

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE CHIRURGICHE
Curriculum**

Scienze medico-chirurgiche gastroenterologiche e dei trapianti

Ciclo XXIX

Settore Concorsuale di afferenza: 06/B1

Settore Scientifico disciplinare: MED/09

**CARATTERISTICHE CLINICHE, ISTOLOGICHE ED
IMMUNOLOGICHE DELL'ADENOCARCINOMA
DELL'INTESTINO TENUE ASSOCIATO ALLA
MALATTIA CELIACA**

Presentata da: Dott. Giacomo Pietro Ismaele Caio

**Coordinatore Dottorato
Prof. Mauro Gargiulo**

**Relatore
Prof. Giovanni Barbara**

**Correlatore
Prof. Umberto Volta**

Esame finale anno 2016

INDICE

•

INTRODUZIONE

- Generalità sui tumori maligni dell'intestino tenue.....pag.1
- L'adenocarcinoma del tenue.....pag.5
 - Epidemiologia.....pag.6
 - Patogenesi.....pag.8
 - La presentazione clinica.....pag.15
 - Diagnosi.....pag.16
 - Prognosi.....pag.29
 - Terapia.....pag.30
- La Malattia Celiaca.....pag.36
- Epidemiologia.....pag.39
 - Patogenesi.....pag.39
 - La presentazione clinica.....pag.42
 - Diagnosi.....pag.44
 - Follow-up.....pag.60
- Celiachia e neoplasie maligne.....pag.61

SCOPO DELLA NOSTRA RICERCA.....pag.64

MATERIALI E METODI

- Popolazione dello studio.....pag.65
- Test anticorpali.....pag.66
- Analisi immunostochimiche.....pag.67
- Analisi genetico-molecolari.....pag.68

RISULTATI.....pag.70

DISCUSSIONE.....pag.73

APPENDICE

- Tabelle.....pag.79
- Immagini.....pag.84

RINGRAZIAMENTI.....pag.88

BIBLIOGRAFIA.....pag.89

INTRODUZIONE

Generalità sui tumori maligni dell'intestino tenue

Le neoplasie dell'intestino tenue comprendono una eterogenea e vasta gamma di tumori benigni e maligni (1,2). Le lesioni maligne più comuni sono costituite da adenocarcinomi, tumori neuroendocrini (NET), sarcomi e linfomi, ma oltre a questi sono stati descritti più di quaranta differenti sottotipi istologici (1,2). Questa categoria di tumori risulta essere sicuramente fra i più rari tipi di neoplasie con una prevalenza di solo il 2% di tutti tumori del tratto gastrointestinale (3). Gli studi sulla storia naturale e sulla prognosi dei pazienti affetti da tali neoplasie sono limitati a causa della scarsità di casi e dell'eterogeneità istopatologica. Ognuno di questi istotipi possiede un proprio comportamento clinico e di conseguenza richiede un differente approccio terapeutico. Sfortunatamente le lesioni maligne sono spesso diagnosticate in fase di metastatizzazione o durante interventi chirurgici per ostruzione intestinale o altre diagnosi. Circa il 98% dei tumori maligni dell'intestino tenue sono costituiti da adenocarcinomi, NET, linfomi, sarcomi e tumori stromali gastrointestinali (GIST) (2,3). Nel 2015 secondo il National Cancer Institute l'incidenza dei tumori maligni dell'intestino tenue negli Stati Uniti è stata stimata essere di 9410 casi, lo 0,6% di tutti i casi di tumore. Di questa coorte 1260 persone sono morte nel corso dello stesso anno (4). Nel 2007 i casi registrati dallo stesso istituto erano 5640, si è quindi assistito ad un raddoppio dei casi in 8 anni. In generale, la prevalenza dei tumori maligni dell'intestino tenue è più elevata nei paesi occidentali industrializzati rispetto all'Asia ed ai paesi meno industrializzati (5). Per

contro i paesi meno industrializzati mostrano una predominanza della patologia linfomatosa intestinale rispetto agli altri istotipi che risultano più frequenti nei paesi industrializzati (5). Studi di popolazione negli Stati Uniti hanno suggerito come vi sia una più alta prevalenza di tumori maligni dell'intestino tenue nei neri rispetto ai bianchi. La popolazione di colore ha almeno un'incidenza doppia di neoplasie del piccolo intestino rispetto ai bianchi (10.6 vs. 5.6 per milione di abitanti) (4, 5). Il sesso maschile ha una maggiore incidenza di tutti i tipi di tumori maligni dell'intestino tenue rispetto alla popolazione femminile, con un rapporto M:F di 1.4:1. (4, 5)

La prevalenza dei tumori maligni dell'intestino tenue tende ad aumentare con l'età, con una età media di circa 60 anni, con picco di incidenza fra i 55 ed i 74 anni (4). In particolare gli adenocarcinomi tendono ad essere diagnosticati in soggetti con un'età più avanzata rispetto agli altri istotipi (6). I tumori maligni dell'intestino tenue sono tipicamente asintomatici negli stadi precoci, ma più del 90% dei pazienti sviluppa dei segni o sintomi con l'avanzare della malattia e questo purtroppo riflette la presenza di una malattia già molto avanzata (1). Spesso per la natura non specifica dei sintomi, si accumula un ritardo significativo fra la loro insorgenza e la diagnosi, mediamente di 8-12 mesi. Nausea, vomito, dolore/discomfort addominale sono comuni sintomi di presentazione, ma circa la metà dei pazienti viene ricoverata in chirurgia d'urgenza per la presenza di una ostruzione intestinale (1,2). Gli studi pubblicati finora sui segni e sintomi delle neoplasie del piccolo intestino non possono essere ancora utilizzati come paradigma per riconoscere clinicamente il tipo di tumore. Nonostante ciò sembra che l'adenocarcinoma sia più frequentemente associato al dolore addominale e all'ostruzione intestinale mentre ad esempio i GIST si presentano molto frequentemente con un sanguinamento acuto

gastrointestinale (1). Dal punto di vista semeiologico i pazienti affetti da questi tipi di tumori possono mostrare poco o nulla all'esame obiettivo. Quando presenti si possono riscontrare un addome teso e disteso in corso di ostruzione, peritonismo nei casi di perforazione, ittero da ostruzione delle vie biliari da malattia metastatica, sangue occulto positivo /sanguinamento franco/ melena.

Adenocarcinoma dell'intestino tenue (SBA)

Della totalità dei tumori riscontrabili nell'intestino tenue circa il 64% sono maligni e circa il 40% di questi ultimi sono adenocarcinomi (7). Gli adenocarcinomi del tenue (SBA- small bowel adenocarcinoma) possiedono una notevole somiglianza agli adenocarcinomi del colon-retto (CRA), in quanto, sebbene gli SBA abbiano una prevalenza pari ad un cinquantesimo dei CRA, mostrano una simile distribuzione geografica con predominanza nei paesi occidentali (8). Oltre a ciò entrambi tendono a presentarsi nello stesso individuo. Infatti nei pazienti sopravvissuti ad un CRA vi è un aumentato rischio di sviluppare un SBA e vice versa (8). Ulteriore similitudine deriva dal fatto che come gli CRA, anche gli SBA nascono da una lesione precancerosa adenomatosa anche se ciò accade solo sporadicamente nel contesto di una poliposi adenomatosa familiare (8). Attraverso un accumulo graduale di mutazioni genetiche, questi adenomi si trasformano dapprima in displastici, poi in carcinomi in situ ed infine in adenocarcinomi invasivi. Tale tipo di neoplasia tende a metastatizzare, attraverso il sistema linfatico ed il circolo portale, al fegato, polmoni, ossa, cervello e altri organi (8).

Nonostante le somiglianze con l'CRA, lo SBA tende a svilupparsi nella parte prossimale dell'intestino tenue, lontano dal colon. Infatti circa il 50% si forma nel duodeno, il 30% nel digiuno e solo il 20% nell'ileo (7,8).

Si può notare come il duodeno sia la prima porzione dell'intestino tenue ad essere esposta agli agenti chimici introdotti con la dieta e alle secrezioni pancreaticobiliari. Questa sua caratteristica associata alla più elevata prevalenza di cancro proprio in questa sede potrebbe indicare che alcune sostanze esogene mescolandosi con i succhi gastro-entero-biliari possano sviluppare

capacità cancerogene (8). Studi su animali hanno mostrato infatti come la diversione della bile in modelli sperimentali abbia ridotto l'incidenza di tumori del tenue sperimentalmente indotti (8). Riguardo alla patogenesi di queste due forme tumorali, le analisi genetiche effettuate sui casi di SBA sporadici suggeriscono alcune affinità ed importanti differenze con il CRA. Per esempio la mutazione del gene oncosoppressore APC che è caratteristica dei CRA, non è affatto frequente negli SBA, mentre le mutazioni di *K-ras* e la overespressione di *p53* sembrano essere comuni ad entrambi i tipi di neoplasia (8, 9, 10). Anche il gene *SMAD4/DPC4* che risulta spesso essere mutato nei CRA, sembra essere inattivato negli SBA (11, 12).

Epidemiologia

Nonostante l'intestino tenue costituisca il 75% della lunghezza del canale alimentare ed il 90% della sua superficie mucosale, gli SBA sono un tumore raro, contando per solo il 5% di tutti i tumori gastrointestinali (3). Come già accennato i casi di SBA sono circa il 40% di tutti i casi di tumore maligno del piccolo intestino (13-15) ed in uno studio del 2002, nella popolazione statunitense, sono stati stimati circa 5300 nuovi casi/ anno e circa 1100 pazienti deceduti/anno (16). In Europa secondo i dati dell'EUROCORE il numero stimato di nuovi casi/anno risulta essere di 3600 con una incidenza di 5.7 casi/milione di abitanti, con un'età mediana di diagnosi nella sesta decade di vita (17).

Il duodeno è la sede più colpita nel 55-82% dei casi, seguito dal digiuno (11-25%) e dall'ileo (7-17%) (13,14, 18-20).

Patogenesi

Meccanismi di carcinogenesi

Diversamente dal CRA, gli studi sulla patogenesi del SBA sono difficilmente eseguibili a causa della rarità di queste forme tumorali. Partendo dai fattori ambientali più comuni come rischio di sviluppo di neoplasia, sicuramente il consumo di alcol e il fumo aumentano il rischio di sviluppare uno SBA (21, 22). Ulteriori studi hanno riportato un aumentato rischio anche nei consumatori di elevate quantità di zuccheri semplici, cereali raffinati, carni rosse o cibi affumicati, mentre è stata osservata una riduzione del rischio in coloro che consumano elevate quantità di caffè, pesce, frutta e verdura (23,24). L'enorme differenza fra l'incidenza dei SBA rispetto ai CRA suggerisce un possibile differente esposizione agli agenti cancerogeni. Nell'intestino tenue il contatto fra enterociti e sostanze xenobiotiche o carcinogeni alimentari è inferiore rispetto al colon e questa differenza è dettata dai tempi di transito intestinale. Oltre a ciò i due ambienti posseggono un microbiota completamente differente. Nonostante la densità numerica microbica vada aumentando dal duodeno verso l'ileo, quest'ultima non sarà mai paragonabile a quella contenuta nel colon, ove il microbiota effettua numerose reazioni chimiche durante le quali ad esempio i sali biliari sono deconiugati ed idrossilati verso forme di acidi desossicolici che sono riconosciuti essere potenziali cancerogeni (25). Oltre a ciò gli enterociti sono dotati di un'ampia gamma di enzimi microsomiali (e.g. benzopirene idrossilasi) che possono proteggerli da eventuali carcinogeni alimentari (26). Nonostante tutte le ipotesi formulate non sono noti i meccanismi che fanno predilire un tratto del canale alimentare rispetto ad un altro nello sviluppo di neoplasie. La carcinogenesi del SBA è assolutamente sottostudiata a causa

della rarità della condizione, infatti sono stati condotti solo pochi studi, su pochi pazienti. I principali geni coinvolti nella patogenesi del CRA sono stati studiati anche nel SBA con risultati riassunti nella Tabella 1.

