, se presenti, limitato. Le evidenze conflittuali emerse possono essere imputate alla diversa definizione dei casi, al campione inadeguato, alla mancanza di dati sulla prevalenza della patologia neurologica in esame nella popolazione generale della stessa età e alla paucità dei dati riguardanti l'età pediatrica. Non sono disponibili dati sufficienti per stabilire un rapporto di causalità tra danno diretto o immunomediato da glutine e dislessia o deficit di apprendimento, né evidenze sufficienti a stabilire che la GFD migliori i sintomi neurologici in questione.

## MALATTIA CELIACA E NEUROPATIA PERIFERICA

E' stata descritta l'associazione tra neuropatia periferica e MC, almeno per quanto riguarda gli adulti, ma anche in questo caso esistono dati discordanti e conflittuali sulla relazione tra neuropatia periferica, glutine e carenza vitaminica. Luostarinen et al (72) hanno mostrato una prevalenza di neuropatia pari al 23% in pazienti adulti con MC. Nella popolazione pediatrica descritta da Cakir et al 2/27 pazienti con MC (7%) presentavano neuropatia periferica subclinica, documentata all' EMG (88). Ruggieri et al (61) hanno documentato il caso di una bambina (su 835 pazienti con MC; 0.1%) affetta da neuropatia periferica demielinizzante prevalentemente motoria, migliorata dopo l'avvio della dieta priva di glutine. Hadjivassiliou et al (89) hanno descritto 562 pazienti con complicanze neurologiche associate alla MC o alla NCGS (assenza di enteropatia) ed in entrambi i casi le manifestazioni neurologiche più frequenti erano l'atassia da glutine e la neuropatia periferica (80% dei casi sensitivo-motoria simmetrica). In letteratura prevalgono i report aneddotici e sono comunque scarsi gli studi di tipo caso-controllo sull'associazione MC-neuropatia e non sono reperibili studi prospettici, quindi, esiste soltanto una possibile associazione supportata da bassi livelli di evidenza. Nella **casistica della Clinica Pediatrica di Siena** nessuno dei soggetti con diagnosi di MC presentava neuropatia periferica (0/310).



## MALATTIA CELIACA E SCLEROSI MULTIPLA

La sclerosi multipla (SM) è una malattia infiammatoria autoimmune del SNC, a patogenesi multifattoriale. In alcuni casi può essere difficile distinguerla dal coinvolgimento del SNC nell'ambito di malattie autoimmuni sistemiche. In pazienti celiaci sono stati riportati disturbi "multiple sclerosis-like" e cefalea associati con lesioni della SB (90). In letteratura si ritrovano dati contrastanti in favore di un'aumentata prevalenza della SM nei pazienti con MC e viceversa e anche il possibile ruolo della GFD nei soggetti con SM è controverso. L'associazione tra MC e SM è stata per la prima volta contemplata nel 1965 da Shatin et al, in tempi in cui ancora non era chiara la patogenesi della MC (91). Da un punto di vista eziopatogenetico la SM e la MC hanno aspetti comuni di disregolazione immunitaria e sono entrambe patologie infiammatorie mediate dai linfociti T. Il fattore di trascrizione T-bet è considerato il principale regolatore della differenziazione linfocitaria verso Th1 e della produzione di interferon  $\gamma$ . E' stata documentata un'aumentata espressione di T-bet nei linfociti CD4 e CD8 circolanti e nei monociti dei soggetti con SM relapsing-remitting (RRMS), rispetto ai soggetti in remissione e ai controlli. Inoltre, una up-regulation di T-bet è stata riscontrata nella mucosa intestinale di pazienti con MC non trattata e in soggetti con MC e lesioni SM-like. L'interazione tra SM e MC potrebbe dunque risultare da un'amplificazione della risposta immunitaria Th1 mediata (92).

Un altro possibile anello di congiunzione tra MC e SM è stato individuato nell'osteopontina, una glicoproteina acida che si trova come proteina immobilizzata nella matrice extra-cellulare, ma anche come citochina solubile nei fluidi biologici, dove agisce come importante componente dei processi

infiammatori e della risposta immunitaria e che risulta essere iper-espressa nelle lesioni della SM. Questa citochina pleiotropica influenza lo sviluppo di molte malattie autoimmuni attraverso il suo effetto immunoregolatore, che favorisce l'azione pro-infiammatoria dei linfociti Th1 e Th17. Tale proteina è stata ritrovata a livelli aumentati nel plasma e nei tessuti intestinali dei soggetti con MC. In particolare sarebbe espressa dalle cellule dendritiche CD103 intestinali, che favorirebbero così l'infiltrazione degli organi target da parte dei linfociti Th1 e Th17 (93). In letteratura esistono pochi studi randomizzati controllati che abbiano preso in considerazione i rapporti tra MC e SM, al fine di stabilire se tale associazione è del tutto casuale o invece ha un nesso causale. La maggior parte dei dati disponibili deriva infatti da studi retrospettivi e report aneddotici. Batur-Caglayan et al (94) hanno riportato il caso di una donna di 45 anni che presentava lesioni intracraniche non propriamente caratteristiche di SM, trattata con interferon, che dopo sette anni di follow-up è stata indagata per MC, data la presenza di sintomi sfumati quali un'anemia ferro-carenziale e stipsi. La sierologia è risultata positiva e la diagnosi è stata confermata mediante EGDS con biopsia, che ha mostrato un grado 3B secondo la classificazione di Marsh modificata da Oberhuber. Ching et al (95) hanno riportato il caso di una bambina di 4 anni e 5 mesi che ha presentato un'encefalomielite disseminata multifasica (MDEM), seguita dalla comparsa di neurite ottica (NO). La storia clinica deponeva però anche per una GS, dato che gli episodi erano scatenati dall'ingestione di glutine, pertanto la bambina ha iniziato la GFD. La paziente presentava inoltre anticorpi anti-MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein) positivi e ha risposto alla terapia iniziale con immunoglobuline, mentre la remissione è stata ottenuta con l'azatioprina. Hadjivassiliou et al (90) hanno sottolineato che le lesioni demielinizzanti, SM-like, ritrovate in pazienti con MC-GS, sono diverse da quelle della SM, perché

più periferiche e confluenti e hanno ipotizzato che la NCGS possa essere alla base di queste forme atipiche di SM, in particolare laddove l'atassia è il sintomo preminente. Sono descritte in letteratura anomalie della SB "aspecifiche", documentate alla RMN encefalo, in soggetti con MC. 33 soggetti con MC istologicamente documentata, valutati dal neurologo per disturbi dell'equilibrio, disturbi della sensibilità e cefalea, hanno eseguito RMN encefalo e sono stati comparati con una popolazione di controllo. I soggetti con disturbi dell'equilibrio presentavano un ridotto volume cerebellare rispetto ai controlli. I soggetti con MC e disturbi neurologici inoltre presentavano una riduzione del volume della sostanza grigia, in particolare a livello degli emisferi cerebellari. Nessuno dei controlli presentava anomalie della SB a differenza di 12/33 soggetti con MC. La prevalenza delle anomalie della SB era maggiore fra i soggetti con cefalea e fra i soggetti con scarsa compliance alla GFD, mentre non vi erano differenze volumetriche fra soggetti che seguivano rigorosamente la GFD e soggetti che invece presentavano scarsa compliance (96). Diversi autori suggeriscono comunque che la MC debba essere tenuta in considerazione in caso di lesioni della SB ad eziologia non chiara, anche in assenza di sintomi gastrointestinali. Paul et al (97) hanno invece valutato la presenza degli anticorpi specifici per la MC in 86 pazienti con lesioni della SB a livello cerebrale e/o midollare, con NO, in pazienti affetti da SM e controlli sani. La percentuale di soggetti positivi alla sierologia per celiachia non differiva tra i soggetti con SM, fra quelli con lesioni della SB non imputabili a SM, tra i soggetti con NO e i controlli sani. Gli autori hanno concluso che non è al momento utile inserire lo screening sierologico per MC nel protocollo di follow-up per le lesioni della SB, della SM e della NO, a meno che non vi sia una sintomatologia evocativa.

Nicoletti et al (98) hanno sottoposto a screening per MC 217 pazienti con SM e 200 controlli non affetti da patologie neurologiche. Nessuno dei 217 pazienti

presentava AGA, EMA, anti-tTG, che erano invece presenti in uno soltanto dei controlli, risultato poi affetto da MC documentata istologicamente. Pertanto gli autori non supportano l'ipotesi di un aumento della frequenza della MC fra i soggetti con SM.

Anche Borhani Haghghi et al (99) non hanno riscontrato aumento della frequenza degli AGA IgA e IgG in 161 soggetti con SM rispetto ai controlli. In nessuno dei casi con positività degli AGA IgG o IgA è stata poi confermata la diagnosi di MC con tTG e istologia. Alle stesse conclusioni sono giunti de Oliveira et al (100), che hanno valutato 249 soggetti con SM, 37 con NO e 96 con mielite idiopatica, trovando un solo paziente con SM e uno con mielite positivi per tTG e EMA.