In oltre l'80% dei CRA sporadici è presente una mutazione per delezione del gene della poliposi adenomatosa colica (APC), ciò causa una perdita di regolazione della β -CATENINA che viene ad accumularsi nel nucleo delle cellule. Questa mutazione è considerata uno dei principali eventi che innescano la carcinogenesi colo-rettale. Per quanto concerne invece l'SBA, alcuni studi hanno riportato una prevalenza della mutazione di APC molto più bassa rispetto al CRA, compresa fra lo 0% ed il 18% (27, 28, 29) (Tabella 1). Tali studi indicherebbero che la carcinogenesi del SBA segua diverse pathway rispetto a quella del CRA. Nonostante ciò diversi studi hanno riportato un significativo (circa il 50 % dei casi) accumulo di β -catenina nei nuclei delle cellule di SBA, in questo caso dovuto non tanto alla mutazione delettiva di APC, quanto ad una probabile mutazione gain of function nel gene della stessa β -CATENINA (27,30,31) (Tabella 1). Oltre alla β -CATENINA, sono state riportate altre proteine anomale negli SBA. Una ridotta espressione di E-CADERINA è stata riscontrata da uno studio nel 38% dei casi (27). Un aumento dell'espressione della proteina p53 è stato riscontrato nei nuclei di cellule SBA in percentuali variabili a seconda degli studi fra il 24% ed il 52% (27, 28, 30, 32). Una perdita di espressione della proteina SMAD4 è stata riscontrata da uno studio nel 18% dei casi (32). Anche una espressione aberrante del fattore di crescita vasculo-endoteliale tipo A (VEGF-A) e del recettore per il fattore di crescita epidermico (EGFR) sono stati riscontrati rispettivamente nel 92% e nel 66% dei casi di SBA studiati, suggerendo l'ipotesi che i tipi di SBA che mostrano tali stigmati possano essere trattati da terapie biologiche specifiche per le pathway di

EGFR e di VEGF (33). Anche KRAS ha mostrato di essere mutato in una consistente percentuale di casi fra il 43% ed il 57% (30, 34), in particolare in una casistica selezionata di 78 SBA localizzati unicamente nel duodeno ha mostrato una frequenza di mutazione pari al 34% (35). Per quanto riguarda HER2, due studi usando tecniche immunohistochimiche e non molecolari, hanno mostrato una bassissima espressione di tale proteina con una frequenza del 1,7%-3,9% ed i pochi casi riscontrati avevano una localizzazione ileale (30,33).

Anche i geni per il sistema di proteine del DNA mismatch repair (MMR) sono stati oggetto di studio negli SBA. Dai dati della letteratura tali geni sono stati trovati inattivati in circa il 15% dei CRA (36). Tale inattivazione, nei casi di CRA rientranti nella cosiddetta Sindrome di Lynch, risulta essere causata da una mutazione nelle linee germinali di uno dei 4 geni MMR (generalmente MSH2 o MLH1 e più raramente MSH6 o PMS2); mentre nei casi sporadici (particolarmente nei soggetti in età avanzata) da un'ipermetilazione del promotore di MLH1 (37). Negli studi disponibili in letteratura e riassunti nella Tabella 1, la frequenza di un MMR difettivo negli SBA è variabile fra il 5% ed il 35% dei casi (27, 29, 30, 32, 33, 38). Analizzando gli studi più nel particolare, si nota come nei pazienti con SBA sporadico il difetto di MMR è stato riscontrato in solo un paziente su 21 (circa il 5% dei casi) (27). In un altro studio comprendente 89 pazienti con SBA la frequenza di un MMR difettivo è stata riscontrata nel 18% dei casi (38). In particolare gli autori riscontravano una perdita di espressione di MLH1 in quasi la metà (7 su 16) dei casi di SBA con MMR difettivo. Inoltre fra i pazienti con età inferiore ai 60 anni il fenotipo MMR difettivo con perdita di espressione delle proteine MLH1 e MSH2 è stato riscontrato in 10/43 casi (23%) (38). Dato interessante di questo studio è che non solo la

frequenza di un MMR difettivo sembra essere maggiore negli SBA rispetto ai CRA ma che essa è più frequente nei pazienti giovani, suggerendo che l'MMR difettivo possa essere relato più spesso alla S. di Lynch nei pazienti con SBA rispetto ai pazienti con CRA (38). In un altro studio comprendente 54 pazienti con SBA, una perdita di espressione di uno dei 4 geni delle proteine MMR si verificava nel 35% dei casi (33). In particolare, analizzando la perdita di funzione dei 4 geni che codificano per il sistema di proteine MMR, il gene MSH2 era non funzionante nel 6% dei casi, MSH6 nell' 11%, PMS2 nel 24% e MLH1 nel 26% (33). Dato interessante è che la perdita di funzione del sistema di proteine MMR seguiva due differenti pattern. Quando era difettivo MSH2 lo era anche MSH6; mentre quando era non funzionante MLH1 anche PMS2 era difettivo (33). In un altro studio un fenotipo difettivo del sistema MMR, dovuto alla perdita di funzione di MLH1, è stato osservato in 14/61 pazienti (23%) (30). Sempre nello stesso studio veniva riscontrato come un MMR difettivo era più spesso riscontrato nei tumori a localizzazione duodenale (9/32) o digiunale (5/18) rispetto agli ileali (0/13). La caratterizzazione delle alterazioni genetiche ed epigenetiche degli SBA è stata esplorata in un ulteriore studio comprendente 37 pazienti (39). In tale studio un'instabilità cromosomica è stata riscontrata in 22/37 (59%) SBA. Questo gruppo di tumori con instabilità cromosomica era costituito da tre tumori con instabilità dei microsatelliti (su 9 totali) e 19 con stabilità dei microsatelliti (su 28 totali). Nove su 37 SBA (24%) risultavano essere stabili sia cromosomicamente che per i microsatelliti. Una ipermetilazione del DNA è stata riscontrata nel 16% dei tumori con instabilità cromosomica e nel 44% di quelli con instabilità dei microsatelliti, stessa percentuale del 44% in quelli stabili sia cromosomicamente che per i microsatelliti (39). Una mutazione di KRAS è stata osservata nel 55% dei tumori con instabilità cromosomica e nel 10% di quelli con stabilità sia

cromosomica che dei microsatelliti. Invece nel gruppo con instabilità dei microsatelliti non sono state riscontrate mutazioni di KRAS. Per quanto riguarda lo studio delle mutazioni di BRAF veniva riscontrata una mutazione nel 6% dei tumori con instabilità cromosomica, nel 22% di quelli con instabilità microsatellitare e nel 22% di quelli stabili sia cromosomicamente che per i microsatelliti (39). Viene quindi a delinearsi un'ipotesi secondo la quale gli SBA con instabilità cromosomica avrebbero più frequentemente la presenza di una mutazione di KRAS e meno metilazioni aberranti del DNA rispetto agli altri sottotipi. Questi dati suggeriscono anche che gli SBA ed i CRA possano appartenere a differenti sottogruppi molecolari (39).

Tutti i dati presentati finora suggeriscono l'esistenza di un percorso patogenetico comune fra SBA e CRA. Nonostante ciò, la mutazione di APC è poco presente negli SBA rispetto ai CRA, sebbene la via di trasduzione WNT sia comunque coinvolta attraverso una alterazione della β -CATENINA. Inoltre la presenza di un difetto delle proteine MMR sembra avere un ruolo in alcuni sottotipi di SBA, ma in ogni caso risulta un meccanismo più rappresentato negli SBA rispetto ai CRA (6). Tutti questi dati vanno però pesati considerando un possibile bias dovuto ad una eccessiva inclusione negli studi di pazienti con S. di Lynch e solo futuri studi su ampie coorti di pazienti non selezionati porterà a migliori conoscenze nei meccanismi patogenetici coinvolti nello sviluppo del SBA.

Predisposizioni genetiche allo sviluppo del SBA

Poliposi adenomatosa familiare (FAP)

La FAP è una malattia autosomica dominante con penetranza completa. Esordisce in età infantile, benché la sua espressione si completi intorno alla terza decade di età. Viene acquisita una mutazione in eterozigosi del gene

codificante la proteina APC, che risiede nel braccio lungo del cromosoma 5. La malattia esordisce quando il gene sano dell'APC subisce una mutazione tale da non poter più supplire alla mancata funzionalità del prodotto proteico del gene ereditato (two-hit hypothesis). Tale condizione porta ad un'eccessiva proliferazione cellulare, con formazione di polipi pedunculati e sessili e all'acquisizione di ulteriori modificazioni geniche quali la mutazione dei geni p53 e p16. I pazienti affetti da questa condizione sono soggetti ad una elevata incidenza di CRA e di SBA in giovane età (40). In un ampio studio di registro su 1255 pazienti affetti da FAP 57 (4,5%) avevano uno SBA. La localizzazione era in 29 casi nel duodeno (50%), in 10 casi a livello dell'Ampolla di Vater (18%), in 7 casi nello stomaco (12%), in 5 casi nel digiuno (8,5%) ed in un solo caso nell'ileo (1,7%) (40). Il rischio relativo di sviluppare uno SBA duodenale risulta essere aumentato di 330 volte rispetto alla popolazione generale (41). Sebbene il rischio di sviluppare uno SBA nei pazienti con FAP sia inferiore al 5%, questa neoplasia è la principale causa di morte legata a tumore nei pazienti che hanno subito una colectomia totale (42, 43).

Sindrome di Lynch

La sindrome di Lynch (carcinosi ereditaria del colon-retto su base non poliposica, Hereditary Non-Polyposis Colon Cancer - HNPCC) è una forma ereditaria di tumore al colon con trasmissione dominante. Essa è causata da una mutazione nelle linee germinali per uno dei geni MMR (generalmente MSH2 o MLH1 e più raramente MSH6 o PMS2). Diversamente dalla FAP, la predisposizione allo sviluppo della malattia non si manifesta con la comparsa di polipi, ma direttamente con lo sviluppo della neoplasia, in genere intorno ai 45 anni di età. Oltre al tumore al colon, comprende altre

possibili neoplasie a livello dell'endometrio, dell'ovaio, dello stomaco, del tratto urinario, dei dotti biliari ed anche dell'intestino tenue. In letteratura sono stati riportati diversi valori di rischio relativo di SBA nei pazienti con S. di Lynch. In uno studio olandese è stato stimato essere compreso fra 25 volte (nelle fasi precoci di malattia) a 291 volte (95% con intervallo di confidenza 71-681) in caso di mutazione di MLH1 o 103 volte (95% con intervallo di confidenza 14-729) in caso di mutazione di MSH2 (44, 45). Nonostante ciò il soggetto con S. di Lynch ha un rischio cumulativo di sviluppare un SBA durante la vita relativamente basso compreso fra lo 0,6% e 1% (46, 47). Proprio per questo motivo al momento non è raccomandata l'esecuzione di uno screening per la S. di Lynch nei pazienti con SBA, ma è assolutamente utile analizzare il fenotipo MMR (48, 49).