All'opposto, Rodrigo et al (101) hanno riportato una frequenza aumentata di MC (11.1%), confermata istologicamente, in 72 soggetti con SM. 6/8 pazienti presentavano sintomi gastrointestinali, quali stipsi e reflusso gastro-esofageo (RGE) e un solo un paziente presentava diarrea cronica. La risposta alla GFD è stata buona con risoluzione dei sintomi gastrointestinali e miglioramento anche dei sintomi neurologici. In particolare nessuno degli 8 pazienti con SM e MC presentava atassia. Gli autori hanno inoltre evidenziato un'aumentata frequenza di MC nei parenti di primo grado dei soggetti con SM (23/123 soggetti). Ludvigsson et al (102) hanno viceversa valutato la comorbidità MC-malattie neurodegenerative/neuro-infiammatorie in 14000 pazienti con MC e 70000 controlli, utilizzando il registro nazionale svedese. La MC era associata soltanto ad una polineuropatia tardiva e non era associata a SM, Parkinson, Alzheimer, atassia ereditaria, malattia di Huntington, miastenia gravis, atrofia muscolare spinale. Altri studi condotti su ampie serie di pazienti con SM hanno condotto a conclusioni opposte. I risultati presenti attualmente in letteratura sono dunque inconsistenti e non è ancora chiaro se l'aumentata prevalenza

della MC in soggetti con SM, documentata in alcuni studi, sia un epifenomeno o piuttosto faccia parte dell'ampio spettro sintomatico della stessa malattia. Inoltre molto spesso lo screening per MC viene effettuato solo alla diagnosi, o comunque una sola volta nell'ambito del follow-up di questi pazienti, che invece potrebbero sviluppare MC o viceversa disturbi neurologici in tempi successivi. Lo screening per MC infine viene eseguito in caso di sintomi o esami ematici indicativi e non a priori nell'ambito della popolazione di soggetti affetti da SM.

Anche i fattori genetici svolgono sicuramente un ruolo importante nell'associazione MC-SM. In particolare la MC è stata una delle prime patologie per la quale sono stati applicati gli studi GWAS (genoma wide association studies). I nuovi loci non-HLA associati alla MC contengono geni implicati nella regolazione della risposta immunitaria, avvalorando l'ipotesi che lo sviluppo dei linfociti T e l'immunità innata sono fattori che concorrono allo sviluppo della MC. Un importante risultato scaturito da questi studi è rappresentato dall'evidenza che esiste un'ampia sovrapposizione tra loci non-HLA associati alla MC e loci coinvolti in altre patologie autoimmuni. Questa osservazione ha dato luogo allo sviluppo di una piattaforma array chiamata Immunochip, in grado di tipizzare contemporaneamente molte varianti in geni selezionati per la replicazione ed il mappaggio dettagliato delle regioni genomiche risultate associate alla MC nei GWAS (103). La tipizzazione genetica mediante Immunochip ha consentito di individuare altri loci che contribuiscono al rischio di sviluppare la MC, arrivando ai 41 loci non-HLA attualmente noti e a 58 diversi single-nucleotide polymorphisms (SNP). L'analisi mediante Immunochip è stata condotta su almeno altre 13 patologie autoimmuni, tra cui la SM, mostrando come la maggior parte dei 41 loci non-HLA associati alla celiachia si sovrappongano ad almeno uno dei loci associati agli altri fenotipi (fig. 15).

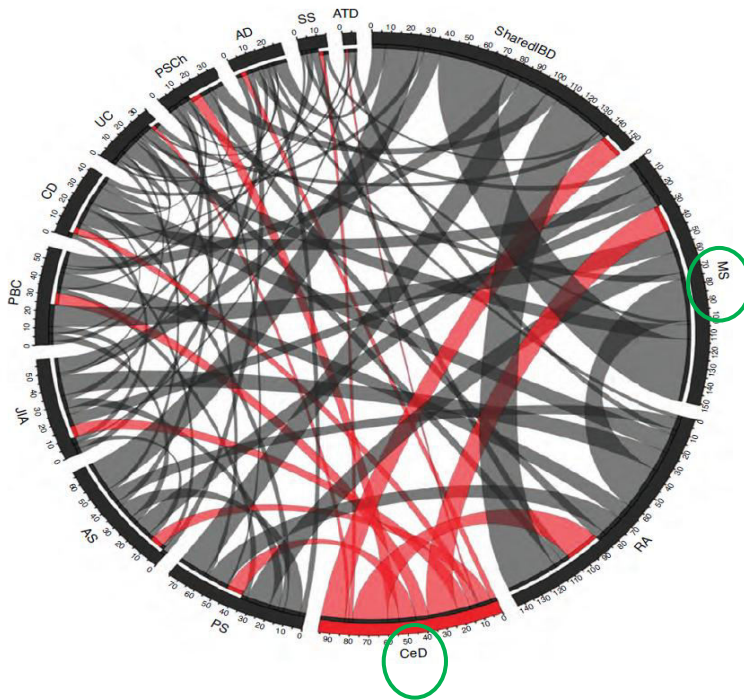


Figura 15. Risultati dell'ImmunoChip che comprende loci non-HLA condivisi tra MC e altre 13 patologie autoimmuni. La MC condivide almeno un locus con ciascuna delle altre 13 patologie (nastri rossi). Lo stesso

vale per le altre patologie analizzate. I numeri sull'anello esterno rappresentano il numero totale di loci condivisi per ciascuna patologia e ogni collegamento rappresenta il numero assoluto di loci condivisi tra due patologie. Ogni locus può essere condiviso tra più patologie. Gli altri loci rappresentati riguardano la tiroidite autoimmune (ATD), la sclerosi sistemica (SS), la dermatite atopica (AD), la colangite sclerosante primaria (PSCh), la colite ulcerosa (UC), il morbo di Crohn (CD), le malattie infiammatorie intestinali con loci condivisi tra CD e UC (shared IBD), la cirrosi biliare primaria (PBC), l'artrite idiopatica giovanile (JIA), la spondilite anchilosante (AS), la psoriasi (PS), l'artrite reumatoide (AR), la sclerosi multipla (MS).

## **SCOPO DEL LAVORO**

La comorbidità tra MC e malattie demielinizzanti-SM è descritta sin dagli anni '60. I dati disponibili attualmente in letteratura sono contrastanti e non è chiaro se l'associazione tra MC e SM riportata in alcuni studi sia del tutto casuale o abbia invece implicazioni causali.

L'obiettivo di questo lavoro è quello di valutare se esiste un aumento della prevalenza di MC fra i pazienti con SM rispetto alla popolazione generale. Considerando che questa associazione è descritta pressoché esclusivamente in età adulta, abbiamo valutato retrospettivamente la frequenza della MC nei soggetti adulti con SM afferenti a tre diverse strutture ospedaliere della Toscana: Prato, Firenze, Siena.

**-Prato:** Unità Operativa di Neurologia-degenza cerebro-vascolare, Centro per la Sclerosi Multipla, responsabile dott. Mario Falcini;

**-Firenze:**

1. Centro di Riferimento Regionale per il trattamento della Sclerosi Multipla-SOD Neurologia II, AOU Careggi, diretto dal Prof. Luca Massacesi;
2. Centro Sclerosi Multipla-SOD Neurologia I, AOU Careggi, diretto dalla Prof.ssa Maria Pia Amato;

**-Siena:** UOC Neurologia e Neurofisiopatologia clinica diretta dal Prof. Alessandro Rossi -Centro per la Sclerosi Multipla, responsabili Dott.ssa Monica Ulivelli, Dott.ssa Sabina Bartalini.

## **MATERIALI E METODI**

Abbiamo valutato retrospettivamente la frequenza della MC in pazienti adulti afferenti a quattro centri di riferimento per la cura della SM di tre aziende ospedaliere della Toscana: AOU Policlinico Santa Maria alle Scotte, Siena - AOU Careggi, Firenze - Nuovo Ospedale di Prato, Azienda USL 4 Prato. I dati clinici e laboratoristici sono stati desunti dalle cartelle cliniche dei pazienti. I dati mancanti sono stati raccolti mediante interviste telefoniche. La diagnosi di SM/NO/mielite nei pazienti considerati è stata posta tra il 1985 e il 2015.

Il numero di pazienti con SM seguiti era rispettivamente di 400 per la Neurologia di Siena, 450 per la Neurologia di Prato, 800 per la Neurologia II di Careggi e 400 per la Neurologia I di Careggi. Per la diagnosi di SM sono stati considerati i criteri diagnostici di Mc Donald (104). I pazienti con neuromielite ottica (NMO) sono stati caratterizzati in base ai criteri di Wingerchuk et al (105).

Nelle cartelle cliniche sono state ricercate informazioni riguardanti la modalità di presentazione clinica della SM, la frequenza e l'intensità delle ricadute, le terapie farmacologiche effettuate e l'associazione con altri sintomi e/o altre patologie. I pazienti che presentavano sintomi gastrointestinali o extra-gastrointestinali, evocativi di MC, e/o che presentavano carenza marziale o vitaminica, sono stati sottoposti a screening sierologico per MC, mediante il dosaggio degli anticorpi anti tTG e EMA e/o DGP, previo dosaggio delle IgA totali. In alcuni casi sono stati dosati anche gli AGA, sia IgG che IgA, che non abbiamo tenuto in considerazione, data la scarsa sensibilità e specificità di questo test (42). I soggetti che presentavano sierologia positiva sono stati sottoposti a EGDS con biopsie multiple per la conferma istologica. Gli EMA

sono stati determinati mediante immunofluorescenza indiretta (IFL), mentre gli anticorpi anti tTG e DGP mediante metodo ELISA. I livelli di tTG erano considerati nella norma se inferiori a 7 AU/ml. La diagnosi di MC è stata posta in accordo con i criteri ESPGHAN modificati del 1990, sulla base delle caratteristiche alterazioni istologiche evidenziate nei campioni bioptici duodenali e, dopo il 2012, sulla base delle nuove linee guida ESPGHAN del 2012. In tutti i casi è stata eseguita la EGDS con biopsie multiple. E' stata considerata una prevalenza di MC nella popolazione generale dell'1%, date le differenze regionali in Europa, dove la prevalenza varia dallo 0.3% in Germania al 2.4% in Finlandia (106).

## **ANALISI STATISTICA**

Le variabili quantitative sono state descritte come numeri, medie, deviazione standard (SD) e percentuali. La significatività statistica è stata calcolata su tabelle di contingenza mediante il test del Chi Quadro, indice statistico di dispersione, che consente di verificare l'uguaglianza delle frequenze osservate nei diversi gruppi. Quando necessario, per la bassa frequenza dell' evento, abbiamo usato il test esatto di Fisher. Valori di  $p < 0.05$  sono considerati significativi.



## CASISTICA

- Firenze, AOU Careggi, Centro di Riferimento Regionale per il trattamento della Sclerosi Multipla-SOD Neurologia II, diretto dal Prof. Luca Massacesi: 7 pazienti con MC/800 pazienti con SM.

**CG (41 anni):** la diagnosi di MC è antecedente a quella di SM ed è stata posta a 29 anni. Il paziente ha eseguito esami ematici di controllo che hanno mostrato anemia ferro-carenziale, per cui è stato prescritto screening sierologico per MC con dosaggio delle tTG-IgA e delle IgA totali, risultato positivo. In seguito la diagnosi è stata confermata dalla EGDS con biopsie multiple, che ha evidenziato un grado 3A di Marsh modificato da Oberhuber. Il paziente segue la dieta priva di glutine rigorosamente. Non ha eseguito l'indagine genetica per la ricerca dell'HLA predisponente, per quanto desumibile dai dati presenti nella cartella clinica e dalla intervista telefonica. Interrogato telefonicamente sulla presenza di sintomi prima dell'inizio della dieta, ha riferito solo saltuaria pirosi gastrica. A 33 anni (2008) sono comparse parestesie agli arti inferiori ed ipoestesia distalmente a D7, associate a deficit del visus, regredite con la somministrazione di boli di metilprednisolone. La RMN encefalo e midollo era positiva per lesioni demielinizzanti in T2 ed erano presenti nel liquor bande oligoclonali (BO). E' stata dunque posta diagnosi di RRSM, trattata con boli di metilprednisolone durante le riacutizzazioni, poi con azatioprina, sospesa per la comparsa di neutropenia, e successivamente con interferon  $\beta$  e glatiramer acetato, senza ottenere un completo controllo della malattia. Nel 2010, a 35 anni, il paziente ha presentato due riattivazioni del virus varicella-zoster (VZV) e

agli esami ematici è stata confermata la leucopenia. All'immunotipizzazione linfocitaria è stata evidenziata una riduzione di tutte le componenti T, con normale rappresentazione della componente B e NK, facendo ipotizzare un'alterazione del sistema immunitario nella componente cellulo-mediata. Dato il non completo controllo della malattia è stata intrapresa terapia con anticorpo monoclonale natalizumab.

**AL (60 anni):** all'età di 28 anni (1985) è comparsa NO all'occhio sx, in seguito si sono presentate mieliti recidivanti con interessamento della sensibilità e della motricità degli arti inferiori, in alcuni casi anche con evidenti segni di interessamento midollare (problemi vescicali tipo minzione imperiosa). La RMN encefalo e midollo mostravano lesioni encefaliche a livello della SB sottocorticale e a livello di C4, C6, D1. La rachicentesi era nella norma. I potenziali evocati visivi (PEV) mostravano alterazioni della conduzione lungo le vie ottiche di sx e i potenziali evocati motori (PEM) alterazioni della trasmissione lungo le vie piramidali. Gli anticorpi anti acquaporina 4 erano negativi. Inizialmente il paziente è stato seguito in altra sede. La diagnosi di MC è stata posta a 51 anni, per screening familiare, in seguito alla diagnosi della sorella e confermata mediante biopsia duodenale (grado 3B di Marsh modificato da Oberhuber). La GFD si è associata ad un miglioramento clinico dei sintomi neurologici. Interrogato sulla presenza di sintomi gastrointestinali prima dell'inizio della dieta, riferiva diarrea saltuaria e senso di ripienezza postprandiale precoce, associato a gonfiore. Dopo un periodo di ingestione accidentale di cibo contenente glutine, vengono riportati in cartella un peggioramento generale e comparsa di ipostenia agli arti inferiori, regrediti in 12 ore. Il paziente non effettua alcuna terapia dal momento che le recidive cliniche sono state poche e con sintomatologia sfumata (astenia). Le lesioni

demielinizzanti, non captanti alla RMN encefalo e midollo, sono stabili nel tempo e assai scarse a livello encefalico. Gli esiti neurologici sono modesti, a fronte di una lunga storia clinica. I colleghi hanno ipotizzato una malattia demielinizzante, non associata a sicure prove di patogenesi infiammatoria/autoimmune, che poteva essere anche associata a malassorbimento o carenze alimentari.

**TC (37 anni):** l'esordio di malattia è stato a 16 anni, nel 1995, con parestesie agli arti superiori, a 17 anni ha presentato neurite ottica retrobulbare (NORB) sx e ipostenia all'arto inferiore dx. Sono state eseguite RMN encefalo e rachicentesi ed è stata posta diagnosi di SM. Negli anni ha eseguito terapia con azatioprina (10 anni), interferon, glatiramer acetato, natalizumab, ciclofosfamide. Nonostante ciò, la paziente presenta un quadro clinico ingravescente. In relazione al quadro clinico e alla scarsa risposta alle terapie nel tempo è stato concordato di attuare una terapia massimale con trapianto autologo di cellule staminali ematopoietiche (in corso pianificazione). A 30 anni è stata posta diagnosi di MC in seguito alla comparsa di sintomatologia dolorosa addominale e stipsi alternata a diarrea. Ha eseguito screening sierologico risultato positivo, come anche la presenza degli alleli che più comunemente si associano a MC (DQ2) ed ha avviato una dieta priva di glutine. La paziente non ha acconsentito all'esecuzione della EGDS con biopsia ed ha riferito miglioramento anche della sintomatologia neurologica dopo l'avvio della GFD.

**SC (51 anni):** l'esordio di malattia è stato a 19 anni (1985), con ipostenia all'arto superiore e inferiore sx, associata ad astenia ed impaccio alla deambulazione e a riduzione del visus in occhio dx. La paziente presenta una malattia infiammatoria demielinizzante del SNC con segni di atipia, per cui non è

possibile ad oggi porre diagnosi di certezza di SM: LCR ripetutamente negativo, basso carico lesionale alla RMN encefalo, stabile negli anni, presenza di anticorpi anti mucosa gastrica con bassi livelli di vitamina B 12 e acido folico. Ha effettuato terapia con interferon  $\beta$  1b dai 31 anni ai 37 anni, successivamente nessuna altra terapia. Dai 46 anni ha iniziato a presentare diarrea per cui è stato eseguito screening sierologico per MC risultato positivo. La EGDS con biopsia ha mostrato mucosa duodenale nei limiti istopatologici della norma, mucosa gastrica antrale e antro-corpale sede di gastrite cronica di grado moderato, non atrofica. L'assetto HLA ha mostrato la presenza del DQ2 in cis. La paziente ha iniziato la GFD con beneficio.

**EK (18 anni):** da segnalare all'anamnesi che i genitori sono cugini di II grado. La paziente presentava DM1 dall'età di 11 mesi in terapia insulinica multi-iniettiva e MC dall'età di 2 anni, individuata mediante screening per patologie autoimmuni associate al DM1 e confermata mediante EGDS con biopsia (grado 3C Marsh-Oberhuber). Ha presentato esordio di malattia a 16 anni (2014), con comparsa di vertigini, instabilità posturale e difficoltà alla deambulazione, migliorate dopo la somministrazione di boli di metilprednisolone. La RMN encefalo ha documentato alterazioni della SB di significato infiammatorio a sede periventricolare e sottocorticale, con interessamento del tronco encefalico e impregnazione di alcune di esse dopo somministrazione di mdc. Analoghe lesioni erano presenti a livello del midollo cervicale. L'esame del liquor ha documentato la presenza di BO. Sono inoltre risultati positivi gli anticorpi anticardiolipina di classe IgM. E' stata dunque avviata terapia con Interferon  $\beta$  1 a. Per mancato controllo della SM (ricidiva con NORB e attività delle lesioni alla RMN encefalo) ha iniziato terapia con anticorpo monoclonale, natalizumab.

**PG (44 anni):** l'esordio di SM è avvenuto a 19 anni (1991), la diagnosi è stata posta in altra sede ed è stata avviata terapia con interferon. A 29 anni è stato diagnosticato DM1 e a 30 anni MC, confermata con la biopsia duodenale (grado 3C di Marsh modificato da Oberhuber), in assenza di sintomatologia evocativa, individuata mediante screening sierologico dopo la diagnosi di DM1, pertanto la paziente ha iniziato la GFD. Nel tempo la paziente è stata trattata con interferon  $\beta$  1a, glatiramer acetato, mitoxandrone, natalizumab, ciclofosfamide, senza tuttavia raggiungere il controllo della malattia. Il quadro recidivante-remittente è virato verso una forma cronicamente progressiva, con esiti gravi quali paraparesi spastica e atassia. E' attualmente in corso di valutazione il trapianto di midollo osseo (TMO). Dall'anamnesi è emersa familiarità per MC (sorella e figlia del fratello).

**CS (56 anni):** la diagnosi di MC è antecedente a quella di SM ed è stata posta a 40 anni. Gli anticorpi anti-tTG sono stati dosati per il riscontro occasionale di anemia ferro-carenziale alle analisi ematiche, eseguite per astenia. La diagnosi è stata confermata istologicamente (grado 3C di Marsh modificato da Oberhuber). La paziente segue regolarmente la GFD. Anche la figlia presenta MC, diagnosticata in seguito allo screening familiare, altrimenti asintomatica. La SM è esordita a 43 anni con alterazione della sensibilità e parestesie agli arti inferiori. La paziente ha eseguito RMN encefalo e midollo che hanno mostrato lesioni demielinizzanti compatibili e la rachicentesi ha documentato la presenza di BO nel liquor. I sintomi sono regrediti con la somministrazione di metilprednisolone. Da allora la paziente non ha presentato recidive e non ha effettuato alcuna terapia.

- Firenze, AOU Careggi, Centro Sclerosi Multipla -SOD Neurologia I, diretto dalla Prof.ssa Maria Pia Amato: 3 pazienti con MC/400 pazienti con SM.