Sindrome di Peutz-Jeghers

La sindrome di Peutz-Jeghers è una malattia genetica autosomica dominante dovuta alla mutazione del gene oncosoppressore STK11/LKB1. Questa malattia predispone allo sviluppo di una poliposi amartomatosa benigna del tratto gastrointestinale, di una melanosi in prossimità degli orifizi ed ad una aumentata incidenza di tumori in generale. Uno studio ha indicato come il rischio relativo di sviluppare uno SBA in questa sindrome di pari a 520 (95% intervallo di confidenza 220-1306) (50). E' stato ipotizzato che lo SBA possa originare dalla neoplasia intraepiteliale osservata nelle lesioni amartomatose.

Predisposizioni cliniche non-genetiche allo sviluppo del SBA

Morbo di Crohn

La malattia di Crohn è una patologia infiammatoria cronica dell'apparato digerente, con andamento clinico ricorrente che può interessare qualsiasi segmento del tratto gastrointestinale, anche se l'ileo distale è la sede più frequentemente coinvolta. L'infiammazione cronica induce la liberazione di numerose citochine (TNF- α , TNF- γ , IL1, IL6, IL12, IL15, GM-CSF, TGF, M-CSF G-CSF, IL3, IL7) che interagiscono con recettori sulla superficie delle cellule o su geni target innescando una cascata di eventi che può portare allo sviluppo di neoplasie attraverso l'accessione di vie proliferative e attraverso i meccanismi di immunosoppressione indotti dalle terapie (25). Non a caso, quando si sviluppa, l'SBA si localizza nei segmenti di intestino interessati dall'infiammazione. L'aumento del rischio relativo di sviluppo di uno SBA in corso di M. di Crohn è stato stimato essere fra 17 e 41 volte rispetto alla popolazione generale (51, 52). Diversamente dal SBA sporadico, quello associato al M. di Crohn, si manifesta in pazienti più giovani (quarta decade di vita) e principalmente nel segmento ileale. Anche in questo caso il rischio cumulativo risulta essere basso: 0,2% dopo dieci anni e 2,2% dopo 25 anni dalla diagnosi di Crohn (53). Un ulteriore studio, effettuato mediante un cosiddetto database SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results), considerando unicamente pazienti con età superiore a 65 anni, ha identificato 923 casi di SBA e 142.273 controlli, confermando un rischio aumentato di SBA nei pazienti con Crohn (Odd ratio 12.07; intervallo di confidenza 6.07-20.80) (54). In tale studio la prevalenza di Crohn nei pazienti con SBA risultava bassa (1,6%). Bisogna però considerare che alcuni casi di SBA potrebbero essere stati persi in questo database di pazienti con età > 65 anni, in quanto l'età media di sviluppo dello SBA nei pazienti con Crohn è inferiore (54). Dato interessante emerge da uno studio che ha evidenziato come i pazienti che avevano subito una

resezione intestinale o una terapia prolungata con salicilati avessero un minor rischio di sviluppare uno SBA (55).

Malattia celiaca (MC)

L'oggetto di questa tesi di dottorato riguarda proprio l'associazione fra SBA e malattia celiaca ed in questa sezione si accennerà solo brevemente a tale relazione, lasciando una trattazione più approfondita al capitolo successivo. La MC è una malattia infiammatoria cronica dell'intestino su base autoimmune scatenata dall'introduzione di glutine in soggetti geneticamente predisposti (56). Essa è caratterizzata da un infiltrato linfocitario che induce un danno alle cellule epiteliali portando ad un aumentato rischio di trasformazione neoplastica, in particolare linfomi intestinali e SBA (57, 58, 59). Questo rischio è noto ormai da molti anni, infatti nel 1983 uno studio su 235 pazienti con MC aveva mostrato una prevalenza di SBA nell'8% dei casi (60). In un'ulteriore indagine su 395 casi di tumori intestinali (107 linfomi, 175 SBA e 79 NET), la MC è stata diagnosticata nel 13% dei casi di SBA e nel 39% dei linfomi intestinali; la sua localizzazione era principalmente digiunale (61). In uno studio di registro svedese il rischio relativo di SBA nei pazienti con MC è stato trovato essere 10 volte superiore rispetto alla popolazione generale (62).

Una task force di esperti a livello mondiale ha da qualche anno creato un gruppo per lo studio dello SBA nel contesto dell'“International Rare Cancers Initiative” (63). All'ultimo incontro tenutosi a Chicago nel Maggio 2014 sono stati riportati i risultati preliminari di uno studio prospettico francese che alla data del convegno aveva reclutato 189 casi di SBA. Tali dati riporterebbero che circa il 20% dei casi di SBA sia dovuto alla sottostante

presenza di una delle condizioni predisponenti appena descritte. In particolare 8.6% M. Crohn, 3% FAP, 3% S. di Lynch, 1,5% MC, 0,8% S. di Peutz-Jeghers (6, 63).

Presentazione clinica

La presentazione clinica di natura assolutamente non specifica dello SBA spesso esita in una diagnosi tardiva e di conseguenza in una pessima prognosi. I sintomi quando presenti vengono a manifestarsi già in una fase di malattia avanzata e possono comprendere nausea, vomito, calo ponderale, anemia, dolore addominale. Tutti questi sintomi sono altamente aspecifici e di elevata frequenza nella popolazione e spesso l'SBA non viene neanche considerato nella diagnosi differenziale. In uno studio monocentrico di 217 pazienti con SBA, il 66% presentava dolore addominale alla diagnosi (18). L'SBA era solitamente diagnosticato in un contesto di emergenza causato da occlusione intestinale nel 40% dei casi o emorragia gastrointestinale nel 24%. L'ostruzione intestinale era più frequentemente osservata nei casi digiunali ed ileali e meno in quelli duodenali (47% vs. 34%) (18). In questo studio di registro le diagnosi effettuate nel periodo successivo al 1988, anno dopo il quale gli esami di tomografia computerizzata (TC) sono diventati di più facile accesso, la diagnosi di SBA è stata effettuata da una esofagogastroduodenoscopia (EGDS) nel 28% dei casi, laparotomia nel 26%, pasto frazionato del tenue con bario nel 22%, TC nel 18%, ecografia addominale nel 3%. La diagnosi è stata effettuata quasi sempre in fase avanzata, quando i pazienti già mostravano metastasi a distanza (nel 35% dei casi) o invasione linfonodale (nel 39% dei casi) (18). Tali dati sono stati confermati anche da un ulteriore studio su 129 pazienti nel quale il 38%

aveva già metastasi a distanza e 38% invasione linfonodale (64). Per quanto riguarda i casi in pazienti con M. di Crohn la diagnosi è stata ottenuta post-interventi di resezione per ostruzione di segmenti intestinali (53).

Diagnosi

La natura polimorfa ed aspecifica dei sintomi dello SBA, uniti alla mancanza di segni semeiologici all'esame obiettivo può spesso portare ad un ritardo diagnostico (1,2). Uno studio ha mostrato come la mancata prescrizione di un esame diagnostico appropriato o una errata interpretazione dei risultati causi un ritardo compreso fra gli 8 ed i 12 mesi nella diagnosi, mentre il ritardo diagnostico dovuto al fatto che il paziente non riferisca i sintomi al medico era solo di 2 mesi (65). Dal momento che la prognosi è strettamente legata all'estensione di malattia, una diagnosi ed un trattamento precoce può contribuire ad un esito favorevole (1, 2, 6, 65). Proprio per questo motivo nel work-up diagnostico di tutti i pazienti i cui sintomi rientrano in quelli descritti, un SBA o un qualsiasi altro tumore del tenue deve entrare in diagnosi differenziale. Gli esami fondamentali di primo livello sono sicuramente un'anamnesi ed un esame obiettivo accurato, la ricerca del sangue occulto fecale (SOF) in almeno 3 campioni, emocromo, elettroliti e batteria epatica.

Non esiste una singola strategia che sia la migliore per lo studio del tenue in un paziente con sospetta neoplasia ed è attualmente oggetto di discussione quanto approfondito debba essere il work-up diagnostico per escludere con ragionevole certezza la presenza di tumore del piccolo intestino. Ovviamente a seconda dello scenario clinico potranno essere necessarie poche o numerose indagini. C'è una scuola di pensiero che ritiene, qualora vi sia un sospetto elevato, di eseguire almeno due metodiche di imaging (e.g.

videocapsula ed enteroscopia con doppio pallone) (66, 67), ma su tale raccomandazione (di grado 2C) non c'è consenso in letteratura. Sono comunque disponibili diverse indagini per indagare un paziente con sospetto tumore del tenue (Tabella 2) e che verranno ora trattate nello specifico.

Imaging radiografico

Rx diretto dell'addome

L'RX diretto dell'addome è di scarsa utilità se non nel caso di ostruzione intestinale, condizione comunque non specifica.

Rx prime vie del tubo digerente e pasto frazionato del tenue con bario

Tale metodica può mostrare la presenza di una massa, perforazione o intussuscezione. In vecchie casistiche, la sensibilità veniva stimata intorno al 50-60% per quanto riguarda l'individuazione di neoplasie maligne del tenue avanzate (68, 69, 70). Per quanto riguarda lo SBA il pasto frazionato del tenue con bario ha dimostrato di avere una sensibilità di circa il 50% (71).

Tomografia computerizzata (TC)

La TC è molto spesso utilizzata per valutare sintomi vaghi o indeterminati soprattutto in un contesto di Pronto Soccorso. Tale indagine è in grado di rilevare anomalie in circa il 70-80% dei pazienti con tumori del piccolo intestino (72, 73) anche se mediamente ha una accuratezza del 47% (74, 75). Oltre che individuare il tumore primitivo, la TC è di fondamentale importanza per la valutazione dell'estensione di malattia con metastasi a distanza ed invasione linfonodale. Inoltre, specifici comportamenti

radiografici possono indirizzare verso un'ipotesi di diagnosi istologica (76, 77).

Angiografia e scintigrafia

Nei pazienti con un sanguinamento attivo l'angiografia o la scintigrafia con globuli rossi marcati con Tecnezio 99m possono aiutare nel localizzare il sito di sanguinamento. Comunque questi due esami sono raramente indicati nell'iniziale work-up diagnostico di un paziente con sospetta neoplasia intestinale.

Enteroclisi ed enterografia

L'enteroclisi è uno studio radiologico con doppio contrasto eseguito mediante l'inserimento di un sondino naso-gastrico (SNG) fino al duodeno ed iniettando a questo livello bario e metilcellulosa. Questa tecnica risulta essere superiore all'Rx prime vie con pasto frazionato nel identificare neoplasie dell'intestino tenue (68). In uno studio la sensibilità dell'enteroclisi nell'individuare un tumore maligno del tenue era 90% vs. 33% del Rx con pasto frazionato (68). Per contro l'enteroclisi spesso non individua le lesioni piatte infiltranti.

Entero-TC

Questo esame ha praticamente sostituito l'enteroclisi, poiché non richiede l'inserimento di un SNG ed è meglio tollerato dai pazienti (78). Al soggetto viene richiesto di bere un mezzo di contrasto enterico attenuato-neutro (spesso bario diluito a basse concentrazioni e acqua), ciò causa una distensione del lume intestinale senza interferire con la capacità della TC di visualizzare sia il lume stesso che la parete del viscere. In uno studio, 219

pazienti con un sospetto clinico di neoplasia del piccolo intestino ed una EGDS o pancolonscopia (PCS) negativa, sono stati sottoposti ad enteroTC (79). I casi riscontrati come positivi all'enteroTC sono stati correlati ai risultati della laparotomia o a procedure endoscopiche avanzate, mentre i casi negativi sono stati correlati ai risultati della laparotomia, enteroscopia intraoperatoria, videocapsula o follow-up clinico. Una massa del tenue è stata riscontrata dall'EnteroTC in 55 pazienti, dei quali in 50 è stata confermata: questo indica la presenza di 5 falsi positivi (9%). Di questi due risultavano essere ispessimenti da ripiegamento all'enteroscopia preoperatoria, due polipi del tenue e una piccola massa di 18 mm: tutti e tre questi casi sono stati confermati come mucosa normale all'atto chirurgico o all'enteroscopia preoperatoria (79). Dei 164 pazienti risultati negativi all'indagine, un tumore del tenue è stato riscontrato in 9 casi. Alla luce di tali dati la sensibilità della metodica in centri specializzati di terzo livello risulterebbe del 85%, la specificità 97%, con un valore predittivo negativo (VPN) del 95% ed un valore predittivo positivo (VPP) del 91%. Rimane da chiarire come tali risultati possano essere raggiunti in altri centri specialistici.

Entero-Risonanza Magnetica (RM)

Questa nuova metodica, sebbene non sia diffusa come la EnteroTC, è considerata un'accurata tecnica per la diagnosi e per escludere la presenza di una neoplasia del piccolo intestino (80, 81, 82). In uno studio, 91 pazienti sintomatici con sospetta o accertata diagnosi di neoplasia del tenue o altre patologie a tale livello, sono stati sottoposti ad entero-RM (80). Le immagini di entero-RM sono state interpretate da due radiologi specialisti che erano non a conoscenza della storia clinica dei pazienti. Su 91 casi, 86 sono stati interpretati correttamente con una accuratezza diagnostica del 95%. Una neoplasia del tenue è stata confermata istopatologicamente in 32. La

sensibilità, specificità, VPP e VPN risultavano rispettivamente 94%, 95%, 91% e 97 % per il primo radiologo e 91%, 97%, 94% e 95% per il secondo (80). In un ulteriore studio su 158 pazienti con sospetta neoplasia del tenue, dopo l'esecuzione di EGDS e PCS risultate negative, una entero-RM preoperatoria ha identificato 31 su 32 casi di tumore (97%), senza falsi positivi (82). Un suggerimento sulla possibile istologia di tali tumori è risultata veritiera nel 62% dei casi (82).

I risultati descritti sono però stati ottenuti in uno studio retrospettivo, in un centro di terzo livello e con un campione poco numeroso: per questo motivo i risultati non sono comparabili a quelli ottenibili nella reale pratica clinica.

Tomografia ad emissione di positroni (PET)

La PET con 18-Fluoro-deossiglucosio (FDG), in particolare se abbinata alla TC (PET/TC), può essere molto utile come esame per la diagnosi iniziale, per la stadiazione, per la risposta al trattamento e per la valutazione di eventuali recidive. L'utilità di questo esame varia a seconda dell'istologia del tumore che si sta studiando e per quanto riguarda l'adenocarcinoma (a differenza di altri istotipi), la PET/TC è in grado di individuare la lesione primitiva (83, 84, 85), sebbene la sensibilità rispetto alle altre metodiche non sia mai stata sistematicamente studiata. Anche se a tutt'oggi studi formali sull'utilizzo della PET/TC non sono mai stati effettuati nello SBA, sembra ragionevole rifarsi all'esperienza accumulata con i casi di CRA nei quali la PET è un esame fondamentale.

I pro ed i contro delle diverse tecniche radiologiche descritte sono riassunti nella Tabella 2.

Tecniche endoscopiche

Esofagogastroduodenoscopia (EGDS)

L'EGDS standard può raggiungere unicamente la seconda porzione duodenale. Può essere utilizzata nel caso si sospetti una lesione prossimale o come indagine di primo livello nel sanguinamento gastrointestinale.

Pancolonscopia con ileoscopia retrograda (PCSIR)

La PCSIR può esplorare solamente l'ileo distale per alcuni centimetri e non sempre è possibile il passaggio della valvola ileo-ciecale. Può essere utilizzata se si sospetta una lesione dell'ultima ansa ileale o come indagine di primo livello nel sanguinamento gastrointestinale.

Videocapsula (VCE)

Tale tecnologia fornisce un mezzo non invasivo per visualizzare l'intero intestino tenue. E' ormai diventato un approccio diagnostico standard nei pazienti con sanguinamento del tratto gastrointestinale con negatività di EGDS e PCS (86). L'utilità della VCE nella diagnosi dei tumori del piccolo intestino è stata dimostrata da uno studio retrospettivo su 562 pazienti (87). L'indicazione all'esecuzione dell'esame era per il 79% costituita da sospetto sanguinamento a livello del tenue, dolore addominale cronico nel 5% e ricerca di NET primitivo nel 4%. Ad un totale di 50 pazienti è stato diagnosticato un tumore dell'intestino tenue e di questi il 48% era maligno. Nel gruppo di pazienti di età inferiore a 50 anni che avevano effettuato l'esame per sospetto sanguinamento del tenue, 9 pazienti su 69 (13%) avevano un tumore del tenue (87). Fra questi era presente un falso positivo (negativo all'esplorazione chirurgica), ma un numero esatto di falsi negativi non poteva essere determinato dallo studio in quanto mancavano

informazioni sul follow-up dei pazienti risultati negativi all'esame (87). Questo dato però viene fornito da una meta-analisi su 24 studi (530 pazienti) nella quale la VCE è stata paragonata con un work-up diagnostico in assenza di quest'ultima (88). Sono state diagnosticate 106 neoplasie del tenue delle quali la VCE non aveva individuato 20 casi (19% di falsi negativi), mentre il work-up diagnostico standard senza VCE aveva un tasso di mancata individuazione pari al 63% (88).

Il principale svantaggio della VCE consiste nell'impossibilità di effettuare campionamento bioptico e nell'impossibilità di effettuare l'esame nei pazienti con ostruzione intestinale, dal momento che la capsula potrebbe essere ritenuta e per il recupero sarebbe necessaria una laparotomia.

ENTEROSCOPIA

Il termine enteroscopia si riferisce al passaggio di un colonscopio o di un particolare enteroscopio oltre il Treitz usando principalmente tre tecniche: la "push enteroscopy", l'enteroscopia intraoperatoria e l'enteroscopia profonda con singolo pallone, con doppio pallone o spirale (89, 90). Il principale vantaggio rispetto alla VCE è la possibilità di eseguire campionamento bioptico ed interventi terapeutici. Tale procedura può essere complementare alla VCE, consentendo di effettuare procedure interventive o biopsie sulle lesioni indentificate con la VCE.

Questa procedura risulta però abbastanza invasiva e può risultare tecnicamente molto difficile, inoltre per effettuarla è richiesta una lunga esperienza e gli strumenti non sono sempre disponibili in molti ospedali (89). Le diverse tecniche ovviamente si distinguono sia per la loro capacità di esplorare il tenue distale che per la possibilità di effettuare manovre terapeutiche.

Enteroscopia “push”

Questa tecnica consiste nel passaggio dal cavo orale di uno strumento dedicato o di un colonscopio con il quale si superi il ligamento di Treitz. Gli strumenti hanno una lunghezza di 200-250 cm anche se la profondità raggiungibile nel tenue è sicuramente limitata a causa dei “loop” e della tolleranza del paziente all’esame (89). A seconda della strumentazione e delle tecniche utilizzate si stima che sia possibile studiare dai 25 agli 80 cm di digiuno oltre il Treitz (91). L’estensione del tratto di digiuno esplorabile può essere aumentata sfruttando un particolare “device” detto “overtube” che va a posizionarsi a livello dello stomaco, il cui scopo è ridurre i “looping” dello strumento, ma l’effetto di tale accorgimento non è stato studiato in termini di miglioramento di diagnosi o terapia (92, 93).

Enteroscopia “deep”

Questa metodica comprende tre tecniche: l’enteroscopia a doppio pallone, l’enteroscopia a singolo pallone e l’enteroscopia spirale. Tutte e tre le tecniche consentono sia l’esplorazione sia manovre interventive-terapeutiche in teoricamente tutto il tenue (89). Gli strumenti sono costituiti da differenti “overtube” con un design che va perfettamente a posizionarsi su un enteroscopio flessibile. Ognuno dei device è realizzato in modo da minimizzare il “looping” dell’intestino tenue quando scorre lungo l’enteroscopio, analogamente a ciò che accade fra una tenda e la sua asta. Il device con il pallone può essere utilizzato sia in senso anterogrado che retrogrado, mentre il device a spirale viene soprattutto utilizzato in senso anterogrado e solo raramente in senso retrogrado (89). Tutte queste metodiche di studio del tenue vengono effettuate in anestesia generale anche se in letteratura è descritta la possibilità di effettuarla in sedazione profonda (89).

Enteroscopia mediante pallone

Questa metodica come detto include due tecniche: Enteroscopia a doppio pallone (DBE) ed a singolo pallone (SBE). Sono due strumenti simili che si differenziano per come il pallone è attaccato allo strumento. Nella SBE il pallone è attaccato solo all'overtube mentre nella DBE sono presenti due palloni uno attaccato all'overtube e uno alla punta dell'enteroscopio, ciò ovviamente si rifletterà nella modalità di esecuzione dell'esame. I pochi dati a disposizione suggeriscono che le metodiche abbiano simili risultati (89). Attualmente si stanno sviluppando altri sistemi che consentono al pallone di passare attraverso il canale di un colonscopio standard (94).

Enteroscopia con doppio pallone (DBE)

In commercio ci sono 3 tipi di strumento per DBE. Il sistema standard comprende un endoscopio con diametro di 8.5 mm e lunghezza di 200 cm, un overtube morbido di 145 cm e diametro di 12.2 mm e una pompa per insufflazione. Dopo che l'endoscopio flessibile è stato inserito nell'overtube, un palloncino in lattice viene attaccato alla punta dell'enteroscopio. Tale palloncino può essere gonfiato e sgonfiato usando una pompa che insuffla aria nel canale dell'enteroscopio. Un ulteriore pallone è presente sulla punta dell'overtube e la pressione di entrambi i palloni è monitorata e tenuta a 5.6 kPa (89).

Il sistema DBE "interventivo" è molto simile a quello standard ma ha un diametro superiore 9.4 mm, di modo che possa contenere un canale per gli strumenti di 2.8 mm di diametro. Il terzo tipo è un DBE "short" (152 cm) e multiuso in quanto può essere utilizzato per effettuare colangiopancreatografie retrograde endoscopiche (ERCP) in pazienti con alterata anatomia o colonscopie incomplete con la metodica standard (89).