**CA (46 anni):** la paziente presenta familiarità per SM (sorella) e artrite reumatoide (madre e sorella). L'esordio di malattia è stato a 15 anni (1985), con emiparesi dx e deficit del visus, regrediti spontaneamente in alcuni mesi. A 30 anni è comparsa NORB all'occhio dx. La diagnosi di SM è stata confermata dall'esame del liquor positivo per BO con indice di Link 1.10, dalla RMN encefalo con lesioni caratteristiche, dai PEV e dopo l'esclusione di altre cause (assetto coagulativo e anticorpale negativi). La paziente presentava da diversi anni sintomi quali stipsi, gonfiore, dispepsia, pertanto è stato effettuato il dosaggio degli anticorpi anti-tTG ed EMA risultati positivi. L'EGDS con biopsie ha mostrato atrofia dei villi con grado Marsh-Oberhuber 3C. Non è stata valutata la presenza del DQ2/DQ8. Dalla diagnosi ha iniziato a seguire la GFD con beneficio sulla sintomatologia gastrointestinale e anche neurologica, secondo quanto riferito dalla paziente, che non ha voluto intraprendere alcuna terapia per la SM. A 33 anni è recidivata la NORB all'occhio sx ed è stata documentata attività subclinica di malattia alla RMN, con nuove lesioni encefaliche e midollari, per cui è stata avviata terapia con glatiramer acetato, mai assunto però regolarmente. La malattia è proseguita con una ricaduta ogni 2 anni circa. E' stata tentata terapia con dimetil-fumarato, sospeso per flushing. A 36 anni ha tentato il suicidio ed è stata diagnosticata un' importante depressione in seguito alla morte della madre e un disturbo borderline e bipolare. Nel 2016 ha ripreso terapia regolare con glatiramer acetato.

**BG (43 anni):** la paziente è affetta da NMO spectrum disorder (NMOSD), miastenia gravis, MC e tiroidite autoimmune e la madre presenta sclerodermia. La miastenia gravis è stata diagnosticata a 26 anni in seguito alla comparsa di sintomi quali difficoltà alla masticazione e faticabilità e la paziente è stata sottoposta a timectomia. A 36 anni è stata diagnosticata la MC, con il dosaggio degli anticorpi anti-tTG ed EMA, effettuato perché la paziente presentava dermatite atopica. L'esame istologico ha documentato un grado Marsh-Oberhuber 3B ed è stata dunque avviata la GFD. A 42 anni è comparsa mielite trasversa, estesa longitudinalmente nel tratto D1-D7, per cui è stata sospettata la malattia di Devic e un'acquaporinopatia autoimmune. La RMN encefalo era negativa e alla rachicentesi non erano presenti BO. Gli anticorpi anti acquaporina 4 erano positivi ed era presente una debole positività degli anticorpi anti strutture vascolari del SNC (NMO-IgG). I potenziali evocati somatosensoriali (PESS) e i PEM hanno mostrato alterazione della trasmissione lungo la via motoria all'arto inferiore dx ed alterazione della trasmissione lungo le vie somatosensoriali cordonali posteriori, a partenza dall'arto inferiore dx. I PEV erano normali. E' stata introdotta terapia con azatioprina.

**TR (47 anni):** ha presentato esordio della SM a 30 anni (1999), con diplopia ed impegno della mano dx. Al liquor le BO erano positive, con IgG Index 0.638 ed alla RMN encefalo erano presenti lesioni tipiche. Il paziente ai controlli lamentava pirosi gastrica e gonfiore e presentava anemia ferro-carenziale, non responsiva alla terapia marziale ed aumento dei livelli di omocisteina, pertanto, a 46 anni, è stato eseguito screening sierologico per MC, risultato positivo e successivamente è stata effettuata EGDS con biopsie, che ha mostrato un grado 3C di Marsh modificato da Oberhuber. L' HLA di II classe era predisponente

(DQ2). La GFD ha determinato un miglioramento dell'astenia e dell'affaticabilità. Ha eseguito terapia con azatioprina, aminopiridina e poi interferon  $\beta$  1a.

- Centro per la Sclerosi Multipla -Unità Operativa Neurologia- Azienda USL 4-Prato (responsabile dott. Mario Falcini): 2 pazienti con MC/450 pazienti con SM.

**NC (45 anni):** l'esordio della SM è avvenuto a 38 anni (2009), con NORB all'occhio dx, per cui, una volta confermata la diagnosi, è stata intrapresa la terapia con copolimero (glatiramer acetato), tuttora in corso. Il quadro clinico è rimasto stabile e la paziente ha lamentato solo saltuari episodi di tachicardia. Alla RMN encefalo il carico sopra-tentoriale era modesto e le lesioni midollari a C2-C5 e C6 stabili. Nel 2013 la RMN non mostrava nuove alterazioni, né impregnazione dopo mdc e la paziente proseguiva terapia con glatiramer acetato. Agli esami ematochimici era però comparsa lieve anemia microcitica e clinicamente la paziente lamentava tremore a braccia tese. Nel 2014 (43 anni) persisteva l'anemia e sono comparse feci ipocoliche, per cui è stato eseguito il dosaggio delle IgA anti-tTG e degli anticorpi anti-DGP di classe IgA e IgG, risultati positivi. E' stata eseguita la EGDS con biopsia che mostrava solo aumento degli IEL (Marsh 1). L'aplotipo evidenziava la presenza del DQ2. Valutata da un gastroenterologo, ha avviato la GFD con negativizzazione degli anticorpi anti-tTG dopo un anno e benefici clinici. Il quadro della SM è stabile, senza ricadute dal 2009.

**DS (40 anni):** l'esordio della SM è stato a 32 anni, con NO molto grave, con scarso dolore e rapida compromissione della vista, tale che fin da subito la paziente ha avuto un gravissimo deficit visivo binoculare. Gli anticorpi anti acquaporina 4 erano negativi, come anche i test genetici per Leber e leucodistrofie, mentre erano positive le BO nel liquor. Alla RMN erano presenti lesioni della SB periventricolari e sottotentoriali, in parte confluenti, non si evidenziavano lesioni midollari. I livelli di enzima convertitore dell'angiotensina (ACE) erano molto elevati, ma gli accertamenti per sarcoidosi erano negativi (PET total body e TAC torace). Considerato il grave, ed inusualmente grave fin da subito, interessamento dei nervi ottici è stata iniziata terapia con natalizumab, che, dopo 6 somministrazioni, data l'assenza di benefici, è stato sostituito con rituximab, che è la terapia ancora in corso. Il deficit visivo è però comunque progredito ed è iniziato un deficit motorio con paraparesi grave, oscillante e vescica neurologica, in contrasto con la RMN poco significativa in quanto a lesioni, che non si sono accumulate nel tempo, nonostante il peggioramento clinico. Nel 2014, a 38 anni, la paziente ha iniziato a lamentare dolori epigastrici importanti pertanto, dopo il riscontro di EMA, tTG e anti-DGP negativi ripetutamente, associati ad un HLA di classe II non predisponente, ha eseguito la EGDS, che ha mostrato atrofia subtotale dei villi duodenali, compatibile con MC grado 3C di Marsh modificato da Oberhuber. I colleghi gastroenterologi hanno concluso che la diagnosi poteva non essere supportata dal quadro di laboratorio in quanto falso negativo sotto rituximab. La paziente ha avviato la GFD e, dopo 10 mesi, è stata eseguita una EGDS di controllo, che ha documentato un aspetto meno appiattito della mucosa duodenale e all'istologia assenza di significative alterazioni della struttura dei villi con numerosi IEL ed un quadro compatibile con un grado 1 di Marsh.

- Siena, UOC Neurologia e Neurofisiopatologia clinica diretta dal Prof. Alessandro Rossi -Centro per la Sclerosi Multipla (responsabili Dott.ssa Monica Ulivelli, Dott.ssa Sabina Bartalini):  
2 pazienti con MC/400 pazienti con SM.

**CAn (58 anni):** da segnalare che la madre è affetta da miastenia gravis. A 40 anni (1998) viene posta diagnosi di MC, in seguito alla comparsa di sintomi gastrointestinali, quali gonfiore addominale, dolore addominale, diarrea, dispepsia e calo ponderale. Gli anticorpi anti-tTG erano positivi ed è stata eseguita la EGDS con biopsia che ha mostrato un grado 3C di Marsh modificato da Oberhuber. Da allora la paziente segue la GFD. A 51 anni è comparso impaccio motorio nella corsa e poi nel camminare, maggiormente all'arto inferiore dx. Alla RMN encefalo erano presenti lesioni della SB al ponte, mesencefalo, peduncoli cerebellari, corpo calloso, di cui alcune prendevano contrasto e la rachicentesi ha evidenziato numerose IgG oligoclonali. E' stata iniziata terapia con interferon  $\beta$ , poi, per comparsa di ricadute cliniche e nuove lesioni alla RMN encefalo, è stato sostituito con natalizumab.

**CV (26 anni):** all'anamnesi familiare sono da segnalare il nonno materno affetto da Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA), la nonna materna e la madre con MC. La paziente ha presentato l'esordio della SM a 20 anni con vertigini soggettive e diplopia, per cui sono stati effettuati 5 boli steroidei con completo recupero. Alla rachicentesi erano presenti BO e IgG index aumentato e alla RMN encefalo venivano evidenziate lesioni della SB a livello della corona radiata dx e del lobo frontale sx, che assumevano contrasto. I PEV erano negativi, come anche gli anticorpi anti acquaporina 4. La paziente ha poi iniziato a presentare, subito

dopo la diagnosi di SM, dispepsia e dolori addominali e sono state ripetutamente dosate le tTG e gli EMA, sempre negativi. La paziente presentava inoltre il DQ2 omozigote. E' stata effettuata la EGDS con biopsie multiple, risultata anch'essa negativa. I sintomi riferiti regredivano dopo un periodo di esclusione del glutine dalla dieta, pertanto la paziente ha iniziato la GFD. Ha presentato ricadute della SM ed è stata trattata con interferon  $\beta$  1 a e poi dimetilfumarato.



## **RISULTATI**

La diagnosi di MC è stata posta in 14 pazienti (3 maschi) afferenti a quattro centri di riferimento per la cura della SM di tre aziende ospedaliere della Toscana (tabella 3): AOU Policlinico Santa Maria alle Scotte, Siena - AOU Careggi, Firenze - Nuovo Ospedale di Prato, Azienda USL 4 Prato. Il numero di pazienti seguito da ciascun centro è il seguente: Siena 400 pazienti; Firenze I 400 pazienti; Firenze II 800 pazienti; Prato 450 pazienti.

L'età media alla diagnosi di MC era 34.3 anni (SD 12.5). In un solo caso la MC era stata diagnosticata in età pediatrica (2 anni). La SM è stata diagnosticata ad un'età media di 29.7 anni (SD 11.4) e nel 21% dei casi in età pediatrica (< 18 aa). In accordo con la letteratura il 78% dei soggetti erano di sesso femminile, con un rapporto F:M (3.6:1). La maggior parte dei pazienti era autosufficiente e indipendente nello svolgimento dei compiti quotidiani. La durata media della SM era 13.9 anni (SD 10.2). Alla scala Expanded Disability Status Scale (EDSS), messa appunto dal neurologo americano Kurtzke nel 1983, che permette di valutare il grado di severità della SM, ovvero le sequele neurologiche prodotte dal danno anatomico a carico del SNC, il punteggio medio nella nostra casistica era 2.3. Il sottotipo più frequente di SM era, nel 50% dei casi, la forma relapsing-remitting. In 3 pazienti (21%) era presente una forma di SM progressiva. In un paziente è stata posta diagnosi di NMOSD/malattia di Devic. In un caso si è manifestato un solo episodio acuto in seguito al quale è stata posta la diagnosi di SM e poi nessuna ricaduta. In 2 casi era presente una malattia infiammatoria demielinizzante con segni di atipia. Il signor AL ha presentato esordio di malattia a 28 anni con NORB e poi mieliti recidivanti. La RMN encefalo e midollo mostravano lesioni encefaliche a livello della SB

sottocorticale e a livello di C4, C6, D1 e la rachicentesi era nella norma. I sintomi neurologici si sono riacutizzati in seguito all'ingestione accidentale di cibo contenente glutine. Il paziente non effettua alcuna terapia ed è stata ipotizzata una malattia demielinizzante non associata a sicure prove di patogenesi infiammatoria/autoimmune, che poteva essere anche associata a malassorbimento o carenze alimentari.

La paziente SC presenta una malattia infiammatoria demielinizzante del SNC con segni di atipia, per cui non è possibile porre diagnosi di certezza di SM: LCR ripetutamente negativo, basso carico lesionale alla RMN encefalo, stabile negli anni, presenza di anticorpi anti mucosa gastrica con bassi livelli di vitamina B 12 e acido folico. Ha effettuato terapia con interferon  $\beta$  1b dai 31 anni ai 37 anni, successivamente nessuna altra terapia. Nel 36% dei casi (5/14) la diagnosi di MC e l'avvio della GFD erano antecedenti alla diagnosi di SM, nel 50% dei casi (7/14) la diagnosi di MC era successiva e nel 14% dei pazienti (2 casi) concomitante. I sintomi gastrointestinali erano presenti nel 72% dei casi (10/14), mentre solo nel 14% dei casi (2/14) la MC si presentava con sintomi atipici (anemia ferroparenziale associata ad astenia e manifestazioni cutanee). Nel restante 14% dei casi (2/14) la MC era completamente asintomatica ed è stata individuata in seguito alla diagnosi di DM1, con lo screening delle patologie autoimmuni associate. Il dosaggio delle IgA totali e degli anticorpi anti-tTG è stato effettuato in tutti i pazienti ed è risultato positivo nell'86% dei casi (12/14). Nella paziente DS in cui le tTG IgA erano negative, come anche gli anticorpi anti DGP, era stata impostata ab initio una terapia con anticorpo monoclonale. La negatività della sierologia contrastava con la presenza di atrofia (Marsh-Oberhuber 3C) all'esame istologico e di sintomi suggestivi di MC, seppure l'indagine genetica non abbia documentato la presenza del DQ2/DQ8. La paziente CV, con tTG e EMA ripetutamente negativi, presentava dispepsia e dolori addominali, che

regredivano dopo l'eliminazione del glutine dalla dieta e si ripresentavano alla reintroduzione, associati ad importante familiarità per MC (madre e nonna materna) e alla presenza del DQ2 in omozigosi, indirizzando verso un quadro di MC potenziale. La EGDS con biopsia è stata effettuata in 13/14 pazienti. Nel 72% dei casi (10 pazienti) la biopsia era indicativa di atrofia della mucosa intestinale (grado 3 A, B o C di Marsh modificato da Oberhuber). In un caso (NC) era presente un grado 1 di Marsh, associato alla presenza di IgA-tTG e anti DGP positivi, di sintomi gastrointestinali e del DQ2, suggerendo la diagnosi di MC latente. In 2 pazienti la biopsia era normale. Nella paziente SC, con biopsia normale, era documentato alla EGDS un quadro di gastrite cronica di grado moderato, a fronte di IgA-tTG e EMA positivi, di un aplotipo permissivo (DQ2) e di sintomi gastrointestinali quali diarrea, configurando così un quadro di MC latente. La paziente CV presentava invece, come suddetto, MC potenziale. Nell'unico caso in cui la EGDS non è stata effettuata (per rifiuto da parte della paziente) è stata documentata la positività delle tTG e degli EMA, in presenza del DQ2 e di sintomi indicativi quali diarrea e stipsi alternate. La positività degli aplotipi DQ2 e DQ8 è stata ricercata nel 43% dei casi (6/14), e comunque in tutti i casi che presentavano criteri diagnostici incerti (biopsia normale, biopsia non eseguita, grado 1 Marsh, sierologia negativa). In un solo caso, fra quelli dubbi, DS, non è stata documentata la presenza dell'aplotipo predisponente, anche se non possiamo escludere la presenza degli alleli DQA1\*05 o DQB1\*02 del DQ2 e DQA1\*03 o DQB1\*0302 del DQ8, in base all'esame genetico eseguito. In tutti i casi in cui la genetica era permissiva è risultato positivo solo il DQ2.

La GFD era seguita da tutti pazienti, secondo quanto riferito a domanda precisa, mediante intervista telefonica. Il 43% dei pazienti riferiva un miglioramento soggettivo dei sintomi neurologici dopo la GFD. La documentazione relativa all'eventuale follow-up gastroenterologico era

presente solo in due cartelle di pazienti con diagnosi dubbia: NC, che presentava solo un aumento degli IEL alla biopsia, in cui il follow-up ha documentato la negativizzazione delle tTG dopo un anno di GFD; DS, che presentava sierologia negativa e assenza di DQ2/DQ8, in cui la EGDS con biopsia di controllo dopo 10 mesi di GFD, ha testimoniato la regressione dell'atrofia, con passaggio da un grado 3C di Marsh modificato da Oberhuber ad un grado 1 di Marsh. Nel 21% dei casi (3/14) erano presenti malattie autoimmuni associate: DM1, miastenia gravis, tiroidite di Hashimoto. Nel 29% dei casi (4/14) era presente familiarità per MC e nel 21% dei casi (3/14) per altre malattie autoimmuni quali l'artrite reumatoide, la sclerodermia e la miastenia gravis. In conclusione la diagnosi di MC è stata posta in 14/2050 pazienti con SM, quindi, la prevalenza della MC nella nostra coorte di soggetti era 0.7%. Il test del Chi Quadro non ha mostrato alcuna differenza statisticamente significativa fra la frequenza di MC nei soggetti con SM e quella riportata nella popolazione generale (p 0.7).

	Sesso	Età diagnosi	Istologia <sup>a</sup>	Sierologia	Genetica DQ2/DQ8	Sintomi GI	Sintomi extra-GI	Malattie associate
CG	m	29	3A	tTG +	non eseguito	pirosi	anemia	no
AL	m	51	3B	tTG +	non eseguito	diarrea - gonfiore	astenia	no
TC	f	30	non eseguita	tTG + EMA +	DQ2	diarrea- stipsi	no	no
SC	f	46	gastrite cronica	tTG + EMA+	DQ2	diarrea	no	no
EK	f	2	3C	tTG +	non eseguito	no	no	DM1
PG	f	30	3C	tTG +	non eseguito	no	no	DM1
CS	f	40	3C	tTG +	non eseguito	no	astenia- anemia	no
CA	f	30	3C	tTG + EMA+	non eseguito	stipsi dispepsia	no	depressione
BG	f	36	3B	tTG +	non eseguito	no	dermatite atopica	tiroidite/miastenia
TR	m	46	3C	tTG +	DQ2	pirosi gonfiore	anemia	no
NC	f	43	1	tTG + DGP+	DQ2	feci ipocoliche	anemia	no
DS	f	38	3C	tTG- DGP- EMA -	DQ2/DQ8 assenti	dolori addominali	no	no
CAn	f	40	3C	tTG +	non eseguito	dolore addominale, diarrea, calo ponderale	no	no
CV	f	20	normale	tTG - EMA -	DQ 2	dispepsia dolore addominale	no	no

Tabella 3. Dati clinici, sierologia, istologia, aplotipo dei 14 soggetti con MC

Legenda: m, maschio; f, femmina; tTG, anticorpi anti transglutaminasi; EMA, anticorpi anti endomisio; DGP anticorpi anti peptidi deamidati della gliadina.

<sup>a</sup> classificazione di Marsh modificata da Oberhuber (52).