La DBE può essere eseguita sia dalla bocca (anterograda) che dall'ano (retrograda). La modalità di accesso quando possibile è determinata dalla stimata localizzazione della lesione, uno studio a questo proposito ha determinato come fosse utile eseguire un approccio anterogrado quando la lesione era vista dall'esame con VCE fino al 60% del tempo totale del filmato, mentre la retrograda se era visualizzata nel restante 40% del tempo (95). Nell'avanzamento anterogrado, l'enteroscopio avanza mediante l'effettuazione di numerosi cicli di insufflazione e desufflazione dei palloni. Durante un ciclo l'enteroscopio è fatto avanzare finché non incontra resistenza o tende a tornare indietro. A questo punto il pallone sulla punta dell'enteroscopio viene gonfiato in modo tale che si ancori al lume intestinale. Una volta che il lume è stato ancorato, l'altro pallone sulla punta dell'overtube viene sgonfiato (dopo essere stato gonfiato il ciclo precedente) e fatto avanzare finché non raggiunge il pallone (gonfio) alla punta dell'enteroscopio. A questo punto il pallone sulla punta dell'overtube viene gonfiato e con entrambi i palloni gonfiati sia l'enteroscopio che l'overtube vengono tirati indietro dolcemente per rimuovere i loops creati e per far scorrere l'intestino sull'overtube. Ora il pallone sull'enteroscopio può essere sgonfiato e il ciclo può ricominciare fino al completamento dell'esame. La procedura per tirare fuori lo strumento è esattamente analoga ma effettuata in maniere inversa (89). Anche la procedura retrograda è assolutamente la stessa descritta e i cicli vengono anche effettuati nel colon per evitare che si creino dei "looping" anche a questo livello. (89).

La percentuale di complicanze durante tale esame varia fra 1.2 e 1.6% (96, 97) fra queste vi sono pancreatite, perforazione, sanguinamento, e polmonite ab ingestis.

Enteroscopia con pallone singolo (SBE)

La SBE utilizza un enteroscopio ad alta risoluzione della lunghezza di 200 cm e un diametro di 9.2 mm con un canale per gli strumenti operativi di 2.8 mm. L'overtube ha una lunghezza di 140 cm ed un diametro di 13.2 mm ed alla sua punta è equipaggiato con un pallone in silicone che può essere gonfiato e sgonfiato con una pressione fra i -6.0 ed i +5.4 kPA (89). La tecnica dell'esame è simile a quella utilizzata per la DBE, infatti anche in questo caso si sfrutta un overtube con all'estremità un pallone che aiuta la progressione dell'enteroscopio. La differenza è che la SBE utilizza la punta pieghevole dell'enteroscopio per ancorarsi al lume (anziché il secondo pallone). Nel momento in cui è stato gonfiato il pallone la punta dell'enteroscopio può essere raddrizzata ed a questo punto lo strumento viene tirato indietro con delicatezza facendo sì che l'intestino tenue scorra sull'overtube. L'efficacia della SBE e delle DBE è simile, la resa diagnostica varia fra il 41% ed il 65% e il successo delle procedure interventive fra il 7% ed il 50% (98-104). Nonostante ciò l'esplorazione completa del tenue avviene meno frequentemente che nella DBE (103, 104). La maggior parte dei dati sulle complicanze deriva da studi sulla DBE anche se in letteratura sono riportati casi sulla SBE come dolore addominale, febbre, perforazione e sanguinamento (105).

Enteroscopia spirale

Questa tecnica è una alternativa all'enteroscopia con pallone per la valutazione anterograda del tenue. Lo strumento è stato sviluppato con l'intenzione di fornire uno strumento più semplice e veloce per eseguire un'enteroscopia "deep" (89). Lo strumento è caratterizzato dalla presenza di un overtube con un'estremità a spirale simile ad una vite e può essere posizionato anche sugli altri tipi di enteroscopio. Infatti l'overtube misura 118 cm ed è compatibile con enteroscopi di lunghezza di 200 cm e diametro

fra i 9.1 ed i 9.5 mm (ovvero quelli utilizzati per l'enteroscopia con pallone). Le spirali sull'overtube possono avere un'altezza di 4.5 mm o di 5.5 mm. L'overtube è abbinato ad un device che lo fissa all'enteroscopio permettendo al tempo stesso una rotazione sul suo asse dell'overtube. Ruotando in senso orario l'overtube, l'intestino si piega "a fisarmonica" sull'overtube stesso permettendo all'enteroscopio di avanzare. Dal momento che questa tecnica è l'ultima ad essere stata introdotta iniziali dati di letteratura segnalano una riduzione dei tempi per l'esecuzione dell'indagine a parità di profondità raggiunta, rispetto alla tecnica con pallone (106-110). Nonostante ciò alcuni lavori suggeriscono nonostante una maggiore velocità un minor raggiungimento di una completa esplorazione. Questo non sorprende, in quanto tale metodica può essere effettuata solo per via anterograda, invece quella con pallone può essere eseguita anche per via retrograda aumentando le possibilità di esplorare tutto il tenue. A questo proposito uno studio ha mostrato come la percentuale di completa esplorazione fosse più basso per la spirale rispetto alla tecnica con doppio pallone (8% vs. 92%) (111). Una bassa percentuale di complicanze è stata riportata in una casistica di 1750 pazienti (112), in particolare le complicanze gravi erano solo lo 0.4% (7/1750) e 6 di queste erano perforazioni. Tre di queste perforazioni erano occorse quando l'esame era condotto da un medico con meno di 10 indagini di esperienza (112).

Enteroscopia intraoperatoria

Questa metodica consiste nell'inserire un endoscopio attraverso il lume di un'ansa che ha subito una resezione oppure oralmente o dal retto durante una laparotomia con tale metodica il chirurgo è in grado di esplorare la totalità del tenue in più del 90% dei casi (113, 114). Le complicanze di questa tecnica

possono essere perforazione, avulsione della vena mesenterica superiore ed ileo paralitico prolungato (114).

Atre metodiche diagnostiche

Oncomarkers

Il ruolo dei marcatori tumorali nella valutazione di una sospetta neoplasia del tenue non è stato a tutt'oggi chiarito. La maggior parte degli SBA sono positivi all'antigene carcino-embrionale (CEA) in immunoistochimica (115, 116) ed il CEA a livello sierico è stato riscontrato elevato nel 44% dei pazienti con SBA metastatico o localmente avanzato (117). Nonostante ciò non è assolutamente chiaro il ruolo del CEA e degli altri marker sierici nella diagnosi dello SBA, sebbene casi con elevazione del CEA, CA 19-9 o CA 125 siano stati descritti. Tuttavia una determinazione come baseline alla diagnosi di malattia di CEA e CA-19.9 è raccomandata, specialmente nei casi di malattia avanzata, in quanto i livelli di tali markers sono di valore prognostico (118).

Laparotomia esplorativa

In passato, nonostante una accurata anamnesi, esame obiettivo e un work-up diagnostico completo, una corretta diagnosi di neoplasia intestinale era stabilita prima dell'intervento in solo il 60% dei casi e la restante parte era effettuata con la laparotomia (119). Oggi grazie allo sviluppo di nuove tecniche di imaging ed endoscopiche la necessità di ricorrere alla laparotomia diagnostica si è molto ridotta. Nonostante ciò la laparotomia esplorativa rimane la tecnica diagnostica con più alta sensibilità nella valutazione di un paziente con sospetta neoplasia del tenue.

Istologia

Come già sottolineato in precedenza gli SBA sono simili ai CRA sia per la sequenza adenoma-carcinoma sia per le simili caratteristiche anatomopatologiche con piccole differenze nella frequenza del sottotipo istologico e dei markers immunoistochimici. Molti SBA sono lesioni sessili solitarie spesso associati alla presenza di adenomi. Solitamente sono moderatamente ben differenziati e quasi sempre positivi per all'Alcian blu (mucine acide). Come detto in precedenza gli SBA possono essere positivi per CEA, CA 19.9 e p53 ed anche l'espressione di c-erbB-2, Ki-67 e tenascina (120). Inoltre gli SBA con localizzazione ileale possono mostrare positività ai markers immunoistochimici di tipo neuroendocrino (121). Distinguere uno SBA da un altro adenocarcinoma intestinale soprattutto nei casi di lesioni avanzate può essere difficile. Rispetto ai CRA che sono praticamente sempre positivi per la citocheratina (CK) 20 e negativi per la CK 7, gli SBA sono meno spesso CK 20 positivi (47% vs. 67%) e molto più frequentemente CK7 positivi (100% vs. 34%) (122, 123).

Prognosi

Il più comune sistema di stadiazione per gli SBA è il “tumor node metastasis” (TNM) redatto dalla American Joint Committee (AJCC) on Cancer e dalla International Union Against Cancer (UICC) (124) (Tabella 3).

L'SBA ha una scarsa prognosi a tutti gli stadi, con una sopravvivenza media a 5 anni che varia dal 14% al 33% (13, 14, 17, 18, 20). Ovviamente la sopravvivenza media a 5 anni è correlata allo stadio del tumore (Tabella 3): 50-69% per lo stadio I (incidenza 4%-12%), 39%-55% per lo stadio II (incidenza 14%-30%), 10%-40% per lo stadio III (incidenza 19%-27%) e

3%-5% per lo stadio IV (incidenza 32%-46%) (18-20, 64). Alla luce di tali dati la prognosi del SBA sembra essere intermedia fra il CRA e l'adenocarcinoma dello stomaco, e la resezione completa radicale (R0) rimane l'unico potenziale trattamento curativo (64). La frequenza del SBA localmente avanzato non resecabile sembrerebbe avere una frequenza pari al 5% (63). L'infiltrazione linfonodale è il principale fattore prognostico per l'SBA (18, 64), in particolare il rapporto fra numero di linfonodi analizzati e quelli positivi per metastasi. Uno studio ha mostrato come i pazienti a parità di stadio (stadio III) abbiano una peggiore sopravvivenza a 5 anni liberi da malattia se i linfonodi infiltrati erano ≥ 3 , rispetto a quelli con 1 o 2 linfonodi positivi (37% vs. 57%) (125). Uno studio effettuando un'analisi multivariata ha riconosciuto fra i fattori che predicano una cattiva prognosi l'età avanzata, la localizzazione ileale ed il numero di linfonodi positivi (126). Mentre altri studi indicano che la localizzazione duodenale abbia una peggiore prognosi rispetto a quelli digiunali ed ileali (18, 19, 125). Uno studio ha riportato come vi sia la possibilità di sviluppo di un secondo tumore dopo una resezione curativa in 12 su 74 casi analizzati e solo 5/12 erano imputabili ad una Sindrome di Lynch. Questa elevata frequenza di sviluppo di un secondo cancro giustifica uno stretto e lungo follow-up dopo il trattamento anche radicale di in SBA (127). Nei casi di SBA metastatico o localmente avanzato trattati con chemioterapia, uno studio retrospettivo ha riscontrato che sono fattori prognostici negativi anche un basso punteggio allo score di performance di Zubrod (WHO) e valori di CEA o CA 19.9 sopra la norma (118).

Terapia

La resezione radicale (R0) della lesione primitiva con linfadenectomia locoregionale è mandatoria. Nel contesto di lesioni localmente avanzate non resecabili deve essere tentata una chemioterapia neoadiuvante con eventuale resezione a 2-3 mesi di distanza. Qualora vi fosse la presenza di metastasi non resecabili, l'asportazione del tumore primitivo non è raccomandata se non in caso di urgenza quale subocclusione, perforazione o emorragia. Qualora invece dopo un'attenta valutazione multidisciplinare si decidesse che è possibile effettuare una resezione delle metastasi questa potrà avvenire in un solo o due interventi consecutivi, possibilmente eseguendo una chemioterapia nell'intervallo fra i due.

Per i casi localizzati nella seconda porzione duodenale o per i casi di tumore localmente avanzato sia nella prima porzione che nella terza, l'intervento consisterà in una duodenocefalopancreasectomia secondo Whipple con una linfadenectomia dei linfonodi peri-duodenali, peri-pancreatici ed epatici e resezione della parte destra dell'arteria celiaca e della mesenterica superiore (18). Nei casi di localizzazione prossimale o distale senza infiltrazione degli organi adiacenti può essere considerata solo una resezione duodenale (128), ma tale procedura è spesso associata ad una scarsa prognosi (129).

Per i casi a localizzazione digiunale o ileale, la tecnica chirurgica consiste in una resezione radicale con linfadenectomia ed anastomosi digiuno-digiunale o ileo-ileale (18). Qualora siano coinvolti l'ultima ansa ileale o la valvola ileo-ciecale verrà eseguita una emicolectomia destra con legatura dell'arteria ileocolica e linfadenectomia locoregionale (18). Ad oggi non sono stati definiti protocolli di terapia adiuvante post-chirurgica per la mancanza di trials randomizzati. L'impossibilità di verificare i vari fattori prognostici che hanno fatto decidere per l'esecuzione di una terapia adiuvante è stato un fattore limitante gli studi retrospettivi, perché proprio sulla base di quei fattori i pazienti che ad oggi ricevono la terapia adiuvante tendono ad essere

quelli a maggior rischio di ricaduta di malattia, e ciò creerebbe un importante bias (6). Secondo l'US Cancer database circa l'11% dei pazienti con SBA è stato trattato con radioterapia da sola o in combinazione con la chemioterapia e la maggior parte dei casi aveva una localizzazione duodenale (19). Questa strategia è stata adottata in una considerevole percentuale di casi nonostante vi sia uno studio retrospettivo su 48 casi di SBA a localizzazione duodenale in cui la chemio-radioterapia non ha mostrato vantaggi in termini di sopravvivenza (129). I dati attualmente disponibili non raccomandano l'esecuzione di una radioterapia nelle resezioni non radicali (R1, R2) o nei casi di SBA duodenale localmente avanzato. Diversi studi retrospettivi non hanno riscontrato benefici in una chemioterapia adiuvante dopo resezioni potenzialmente curative (18, 130-132). Va comunque detto che questi risultati negativi possano essere dovuti al modesto numero di pazienti trattati, a bias di selezione o ad un inadeguato regime chemioterapico. In uno studio retrospettivo monocentrico su 54 pazienti trattati con una resezione R0 eseguita fra il 1990 ed il 2008, 30 pazienti (56%) hanno eseguito una terapia adiuvante. Nell'analisi multivariata la terapia adiuvante era associata ad un miglioramento della sopravvivenza libera da malattia ma non della overall survival. Nei pazienti con un elevato rischio di recidiva (definito sulla base del rapporto linfonodi metastatici e liberi da malattia $\geq 10\%$) la terapia adiuvante sembra migliorare la sopravvivenza ma non la sopravvivenza libera da malattia (133). Nonostante la mancanza di evidenze che supportino la terapia adiuvante per l'SBA, un'analisi del National Cancer Database negli Stati Uniti ha mostrato un aumento nell'utilizzo della chemioterapia dall'8% nel 1985 al 24% nel 2005 (13). La riportata efficacia della fluoropirimidina e dell'oxaliplatino nel SBA avanzato (118, 134) e l'efficacia dello stesso regime nella terapia adiuvante del CRA ha portato alcune nazioni fra cui la Francia a raccomandarla dopo una resezione

curativa R0 di neoplasie in stadio III (6). Per gli SBA in stadio II la chemioterapia adiuvante è opzionale per i casi pT4. Nonostante ciò data l'evidenza cumulativa di una scarsa prognosi per gli SBA scarsamente differenziati con un numero di linfonodi asportati < 10, la terapia adiuvante dovrebbe essere comunque considerata in questi casi (6).

Attualmente sono stati pubblicati pochi studi sul tipo di chemioterapia da usare nei casi di SBA avanzati metastatici. La maggior parte degli studi disponibili hanno piccole popolazioni, sono retrospettivi o valutano regimi chemioterapici ormai desueti. Tirando le somme questi studi riportano una overall survival fra gli 8 e i 18 mesi e un tasso di effettiva risposta (ORR) fra il 5% ed il 37% (135-140). Diversi studi retrospettivi indicano che la chemioterapia sembra prolungare l'overall survival nei pazienti con SBA avanzato (18, 136, 137), ma non c'è consenso su un regime terapeutico comune per la mancanza di trial randomizzati. Uno studio retrospettivo ha riscontrato che la prescrizione di una chemioterapia aveva un risultato statisticamente significativo nel prolungare la sopravvivenza dei pazienti con SBA stadio IV non operabili rispetto non effettuarla (12 mesi vs. 2 mesi, $P=0.02$) (18). Analogo risultato in un altro studio retrospettivo effettuato sul registro della British Columbia; su 37 pazienti, 16 trattati con chemioterapia avevano una sopravvivenza media di 15.6 mesi mentre i 21 pazienti che non ricevevano trattamento avevano una overall survival di 7.7 mesi (136). Purtroppo solo pochissimi studi cercano di confrontare gli effetti di uno specifico regime chemioterapico rispetto agli altri protocolli. Uno studio retrospettivo su 44 pazienti ha segnalato che la chemioterapia con gemcitabina ed irinotecan dava miglior risultati rispetto alla terapia con solo il 5-fluorouracile (5FU) (137). Un ulteriore analogo studio su 80 pazienti con SBA metastatico suggeriva che la terapia con platino desse più risultati in termini di "objective response rate" (46% vs. 16%, $P = 0.01$) e di

“progression free survival” (8.7 vs. 3.9 mesi, $P \leq 0.01$) rispetto agli altri regimi. Nonostante questo la overall survival non mostrava differenze statisticamente significative (14.8 vs. 12.0 mesi, $P = 0.10$) (141). Inoltre lo studio non riportava i rapporti rischio-beneficio dei differenti Sali di platino utilizzati (cisplatino, oxaliplatino, ecc.) sebbene l’efficacia clinica e i meccanismi antitumorali di questa categoria di farmaci sia molto differente seconda del principio attivo (142). Per tentare di fare più chiarezza sono stati intrapresi studi prospettici randomizzati. Uno di questi studi ha pubblicato i risultati di fase II di un regime chemioterapico con capecitabina ed oxaliplatino nei pazienti con SBA e adenocarcinoma della papilla di Vater. I risultati sono di estremo interesse in quanto l’objective response rate risultava essere del 50%, con un tempo medio di progressione pari a 11.3 mesi e un overall survival di 20.4 mesi (134).

Un ulteriore studio retrospettivo ha analizzato gli effetti su 93 pazienti consecutivi dei seguenti regimi chemioterapici: acido folico (leucovorina) + 5FU (LV5FU2) (10 pazienti), acido folico + 5FU + oxaliplatino (FOLFOX) (48 pazienti), acido folico + 5FU + irinotecan (FOLFIRI) (19 pazienti) e LV5FU2 + cisplatino (16 pazienti). La sopravvivenza libera da progressione di malattia (progression free survival) risultava 7.7 mesi per il LV5FU2, 6.9 mesi per il FOLFOX, 6.0 mesi per il FOLFIRI e 4.8 mesi per il LV5FU2 + cisplatino, mentre la overall survival media era rispettivamente di 13.5 mesi, 17.8 mesi, 10.6 mesi e 9.3 mesi. Effettuando però una analisi multivariata le uniche variabili significative associate ad una scarsa overall survival erano il performance status WHO ($P < 0.0001$), un elevato CEA sierico ($P = 0.02$) ed un elevato CA 19.9 sierico ($P = 0.03$). Nel sottogruppo di pazienti trattati con chemioterapia a base di platino (FOLFOX e LV5FU2 + cisplatino), l’analisi multivariata ha mostrato che LV5FU2 + cisplatino era associato ad una peggior sopravvivenza libera da progressione ($P < 0.0001$) e

peggior overall survival ($P = 0.002$) rispetto al FOLFOX (118). E' stata inoltre studiata su 28 pazienti già trattati con sali di platino in prima linea, l'efficacia del FOLFIRI come chemioterapia di seconda linea. L'objective responsive rate era del 20%, il disease control rate del 52%, la sopravvivenza libera da progressione era mediamente di 3.2 mesi e l'overall survival di 10.5 mesi. Tali risultati sembrano indicare che la chemioterapia di seconda linea con FOLFIRI abbia una modesta efficacia nei pazienti con SBA avanzato che hanno già effettuato una terapia a base di sali di platino (143). Alla luce di tali dati disponibili la chemioterapia con oxaliplatino (FOLFOX) sembra essere la scelta migliore in prima linea. In conclusione l'SBA avanzato con metastasi ha una prognosi che supera i 12 mesi, sicuramente peggiore rispetto al CRA, ma migliore rispetto al adenocarcinoma gastrico e pancreatico.

La Malattia Celiaca

La malattia celiaca (MC), definita in passato anche “sprue celiaca” o “enteropatia da glutine”, è una malattia immunomediata caratterizzata da un peculiare profilo genetico ed anticorpale, associato alla presenza di specifiche lesioni a livello della mucosa intestinale (144). Tale disordine si manifesta unicamente in alcuni soggetti geneticamente predisposti a seguito dell’ingestione del glutine, una proteina alcool-solubile presente in alcuni cereali quali grano, segale, orzo, farro e kamut (144). Negli ultimi decenni gli straordinari risultati ottenuti della ricerca sulla MC hanno portato a profondi cambiamenti sia nel protocollo diagnostico-terapeutico sia nella storia naturale di questa malattia (56). La MC è andata incontro ad una vera e propria “metamorfosi”, imponendosi all’attenzione del mondo scientifico e mediatico per il costante incremento delle diagnosi, effettuate sempre più frequentemente anche in età adulta o addirittura geriatrica (56). Alcuni autori ipotizzano che una quota parte dell’aumento delle diagnosi sia legata alla maggiore disponibilità di test di screening altamente sensibili e specifici e l’altra parte ad un reale aumento dei casi di MC (56). Attualmente le cause che hanno portato negli ultimi decenni a questo esponenziale aumento di casi di patologie legate al glutine sono ancora oggetto di studio e dibattito. Alcune teorie ritengono che una causa possa essere la globalizzazione associata alla diffusione ubiquitaria di una dieta mediterranea “spuria” ed “estremizzata” con un consumo di elevatissime quantità di glutine (fino a 20 g /die) (145, 146). L’aumento della quantità di glutine ingerito, unitamente all’introduzione di nuove varianti di grano modificate geneticamente più per motivi tecnologici che nutrizionali, sembra possa aver contribuito all’aumento del numero di diagnosi in tutto il mondo (146, 147). Il glutine e

le sue frazioni costituite da prolamine e glutenine ad alto peso molecolare svolgono un'azione "tossica" in termini di attivazione del sistema immunitario nei confronti della mucosa dell'intestino tenue (147). Un ruolo di primo piano in tale danno è certamente svolto dalle gliadine, proteine costituite da singole catene polipeptidiche, di peso molecolare compreso fra 30 e 90 kilodalton. Le gliadine, suddivise a loro volta in quattro frazioni di diverso peso molecolare (ω , γ , β ed α ottenibili mediante elettroforesi su gel), sono dotate secondo questo ordine di tossicità crescente per le peculiari sequenze amminoacidiche in grado di essere riconosciute dal nostro sistema immunitario (147). L'isolamento dei cloni di DNA complementare per la gliadina ha inoltre permesso di sequenziare e determinare i 266 aminoacidi costituenti l'A-gliadina, una sottofrazione tossica dell' α -gliadina (148) ed in particolare la α -9 gliadina costituita dalla sequenza di 25 aminoacidi che ha la capacità di attivare e far proliferare i monociti circolanti con relativa produzione di interleuchina 15 (IL-15) con conseguente innesco di una risposta di tipo Th1 (149).