## **DISCUSSIONE**

Il coinvolgimento neurologico nell'ambito della MC è stato studiato a partire dal 1966 (59). La maggior parte delle ricerche condotte non ha però scisso la MC dalla GS, rendendo difficile quantificare la vera prevalenza dei disturbi neurologici e psichiatrici associati a ciascuna condizione. I meccanismi che sottintendono all'associazione MC-sintomi neurologici rimangono tuttora sconosciuti, come rimane da chiarire perché alcuni soggetti sviluppino sintomi a livello del SNC a differenza di altri e l'estrema variabilità di tali sintomi. La prevalenza delle manifestazioni neurologiche è infatti difficile da stimare per i diversi criteri adottati negli studi e per il fatto che tali aspetti vengono indagati soprattutto in centri di III livello. In particolare la disregolazione autoimmune e l'alterazione del meccanismo dell'apoptosi sono punti che accomunano la MC e la SM, facendo supporre che potrebbe esservi un'aumentata associazione tra le due patologie. La SM è una patologia ad eziopatogenesi multifattoriale, che comprende fattori immunologici, ambientali e genetici ed è considerata una malattia infiammatoria, mediata dai linfociti T, sebbene allo sviluppo della malattia contribuisca anche l'infiammazione mediata dalle cellule B. Anche la MC è considerata una patologia mediata dai linfociti T, in particolare dai linfociti Th1. A dispetto di questa base eziopatogenetica comune, non ci sono evidenze sufficienti in favore di un'effettiva associazione causale tra le due patologie e di un'aumentata frequenza della MC nei pazienti con SM e viceversa. Volta et al nel 2015 hanno ricercato la presenza degli anticorpi anti anti-neurone (NA) in 106 pazienti con MC, di cui 4 affetti da SM. La frequenza dei suddetti anticorpi era del 49% nei soggetti celiaci con manifestazioni neurologiche vs 8% nei soggetti celiaci senza coinvolgimento del SNC e più specificatamente gli

anticorpi NA sono stati riscontrati in 2 pazienti affetti da MC-SM. Gli autori hanno dunque suggerito che gli anticorpi NA possano rappresentare un marker utile ad individuare i soggetti celiaci a rischio di interessamento neurologico (107). I soggetti con MC, come anche quelli con SM, possono presentare un'aumentata prevalenza di malattie autoimmuni. Durante la fase diagnostica delle patologie demielinizzanti non è infrequente ritrovare autoanticorpi che hanno come bersaglio il fattore antinucleo (ANF), il fattore reumatoide (FR) e l'antigene nucleare estraibile (ENA), che suggeriscono la presenza di un background autoimmune. Le analisi genetiche condotte mediante la piattaforma array ImmunoChip, su almeno 14 patologie autoimmuni, tra cui la MC e la SM, mostrano come la maggior parte dei 41 loci non-HLA associati alla celiachia e dei 98 loci associati alla SM, si sovrappongono ad almeno uno dei loci associati agli altri fenotipi autoimmuni (fig.15). Uno studio tedesco pubblicato nel 2001 ha incluso 75 bambini con MC confermata con biopsia intestinale, che sono stati sottoposti ad esame clinico, analisi di laboratorio, EEG, TC e RMN encefalo. 10 individui (13%) mostravano sintomi neurologici come atassia e epilessia. In 15 bambini la RMN encefalo ha mostrato la presenza di lesioni della SB unilaterali o bilaterali di varie dimensioni, in assenza di una storia neurologica o di complicanze perinatali che potessero esserne responsabili. Una delle possibili interpretazioni da parte degli autori è stata che le lesioni della SB potessero rappresentare manifestazioni extraintestinali del processo autoimmune (108). Non è stata evidenziata alcuna relazione tra la presenza di queste lesioni e l'aderenza alla GFD. Un altro studio pubblicato nel 2004 ha considerato 49 soggetti con SM, senza sintomi gastrointestinali, in cui sono stati eseguiti esami ematici di screening per MC e in un soggetto è stata documentata la positività delle tTG IgA e degli EMA, suggerendo una correlazione tra le due malattie (109). Nicoletti et al nel 2008 non hanno

confermato tale associazione, non documentando alcun caso di positività della sierologia per MC in 217 pazienti con SM (98). La controversia si è riaccesa nel 2011 con lo studio di Rodrigo et al, che hanno dimostrato un'aumentata frequenza di MC non solo in 72 pazienti con SM, ma anche nei loro parenti di primo grado (101). Anche il ruolo della GFD nel trattamento della SM è assolutamente dubbio e i dati in letteratura non evidenziano benefici certi. Inoltre, la storia relapsing-remitting propria della SM rende l'interpretazione clinica molto difficile. Report aneddotici descrivono pazienti con RRMS e MC che, dopo l'avvio della GFD, hanno avuto meno ricadute di malattia (110). Per quanto concerne invece la prevalenza di MC in soggetti affetti da NMO o mielite trasversa, troviamo in letteratura solo case report.

Nella nostra casistica la prevalenza della MC era 0.7% (14/2050 pazienti), senza alcuna differenza statisticamente significativa con la frequenza di MC riportata nella popolazione generale (p 0.7).

I limiti principali del nostro studio sono: (i) l'assenza di una popolazione di controllo, abbiamo infatti paragonato la frequenza della MC nei soggetti con SM a quella della popolazione generale e (ii) il fatto che l'analisi è stata retrospettiva e condotta in soggetti che non sono stati sottoposti a screening per MC a meno che non presentassero sintomi gastrointestinali o extra-gastrointestinali evocativi, o alterazioni suggestive alle indagini ematochimiche. Inoltre l'eventuale dosaggio degli anticorpi specifici per la MC è stato eseguito una tantum e non in maniera longitudinale, per cui è possibile che non siano stati individuati i casi clinicamente silenti o paucisintomatici. Il punto di forza è invece la numerosità del campione dal quale possiamo desumere alcune informazioni.

Il sottotipo più frequente di SM nei soggetti con MC era la forma relapsing-remitting (50% dei casi), seguita dalla forma di SM primariamente o

secondariamente progressiva. In 2 casi era presente una malattia infiammatoria demielinizzante con segni di atipia. In 1/3 dei casi (35%) la diagnosi di MC era precedente alla diagnosi di SM ed era già stata avviata la GFD. Per quanto riguarda la presentazione clinica della MC nei soggetti con SM, in letteratura ritroviamo dati in favore di una presentazione clinica prevalentemente atipica, caratterizzata da sintomatologia intestinale aspecifica e/o manifestazioni extra-intestinali, quali anemia sideropenica resistente alla terapia marziale per os, stanchezza cronica, che risulta però difficile oggettivare in pazienti in cui l'astenia è sicuramente legata anche alla SM. Sappiamo che la clinica della MC è estremamente variabile, tanto che questa patologia viene definita "un camaleonte clinico" e può anche essere completamente silente in questi soggetti. Nei pazienti da noi esaminati, al contrario, i sintomi gastrointestinali erano presenti nel 72% dei casi ed in 1/3 dei casi il sintomo predominante era la diarrea (35% dei casi), con un quadro di MC tipica. Il 43% dei pazienti riferiva un miglioramento soggettivo non solo dei sintomi gastrointestinali, ma anche dei sintomi neurologici dopo l'avvio della GFD, analogamente a quanto riportato in letteratura. Si potrebbe dunque speculare che la MC è stata riscontrata con una bassa frequenza in questa popolazione di soggetti, perché sono stati sottoposti ad approfondimento diagnostico solo quelli con sintomatologia gastrointestinale eclatante. Il dosaggio degli anticorpi anti tTG e delle IgA totali è stato effettuato in tutti i pazienti ed è risultato positivo nell'86% dei casi. In questi pazienti dobbiamo comunque tenere presente che la positività dei marker sierologici per MC può essere influenzata da alcuni dei farmaci assunti per la SM. Nella maggioranza dei casi (72%) la biopsia era indicativa di atrofia della mucosa intestinale (grado 3 A, B o C di Marsh modificato da Oberhuber). In 2/3 casi, in cui la biopsia non era chiaramente indicativa di MC, la sierologia positiva, i sintomi gastrointestinali e

l'aplotipo DQ2, indicavano un quadro di MC latente. Nel restante caso i sintomi gastrointestinali e la familiarità per MC, insieme alla presenza del DQ2, seppure in assenza di anticorpi positivi, hanno indirizzato verso una MC potenziale. La positività degli aplotipi DQ2 e DQ8 è stata ricercata nel 43% dei casi, sempre dopo i test sierologici e, concordemente con quanto riportato in letteratura (41), si è dimostrata particolarmente utile nei casi che presentavano criteri diagnostici incerti (biopsia normale, biopsia non eseguita, grado 1 di Marsh, sierologia negativa). Il follow up gastroenterologico inoltre non è risultato standardizzato nella nostra casistica.

In conclusione il nostro studio ha evidenziato che la frequenza della MC è maggiore nella popolazione generale rispetto alla popolazione di soggetti con SM in esame, suggerendo l'assenza di una relazione causale tra le due patologie, sebbene sarebbe auspicabile condurre studi longitudinali con gruppi di controllo adeguati per corroborare questa tesi.

Potrebbe essere utile, al fine di connotare con maggiore precisione la comorbidità MC/SM, attuare una strategia di "case finding", mediante screening sierologico nei soggetti con SM neo diagnosticati, utilizzando il dosaggio delle IgA totali e delle tTG-IgA, analogamente a quanto avviene per altre patologie autoimmuni (DM1, tiroidite linfocitaria cronica, epatite autoimmune, malattie infiammatorie croniche intestinali) e genetiche (sindrome Down, Turner, Williams), considerando le note patogenetiche comuni alle due patologie e il substrato autoimmune presente nei soggetti con SM. La valutazione dell'HLA di classe II, per la ricerca della positività del DQ2/DQ8, costituirebbe un utile spartiacque per individuare la sottopopolazione di pazienti che deve essere sottoposta a dosaggi anticorpali seriati nel tempo, in quanto a rischio, tenuto conto dell'elevato valore

predittivo negativo di questo test e anche del fatto che il pattern HLA associato alla SM è diverso (DQB1\*0602 o DR2).

Un altro capitolo è rappresentato dalla NCGS, che non abbiamo considerato in questo studio, dal momento che non esistono biomarker dotati di sufficiente sensibilità e specificità, la cui diagnosi è al momento basata sulla relazione causa-effetto tra assunzione del glutine e comparsa dei sintomi.

## BIBLIOGRAFIA

1. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, et al; ESPGHAN Working Group on Coeliac Disease Diagnosis; ESPGHAN Gastroenterology Committee; European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. *European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease*. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2012;54:136-60.
2. *Revised criteria for diagnosis of coeliac disease*. Report of working group of European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. Arch Dis Child 1990;65:909-11.
3. Molberg O, McAdam SN, Sollid LM. *Role of tissue-transglutaminase in celiac disease*. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2000;30:232-40.
4. Schuppan D, Hahn EG. *IgA anti-tissue transglutaminase: setting the stage for coeliac disease screening*. Eur J Gastroenterol Hepatol 2001;13:635-7.
5. Losowsky MS. *A history of coeliac disease*. Dig Dis 2008;26:112-20.
6. Catassi C, Gatti S, Lionetti E. *World perspective and celiac disease epidemiology*. Dig Dis 2015;33:141-6.
7. Vilppula A, Kaukinen K, Luostarinen L, et al. *Increasing prevalence and high incidence of celiac disease in elderly people: A population based study*. BMC Gastroenterol 2009;9:49.
8. Catassi C, Doloretta Macis M, Räscher IM, et al. *The distribution of DQ genes in the Saharawi population provides only a partial explanation for the high coeliac disease prevalence*. Tissue Antigens 2001;58:402-6.

9. Norris JM, Barriga K, Hoffenberg EJ, et al. *Risk of celiac disease autoimmunity and timing of gluten introduction in the diet of infants at increased risk of disease.* JAMA 2005;293:234-351.
10. Akobeng AK, Ramanan AV, Buchan I, et al. *Effect of breast feeding on risk of celiac disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies.* Am J Gastroenterol 2006;91:39-43.
11. Stene LC, Honeyman MC, Hoffenberg EJ, et al. *Rotavirus infection frequency and risk of celiac disease autoimmunity in early childhood: a longitudinal study.* Am J Gastroenterol 2006;101:2333-40.
12. Sturgess RP, Ellis HJ, Ciclitira PJ. *Cereal chemistry, molecular biology, and toxicity in celiac disease.* Gut 1991;32:1055-60.
13. Valdes I, Garcia E, Liorente M, et al. *Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol.* Eur J Gastroenterol Hepatol 2003;15:465-74.
14. Catassi C, Fabiani E, Iacono G, et al. *A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease.* Am J Clin Nutr 2007;85:160-6.
15. Koskinen O, Villanen M, Korponay-Szabo I, et al. *Oats do not induce systemic or mucosal autoantibody response in children with coeliac disease.* J Pediatr Gastroenterol Nutr 2009;48:559-65.
16. Hernando A, Mujico JR, Mena MC, et al. *Measurement of wheat gluten and barley hordeins in contaminated oats from Europe, the United States and Canada by Sandwich R5 ELISA.* Eur J Gastroenterol Hepatol 2008;20:545-54.

- 17.Ivarsson A. *The Swedish epidemic of celiac disease explored using an epidemiological approach - some lessons to be learnt*. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2005;19:425-40.
- 18.Cerf-Bensussan N. *Autoimmunity and diet*. Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program 2009;64:91-104.
- 19.Namatovu F, Lindkvist M, Olsson C, et al. *Season and region of birth as risk factors for coeliac disease a key to the aetiology?* Arch Dis Child 2016;101:1114-18.
- 20.Puccetti A, Corrocher R, Zanoni G, et al. *In coeliac disease, a subset of autoantibodies against transglutaminase binds toll-like receptor 4 and induces activation of monocytes*. PLoS Med 2006;3:1636-51.
- 21.Bevan S, Popat S, Braegger CP, et al. *Contribution of the MHC region to the familiar risk of celiac disease*. J Med Genet 1999;36:687-90.
- 22.Greco L, Romino R, Coto I, et al. *The first large population based twin study of celiac disease*. Gut 2002;50:624-28.
- 23.Wolters VM, Wijmenga C. *Genetic background of celiac disease and its clinical implications*. Am J Gastroenterol 2008;103:190-95.
- 24.Tollefsen S, Arentz-Hansen H, Fleckenstein B, et al. *HLA-DQ2 and -DQ8 signatures of gluten T cell epitopes in celiac disease*. J Clin Invest 2006;116:2226-36.
- 25.Monteleone G, Del Vecchio Blanco G, Vavassori P, et al. *Regulation of the T helper cell type 1 transcription factor T-bet in celiac disease mucosa*. Gut 2004;53:1090-95.
- 26.Fina D, Sarra M, Caruso R, et al. *Interleukin 21 contributes to the mucosal T helper cell type 1 response in celiac disease*. Gut 2008;57:887-92.

27. Arentz-Hansen H, McAdam SN, Molberg Ø, et al. *Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues*. *Gastroenterol* 2002;123:803-09.
28. Shan L, Molberg O, Parrot I, et al. *Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue*. *Science* 2002;297:2275-79.
29. Reif S, Lerner A. *Tissue transglutaminase-the key player in celiac disease: a review*. *Autoimmun Rev* 2004;3:40-45.
30. Sollid LM. *Celiac disease: dissecting a complex inflammatory disorder*. *Immunol* 2002;2:647-55.
31. Jabri B, Sollid LM. *Mechanisms of disease: immunopathogenesis of celiac disease*. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006;3:516-25.
32. Kaukinen K, Peräaho M, Collin P, et al. *Small-bowel mucosal transglutaminase 2-specific IgA deposits in celiac disease without villous atrophy: a prospective and randomized clinical study*. *Scand J Gastroenterol* 2005;40:564-72.
33. Meresse B, Verdier J, Cerf-Bensussan N. *The cytokine interleukin 21: a new player in celiac disease?* *Gut* 2008;57:879-81.
34. Meresse B, Cerf-Bensussan N. *Innate T cell responses in human gut*. *Semin Immunol* 2009;21:121-29.
35. Wang W, Uzzau S, Goldblum SE, et al. *Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions*. *J Cell Sci* 2000;113:4435-40.
36. Drago S, El Samar R, Di Piero MR, et al. *Gliadin, Zonulin and gut permeability: effects on coeliac and non coeliac intestinal mucosa and intestinal cell lines*. *Scand J Gastroenterol* 2006;41:408-19.

37. Rescigno M, Di Sabatino A. *Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease*. J Clin Invest 2009;119:2441-50.
38. Fasano A, Catassi C. *Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum*. Gastroenterol 2001;120:636-51.
39. Mäki M, Collin P. *Coeliac Disease*. Lancet 1997;349:1755-59.
40. Dickey W, Hughes DF, McMillan SA. *Patients with serum IgA endomysial antibodies and intact duodenal villi: clinical characteristics and management options*. Scand J Gastroenterol 2005;40:1240-43.
41. Piccini B, Vascotto M, Serracca L, et al. *HLA-DQ typing in the diagnostic algorithm of celiac disease*. Rev Esp Enferm Dig 2012;104:248-54.
42. Rostom A, Dubé C, Cranney A, et al. *The diagnostic accuracy of serologic tests for celiac disease: a systematic review*. Gastroenterol 2005;128:38-46.
43. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, et al. *Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease*. Nat Med 1997;3:797-810.
44. Alarida K, Harown J, Ahmaida A, et al. *Coeliac disease in Libyan children: a screening study based on the rapid determination of anti-transglutaminase antibodies*. Dig Liver Dis 2011;43:688-91.
45. Bazzigaluppi E, Roggero P, Parma B, et al. *Antibodies to recombinant human tissue-transglutaminase in coeliac disease: Diagnostic effectiveness and decline pattern after gluten-free diet*. Dig Liver Dis 2006;38:89-102.
46. Troncone R, Mayer M, Spagnolo F, et al. *Endomysial antibodies as unreliable markers for slight dietary transgressions in adolescents with celiac disease*. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1995;21:69-72.

47. Tonutti E, Visentini D, Picierno A, et al. *Diagnostic efficacy of the ELISA test for the detection of deamidated anti-gliadin peptide antibodies in the diagnosis and monitoring of celiac disease.* J Clin Lab Anal 2009;23:165-71.
48. Villalta D, Alessio MG, Tampoaia M, et al. *Diagnostic accuracy of IgA anti-tissue transglutaminase antibody assays in celiac disease patients with selective IgA deficiency.* Ann NY Acad Sci 2007;1109:212-20.
49. Pais WP, Duerksen DR, Pettigrew NM, et al. *How many duodenal biopsy specimens are required to make a diagnosis of celiac disease?* Gastrointest Endosc 2008;67:1082-87.
50. Vande Voort JL, Murray JA, Lahr BD, et al. *Lymphocytic duodenosis and the spectrum of celiac disease.* Am J Gastroenterol 2009;104:142-8.
51. Marsh MN. *Gluten, major histocompatibility complex and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity (celiac sprue).* Gastroenterol 1992;102:330-54.
52. Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H. *The histopathology of celiac disease: time for a standardized report scheme for pathologists.* Eur J Gastroenterol Hepatol 1999;11:1185-94.
53. Villanacci V, Corazza GR. *Coeliac disease.* J Clin Pathol 2005;58:573-4.
54. Akobeng AK, Thomas AG. *Systematic review: tolerable amount of gluten for people with celiac disease.* Aliment Pharmacol Ther 2008;27:1044-52.
55. Hopman EG, Koopman HM, Wit JM, et al. *Dietary compliance and health-related quality of life in patients with celiac disease.* Eur J Gastroenterol Hepatol 2009;21:1056-61.
56. Al Toma A, Visser OJ, van Roessel HM, et al. *Autologous hematopoietic stem cell transplantation in refractory celiac disease with aberrant T cells.* Blood 2007;109:2243-9.