La suscettibilità genetica all'enteropatia da glutine è confermata dalla elevata familiarità della malattia, presente in percentuale variabile dal 4 al 10% nei familiari di primo grado di celiaci, e dalla stretta associazione con gli antigeni del sistema di istocompatibilità (HLA), presenti nel braccio corto del cromosoma 6 (150). Oltre il 90% dei pazienti con celiachia sono HLA-DQ2 positivi o presentano positività per metà eterodimero del DQ2 (DQA1*0501, DQB1*0201), mentre quasi tutti i celiaci DQ2 negativi (circa il 10%) sono HLA-DQ8 positivi. Il test genetico non può peraltro essere considerato un test diagnostico di celiachia, dal momento che anche il 20-30% della popolazione generale sana è DQ2-DQ8 positiva (151); è invece possibile sfruttare il suo elevato valore predittivo negativo per escludere la

diagnosi (56). Recentemente mediante i cosiddetti “Genome Wide Association Studies” (GWAS) sono stati inoltre identificati a tutt’oggi circa 57 geni non-HLA che potrebbero predisporre allo sviluppo della MC e che giustificano l’esistenza di rarissimi casi di MC in soggetti non portatori di HLA DQ2 o DQ8 (circa lo 0,4% dei pazienti celiaci) (152, 153).

Anche se il principale organo-bersaglio è l’intestino tenue, la celiachia può assumere le caratteristiche di una malattia sistemica. Infatti la transglutaminasi (TG), il principale autoantigene verso cui è diretta la risposta immunitaria, è presente non solo nell’intestino tenue, ma anche in numerosi altri organi e apparati, quali cute, tiroide, pancreas, fegato, articolazioni, sistema nervoso e sistema riproduttivo. Ciò fa sì che il processo immunologico, una volta innescato, possa propagarsi al di fuori dell’intestino determinando un coinvolgimento multisistemico (154). L’evidenza di questa affermazione deriva non solo dalle molteplici manifestazioni extraintestinali della celiachia, ma anche da una grande varietà di disordini autoimmuni frequentemente associati ad essa, in particolare la tiroidite di Hashimoto, il diabete mellito di tipo 1 (DM1), la sindrome di Sjögren e la cirrosi biliare primitiva (56). L’estrema variabilità sintomatologica di presentazione ha reso necessaria la riorganizzazione clinica della celiachia in diversi sottotipi. Nel 2013 un gruppo di esperti a livello internazionale ha redatto la cosiddetta “Classificazione di Oslo” che ha suggerito di suddividere clinicamente la malattia celiaca in: 1) sintomatica a presentazione classica (i.e. segni e sintomi di malassorbimento), 2) sintomatica a presentazione non-classica (i.e. sintomi extraintestinali o intestinali in assenza di sintomatologia classica), 3) asintomatica o subclinica ovvero una condizione nella quale la malattia è senza segni o sintomi sufficienti a indurre il sospetto di celiachia e quindi a innescare il processo di diagnosi mediante screening anticorpale (155).

Epidemiologia

L'epidemiologia della MC è stata completamente ridisegnata negli ultimi decenni. Grazie all'identificazione di nuovi marcatori sierologici (antiendomio -EmA-, anti transglutaminasi -TGA- ed anti peptidi deamidati di gliadina -DGP-) sono stati effettuati studi di screening su campioni di popolazione generale, ed oggi siamo in grado di affermare che la celiachia è una patologia molto frequente, con una prevalenza di un caso ogni 100 individui e con una distribuzione ubiquitaria nel mondo (156-163). A livello mondiale sono presenti alcune nicchie etniche in cui la MC è addirittura più frequente, questo è il caso della popolazione Saharawi (5%), della Finlandia (2,5%) e della Sardegna (2%) (163-165). Peraltro, anche in quelle aree dell'estremo oriente in cui fino a qualche tempo fa la MC non era diagnosticata, a seguito del cambiamento delle abitudini alimentari legate alla globalizzazione, la celiachia ha incominciato a fare la sua comparsa. In Cina e Giappone uno studio ha mostrato una prevalenza di circa il 2% con la metodica del case-finding (166). Nonostante il notevole incremento diagnostico registrato negli ultimi tempi, la celiachia è ancora ampiamente sottodiagnosticata, attualmente infatti in Italia vi sono al momento circa 165.000 pazienti diagnosticati a fronte dei circa 600.000 attesi.

Patogenesi

Il trigger scatenante la malattia celiaca è il glutine, anche se da solo non è in grado di innescare la malattia senza la già menzionata predisposizione genetica (167). Alcuni fattori ambientali possono svolgere un ruolo importante nello scatenamento della celiachia, a cominciare dalle infezioni

virali, batteriche e parassitarie (168, 169). Spesso una sindrome celiaca si manifesta ad esempio solo dopo che il paziente ha contratto una infezione intestinale batterica o parassitaria a seguito di un viaggio all'estero. Ma la malattia celiaca può esplodere in tutte le sue più classiche manifestazioni a seguito di uno stress particolarmente intenso od anche dopo una gravidanza trascorsa in modo del tutto regolare e con un parto eutocico. Negli ultimi anni ulteriori fattori ambientali sono entrati tirati in ballo come possibili cofattori dello sviluppo della malattia celiaca. Fra questi ricordiamo il mancato allattamento al seno, l'età di introduzione del glutine, la quantità di glutine da introdurre allo svezzamento, il tipo di parto (cesareo o naturale), il microbiota intestinale e l'uso di antibiotici nella primissima infanzia. Sono stati condotti numerosi trial ed attualmente ne sono in corso altri per cercare di determinare quali fra questi fattori abbiano realmente un ruolo nell'aumentare il rischio di malattia, con risultati a volte contrastanti (170-177).

Ma quali sono i meccanismi attraverso i quali si instaura il danno della mucosa intestinale? La svolta per comprendere i meccanismi fisiopatologici della celiachia si è avuta nel 1997 grazie ad un importantissimo studio italo-tedesco che ha consentito di identificare nella transglutaminasi tissutale (tTG), un enzima citoplasmatico ubiquitario dell'organismo umano, il principale autoantigene che ricopre un ruolo di primo piano nella risposta immunologica di tipo adattativo (178). Come già accennato la tTG è presente non solo nell'intestino tenue, ma anche in numerosi altri organi ed apparati, quali cute, tiroide, pancreas, fegato, articolazioni, sistema nervoso e sistema riproduttivo (154). Ciò fa sì che il processo immunologico, una volta innescato, possa propagarsi al di fuori dell'intestino tenue, facendo assumere alla celiachia le sembianze di una malattia sistemica. Due infatti sono i meccanismi immunologici attraverso i quali si realizza il danno intestinale

tipico della celiachia: la risposta innata o nativa (tTG-indipendente) e la risposta adattativa (tTG-dipendente) (179, 180). La risposta innata si basa su una tossicità diretta della gliadina, ed in particolare del peptide 31-43, in grado di stimolare la sintesi di IL-15 (una citochina che svolge un ruolo centrale nell'attivazione T cellulare), di indurre l'espressione di molecole di stress sugli enterociti e di attivare i linfociti intraepiteliali nella mucosa intestinale. L'insieme di queste reazioni porta alla morte diretta dell'enterocita ed è considerato uno dei meccanismi determinanti l'atrofia dei villi. L'azione diretta del peptide di gliadina sugli enterociti può anche aumentare la permeabilità intestinale attraverso il rilascio della zonulina con conseguente disassemblamento delle *tight junctions* (giunzioni serrate) (181). L'altra via responsabile del danno di mucosa è quella dell'immunità adattativa che attraverso l'azione del peptide 33-mer porta all'attivazione T-linfocitaria mediata dalla tTG. Il peptide, resistente alla degradazione da parte dei succhi gastrici e pancreatici, e delle proteasi del brush border, dopo aver superato la barriera intestinale per via paracellulare grazie al disassemblamento delle giunzioni serrate, favorito dall'*over-expression* di zonulina, subisce il processo di deamidazione da parte della tTG (con trasformazione di una molecola di glutamina in acido glutammico) e viene presentato dai macrofagi DQ2+/DQ8+ ai linfociti T CD4+ con conseguente sintesi di citochine in grado di portare avanti il danno intestinale. Parallelamente si ha la stimolazione dei linfociti B con conseguente sintesi anticorpale. Le principali citochine coinvolte nel determinismo della lesione intestinale sono l'IL-15 che svolge un ruolo chiave nel generare il danno epiteliale e nel guidare la proliferazione delle cripte, nonché nel modulare l'infiltrazione linfocitaria intraepiteliale, ma anche il TNF-alfa, IFN-gamma e IL-2 hanno un effetto citotossico diretto sulle cellule epiteliali, inoltre IL-6 differenzia i B linfociti così favorendo la sintesi anticorpale. Una citochina

che ha invece un ruolo regolatorio per la mucosa intestinale è l'IL-10 che attraverso la stimolazione dei linfociti T regolatori (T-reg) controlla la risposta immune verso il microbiota intestinale e verso gli i numerosissimi antigeni dietetici (179).

La presentazione clinica

La celiachia colpisce più frequentemente il sesso femminile con un rapporto femmine/maschi di 2:1 (144). Come già sottolineato, può esordire a qualsiasi età della vita, dalla prima infanzia all'età geriatrica, con due picchi di insorgenza: poco dopo lo svezzamento con glutine entro i primi 2 anni di età e verso la seconda-terza decade di vita. La presentazione clinica della malattia celiaca può essere ingannevole, dal momento che i sintomi variano tremendamente da paziente a paziente e ciò fa sì che la diagnosi rappresenti spesso una vera e propria sfida per i medici. La sintomatologia con cui la malattia celiaca può presentarsi è così variabile che tale condizione morbosa è stata paragonata per queste sue caratteristiche sia ad un camaleonte sia ad un grande imitatore (182, 183). In base alla presentazione clinica vengono distinte varie forme di celiachia (155). Nella *forma classica* è presente la tipica sindrome da malassorbimento con diarrea, perdita di peso e marcata astenia. Sebbene questo esordio sia sempre meno frequente ai nostri giorni (presente in meno del 30% dei casi) grazie ad una diagnosi sempre più precoce, alcuni pazienti possono ancora giungere alla nostra osservazione con una cachessia, atrofia muscolare, severa ipoalbuminemia, turbe elettrolitiche e metaboliche. Nella *forma non classica* le manifestazioni gastrointestinali, se presenti, si caratterizzano per una stipsi, presente in un terzo circa dei celiaci all'esordio, o per un alvo alterno (compatibile con una condizione di sindrome dell'intestino irritabile) o per turbe dispeptiche con

nausea e talvolta vomito. Spesso possono essere presenti manifestazioni extraintestinali, come l'anemia microcitica sideropenica per mancato assorbimento di ferro e per lo stato infiammatorio cronico (riscontrabile fino al 40% dei casi) o più raramente una anemia macrocitica per carenza di acido folico e di vitamina B12, alterazioni del metabolismo osseo (presenti in circa il 70% dei pazienti alla diagnosi) sotto forma di osteopenia o di osteoporosi per malassorbimento di calcio e vitamina D (56). Accanto a queste manifestazioni si riscontrano anche iposomia (particolarmente importante nelle forme pediatriche), alterazioni dello smalto dentale, stomatite aftosa (presente nel 25% dei celiaci a dieta libera), ipertransaminasemia (riscontrata nel 40-50% dei celiaci non trattati ed espressione della cosiddetta epatite celiaca legata in gran parte all'arrivo di antigeni alimentari e batterici al fegato per l'alterato assorbimento intestinale). E' presente inoltre una vasta gamma di sintomi di pertinenza neurologica quali cefalea, parestesie, nevralgie, ansia e depressione. Nel quadro clinico di presentazione possono essere incluse anche le alterazioni della sfera riproduttiva, caratterizzate da menarca tardivo, amenorrea, aborti ricorrenti, parti prematuri, menopausa precoce, alterazioni del numero e della motilità degli spermatozoi (tutte alterazioni reversibili con dieta aglutinata) (56, 184-186). La forma *subclinica* comprende pazienti che presentano sintomi o segni sotto la soglia di identificazione clinica e spesso identificabili solo a posteriori dopo l'inizio della dieta aglutinata (ad esempio una astenia cronica). Esempio classico di questa forma sono i casi identificati in seguito a screening anticorpale nei familiari di celiaci e nell'ambito degli screening su popolazione generale (56, 155).