57. Catassi C, Bearzi I, Holmes GK. *Association of celiac disease and intestinal lymphomas and other cancers*. Gastroenterol 2005;128:79-86.
58. Catassi C. *Gluten Sensitivity*. Ann Nutr Metab 2015;67:16-26.
59. Cooke WT, Smith WT. *Neurological disorders associated with adult coeliac disease*. Brain 1966;89:683-722.
60. Jackson JR, Eaton WW, Cascella NG, et al. *Neurologic and Psychiatric Manifestations of Celiac Disease and Gluten Sensitivity*. Psychiatr Q 2012;83:91-102.
61. Ruggieri M, Incorpora G, Polizzi A, et al. *Low prevalence of neurologic and psychiatric manifestations in children with gluten sensitivity*. J Pediatr 2008;152:244-9.
62. Bushara KO. *Neurologic presentation of celiac disease*. Gastroenterol 2005;128:92-7.
63. Zingone F, Siniscalchi M, Capone P, et al. *The quality of sleep in patients with celiac disease*. Aliment Pharmacol Ther 2010;32:1031-36.
64. Moccia M, Pellecchia MT, Erro R, et al. *Restless Legs Syndrome is a common feature of adult celiac disease*. Mov Disord 2010;25:877-81.
65. Bonamico M, Nenna R, Montuori M, et al. *First salivary screening of celiac disease by detection of anti-transglutaminase autoantibody radioimmunoassay in 5000 Italian primary school children*. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2011;52:17-20.
66. Lionetti E, Francavilla R, Maiuri L, et al. *Headache in pediatric patients with celiac disease and its prevalence as diagnostic clue*. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2009;49:1-6.
67. Zelnik N, Pacht A, Obeid R, et al. *Range of neurologic disorder in patients with celiac disease*. Pediatrics 2004;113:1672-76.

68. Alehan F, Ozcay F, Magistà A, et al. *Increased risk for celiac disease in pediatric patients with migraine*. *Cephalalgia* 2008;28:945-49.
69. Nenna L, Petrarca L, Verdecchia P, et al. *Celiac disease in a large cohort of children and adolescents with recurrent headache: A retrospective study*. *Dig Liv Disease* 2016;48:495-98.
70. Vascotto M, Fois A. *Frequency of epilepsy in celiac disease and vice versa: a collaborative study*. In: Gobbi G, Andermann F, Naccarato S, Banchini G, editors. *Epilepsy and other neurological disorders in coeliac disease*. London: John Libbey 1997;105-11.
71. Pratesi R, Gandolfi L, Martins RC, et al. *Is the prevalence of celiac disease increased among epileptic patients?* *Arq Neuropsiquiatr* 2003;61:330-4.
72. Luostarinen L, Dastidar P, Collin P, et al. *Association between coeliac disease, epilepsy and brain atrophy*. *Eur Neurol* 2001;46:187-91.
73. Giordano L, Valotti M, Imberti L, et al. *Celiac disease-related antibodies in Italian children with epilepsy*. *Pediatr Neurol* 2009;41:34-36.
74. Ranua J, Luoma K, Auvinen A, et al. *Celiac disease-related antibodies in an epilepsy cohort and matched reference population*. *Epilepsy Behav* 2005;6:388-92.
75. Pengiran Tengah DS, Holmes GK, Wills AJ, et al. *The prevalence of epilepsy in patients with celiac disease*. *Epilepsia* 2004;45:1291-93.
76. Mavroudi A, Karatza E, Papastavrou T, et al. *Successful treatment of epilepsy and celiac disease with a gluten-free diet*. *Pediatr Neurol* 2005;33:292-95.

77. Peltola M, Kaukinen K, Dastidar P, et al. *Hippocampal sclerosis in refractory temporal lobe epilepsy is associated with gluten sensitivity.* J Neurol Neurosurg Psychiatry 2009;80:626-30.
78. Lionetti E, Francavilla R, Pavone P, et al. *The neurology of coeliac disease in childhood: what is the evidence? A systematic review and meta-analysis.* Dev Med Child Neurol 2010;52:700-7.
79. Sammaritano M, Andermann F, Helanson D, et al. *The syndrome of epilepsy and bilateral occipital cortical calcifications.* Epilepsia 1985;26:530.
80. Gobbi G. *Coeliac disease, epilepsy and cerebral calcification.* Brain & Development 2005;27:189-200.
81. Hadjivassiliou M, Sanders DD, Aeschlimann DP. *Gluten-related disorders: gluten ataxia.* Dig Dis 2015;33:264-8.
82. Hadjivassiliou M, Aeschlimann P, Strigun A, et al. *Autoantibodies in gluten ataxia recognize a novel neuronal transglutaminase.* Ann Neurol 2008;64:332-343.
83. de Magistris L, Familiari V, Pascotto A. *Alterations of the intestinal barrier in patients with autism spectrum disorders and in their first-degree relatives.* J Pediatr Gastroenterol Nutr 2010;51:418-24.
84. Pavone L, Fiumara A, Bottaro G, et al. *Autism and celiac disease: failure to validate the hypothesis that a link might exist.* Biol Psychiatry 1997;42:72-5.
85. Millward C, Ferriter M, Calver S, et al. *Gluten- and casein-free diets for autistic spectrum disorder.* Cochrane Database Syst Rev 2008;2:CD003498.

86. Niederhofer H. *Association of Attention Deficit/Hyperactivity Disorder and Celiac Disease: A Brief report*. Prim Care Companion CNS Disord 2011;13:1672-76.
87. Pynnonen PA, Erkki TI, Aronen ET, et al. *Mental Disorders in Adolescents with Celiac Disease*. Psychosomatics 2004;45:325-35.
88. Cakir D, Tosun YA, Polat YM, et al. *Subclinical Neurological Abnormalities in Children With Celiac Disease Receiving a Gluten-free Diet*. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2007;45:366-69.
89. Hadjivassiliou M, Rao DG, Grinewald RA, et al. *Neurological Dysfunction in Coeliac Disease and Non-Coeliac Gluten Sensitivity*. Am J Gastroenterol 2016;111:561-7.
90. Hadjivassiliou M, Grinewald RA, Lawden M, et al. *Headache and CNS white matter abnormalities associated with gluten sensitivity*. Neurology 2001;56:385-88.
91. Shatin R. *Gluten and multiple sclerosis*. Br Med J 1965;1:1433-4.
92. Frisullo G, Nociti V, Iorio R, et al. *Increased expression of T-bet in circulating B cells from a patient with multiple sclerosis and celiac disease*. Human Immunol 2008;69:837-39.
93. Mormile R. *Multiple sclerosis and susceptibility to celiac disease: an osteopontin gene haplotypes affair?* Immunol Lett 2015;163:132-3.
94. Batur-Caglayan HZ, Irkec C, Yildirim-Capraz I, et al. *A case of multiple sclerosis and celiac disease*. Case Rep Neurol Med 2013;2013:576921.
95. Ching BH, Mohamed AR, Khoo TB, et al. *Multiphasic disseminated encephalomyelitis followed by opticneuritis in a child with gluten sensitivity*. Mult Scler 2015;21:1209-11.

96. Currie S, Hadjivassiliou M, Clark MJR, et al. *Should we be 'nervous' about coeliac disease? Brain abnormalities in patients with coeliac disease referred for neurological opinion.* J Neurol Neurosurg Psychiatry 2012;83:1216-21.
97. Paul F, Pfueller CF, Wuerfel JT, et al. *Celiac antibodies in the diagnostic workup of white matter lesions.* Neurology 2008;71:223-5.
98. Nicoletti A, Patti F, Lo Fermo S, et al. *Frequency of celiac disease is not increased among multiple sclerosis patients.* Mult Scler 2008;14:698-700.
99. Borhani Haghghi A, Ansari N, Mokhtari M, et al. *Multiple sclerosis and gluten sensitivity.* Clin Neurol Neurosurg 2007;109:651-3.
100. de Oliveira P, de Carvalho DR, Brandi IV, et al. *Serological prevalence of celiac disease in Brazilian population of multiple sclerosis, neuromyelitis optica and myelitis.* Mult Scler Rel Dis 2016;9:125-28.
101. Rodrigo L, Hernández-Lahoz C, Fuentes D, et al. *Prevalence of celiac disease in multiple sclerosis.* BMC Neurol 2011;11:31.
102. Ludvigsson JF, Olsson T, Ekbom A, et al. *A population-based study of celiac disease, neurodegenerative and neuroinflammatory diseases.* Aliment Pharmacol Ther 2007;25:1317-27.
103. Wijmenga C, Gutierrez-Achury J. *Celiac disease genetics: past, present and future challenges.* J Pediatr Gastroenterol Nutr 2014;59:S4-7.
104. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, et al. *Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the Mc Donald criteria.* Ann Neurol 2011;69:292-302.
105. Wingerchuk DM, Banwell B, Bennett JL, et al. *International Panel for NMO Diagnosis. International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders.* Neurology 2015;85:177-89.

106. Mustalahti K, Catassi C, Reunanen A, et al. *The prevalence of celiac disease in Europe: results of a centralized, International mass screening project.* Ann Med 2010;42:587-95.
107. Caio G, De Giorgio R, Venturi A, et al. *Clinical and immunological relevance of anti-neuronal antibodies in celiac disease with neurological manifestations.* Gastroenterol Hepatol Bed Bench 2015;8:146-52.
108. Kieslich M, Errazuriz G, Posselt HG, et al. *Brain white matter lesions in celiac disease: a prospective study of 75 diet-treated patients.* Pediatrics 2001;108;E21.
109. Burk K, Farecki M L, Lamprecht G, et al. *Neurological symptoms in patients with biopsy proven celiac disease.* Mov Disord 2009;24:2358-62.
110. Meyts I, Jansen K, Renard M, et al. *Neuromyelitis optica-IgG+ optic neuritis associated with celiac disease and dysgammaglobulinemia: a role for tacrolimus?* Eur J Paediatr Neurol 2011;15:265-67.