La malattia celiaca può associarsi a diverse patologie autoimmuni ed idiopatiche, fra cui la dermatite erpetiforme (definita anche la celiachia della cute per la presenza di un costante interessamento della mucosa intestinale),

il diabete mellito autoimmune, la tiroidite di Hashimoto, il deficit selettivo di IgA, l'alopecia areata, il morbo di Addison, le malattie del connettivo (in particolar modo la sindrome di Sjögren), le malattie cromosomiche (sindrome di Down, sindrome di Turner, sindrome di Williams), le malattie neurologiche (neuropatia periferica, epilessia con o senza calcificazioni occipitali, atassia cerebellare), la patologia autoimmune epatica (cirrosi biliare primitiva, epatite autoimmune, colangite sclerosante primitiva) e la cardiomiopatia dilatativa idiopatica (56, 184-190). Circa il 15% dei celiaci presenta allergie IgE-mediate verso inalanti o allergeni alimentari, ma tale dato non si discosta dalla prevalenza di manifestazioni allergiche nella popolazione generale. Peraltro, nella celiachia è stata riportata un'aumentata prevalenza di allergia alle graminacee ed agli acari della polvere (191). Controversa rimane l'associazione fra celiachia e malattie infiammatorie croniche intestinali, anche se dati recenti indicano un rischio significativo (10 volte maggiore rispetto alla popolazione di controllo) di sviluppare il morbo di Crohn e la rettocolite ulcerosa per i celiaci (192). L'importanza di diagnosticare una celiachia associata a queste patologie concomitanti è duplice, dal momento che la dieta aglutinata è in grado non solo di risolvere le manifestazioni e prevenire le complicanze della celiachia, ma anche talvolta di migliorare i sintomi della patologia associata.

Diagnosi

I due grandi pilastri su cui si basa la diagnosi di celiachia sono l'esame istologico della biopsia duodenale, che rimane il "gold standard" diagnostico, e gli anticorpi sierici, che negli anni hanno acquisito una rilevanza sempre maggiore. Nonostante i grandissimi progressi compiuti

dalla sierologia nessun test anticorpale al momento presenta una sensibilità ed una specificità del 100% per la celiachia e ciò fa sì che la biopsia intestinale rimanga a tutt'oggi indispensabile nell'adulto per un corretto inquadramento diagnostico dell'enteropatia da glutine. Nella popolazione pediatrica recentemente è stato proposto dalle linee guida Società Europea per la gastroenterologia ed epatologia pediatrica (ESPGHAN) la possibilità di astenersi dall'effettuare la biopsia intestinale in bambini con una sierologia positiva oltre 10 volte il cut-off, segni e sintomi suggestivi di celiachia e HLA predisponente (193). Tale condotta è tutt'ora oggetto di dibattito e numerosi paper pro e contro tale condotta sono stati pubblicati. Di certo nell'adulto tale condotta al momento non è accettata (194). Altri due elementi utili, anche se non indispensabili ai fini della diagnosi, sono gli esami bioumorali di routine ed i test di permeabilità intestinale, i quali possono far nascere il primo sospetto di malattia celiaca.

Esami bioumorali

L'importanza degli esami ematochimici di routine è limitata, ma proprio perchè si tratta di test di prima istanza e di facile esecuzione possono essere il primo indizio per sospettare l'esistenza di questa patologia (195). Bassi livelli sierici di emoglobina, albumina, calcio, potassio, magnesio e fosforo sono di più frequente riscontro nei celiaci con malassorbimento franco rispetto a quelli con malattia subclinica. Una iposideremia più o meno marcata con elevati valori di transferrina insatura ed ipoferritinemia può essere un'altra spia per pensare ad una possibile celiachia; alla stessa stregua possono essere considerati una bassa folatemia e valori sierici ridotti di vitamina B12. L'anemia è, in genere, da carenza di ferro, con bassi valori di sideremia e ferritinemia. Meno frequentemente l'anemia del paziente celiaco è macrocitica per malassorbimento di folati nel digiuno superiore, mentre i

livelli sierici di vitamina B₁₂ sono raramente ridotti (fatta eccezione per le forme associate a gastrite atrofica su base autoimmune con positività per anticorpi anti-fattore intrinseco ed anticorpi anti-cellule parietali gastriche). Anche se non si tratta di reperti frequenti, è possibile osservare la presenza di leucopenia e piastrinopenia, possibile espressione di presenza di anticorpi anti-leucociti ed anti-piastrine nell'ambito di patologia autoimmune associata alla celiachia (196). L'ipocolesterolemia, anche se di riscontro sempre più raro visto il calo dei quadri clinici con severo malassorbimento, può associarsi ad ipotrigliceridemia se le lesioni intestinali sono severe ed estese fino al digiuno distale (197). Nei pazienti con deficit di assorbimento di vitamina K si ritrova un rialzo dell'INR. Elevati livelli di fosfatasi alcalina (isoenzima osseo) possono essere trovati nei celiaci con osteopenia severa. Un rialzo delle transaminasi di origine sconosciuta (così classificata dopo avere escluso un'etiologia virale, autoimmune, tossica) è una possibile spia di celiachia. Significativa a tal proposito è la normalizzazione degli enzimi epatici dopo la dieta aglutinata (198). In una discreta percentuale di celiaci adulti sono presenti, nello striscio periferico, alterazioni della membrana dei globuli rossi (*pitted red cells* e *corpi di Howell-Jolly*), espressione di disfunzione o atrofia splenica (199). Un'altra possibile spia dell'iposplesismo, osservato esclusivamente nelle forme di celiachia diagnosticate in età adulta, è il riscontro di una marcata piastrinosi e di assenza della milza (o di una milza di piccole dimensioni) all'ecografia addominale. Il riscontro di una condizione di iposplesismo deve sempre far ipotizzare una diagnosi di celiachia, così come è stato ampiamente documentato che l'iposplesismo nei soggetti celiaci predispone non solo allo sviluppo di patologie infettive da batteri capsulati (Pneumococco, Meningococco) ma anche alla comparsa di patologia autoimmune e di

complicanze quali la malattia celiaca refrattaria, la digiunoileite ulcerativa ed il linfoma (200, 201).

I test sierologici

L'impiego dei test sierologici su larga scala ha consentito di incrementare in maniera significativa il numero delle diagnosi di celiachia negli ultimi anni. Il ruolo degli autoanticorpi correlati alla celiachia non è, almeno secondo la nostra scuola di pensiero, quello di sostituirsi alla biopsia intestinale, che rimane il "gold standard" diagnostico, ma piuttosto quello di identificare i soggetti con sospetta celiachia da confermare con l'indagine istologica (194). I marker sierici correlati alla celiachia comprendono un ampio spettro di autoanticorpi, alcuni dei quali rappresentano oramai il passato della diagnostica sierologica e con poche indicazioni sul piano pratico fra questi troviamo gli anticorpi antireticolina R1 (R1-ARA) e gli anticorpi antigliadina (AGA). Attualmente la diagnosi sierologica di MC si basa su test altamente predittivi ed ampiamente validati fra cui gli anticorpi antiendomio (EmA), gli anticorpi antitransglutaminasi tissutale (anti-tTG) e gli anticorpi anti gliadina deamidata (DGP).

Gli anticorpi correlati alla celiachia appartengono sia alla classe IgA sia IgG, ma solamente gli anticorpi di classe IgA possono essere generalmente considerati marker altamente sensibili e specifici per la MC. L'impiego dei marker di classe IgG (eccetto per i DGP) è spesso fuorviante a causa dell'elevata percentuale di falsi positivi ed il loro uso dovrebbe essere limitato ai pazienti con deficit di IgA, condizione strettamente associata alla celiachia, nell'ambito della quale il riscontro di marcatori anticorpali di classe IgG è altamente suggestivo per malattia celiaca.

Negli ultimi anni gli R1-ARA e gli AGA hanno perso gran parte del loro valore diagnostico, ma possono ancora essere utili in alcune circostanze ed in alcuni sottogruppi di pazienti. Gli R₁-ARA di classe IgA vengono ricercati

in IFL indiretta utilizzando come substrato sezioni di fegato, stomaco e rene di ratto; questi anticorpi pur mostrando una specificità del 100% per la celiachia, sono positivi in circa 50% dei pazienti celiaci non trattati (202). Ciò nonostante, proprio in virtù della loro assoluta specificità, il loro riscontro casuale durante la ricerca degli autoanticorpi non organo specifici (NOS)(test di primo livello per le patologie autoimmuni) consente di identificare casi inaspettati di celiachia .Gli AGA di classe IgA ricercati con tecnica ELISA mostrano una sensibilità del 73% ed una specificità intorno all'80% (203). Falsi positivi vengono infatti ritrovati in pazienti con altre malattie gastrointestinali ed in soggetti normali. La loro importanza per la diagnostica della celiachia è marcatamente diminuita dopo l'introduzione nell'uso di routine di EmA ed anti-tTG. Gli EmA IgA vengono ricercati in IFL indiretta su terzo inferiore di esofago di primate o su substrati di cordone ombelicale umano (204. 205). Questi anticorpi sono il test anticorpale con la più elevata accuratezza diagnostica per la celiachia. La loro sensibilità per la celiachia varia a seconda dei vari lavori pubblicati in letteratura sull'argomento dal 94% al 100% con una specificità quasi sempre assoluta (100%). Rarissimi falsi positivi sono stati descritti in parenti di primo grado di celiaci ed in pazienti con diabete mellito autoimmune. La maggior parte dei ricercatori è concorde nel ritenere che sia più corretto classificare come celiaci potenziali che falsi positivi i rari casi EmA positivi con mucosa intestinale normale (incluso anche il numero dei linfociti intraepiteliali). Il pattern degli EmA, caratterizzato dalla colorazione delle fibre endomisiali che circondano le fibre muscolari lisce sull'esofago di scimmia o sul cordone ombelicale, può essere mascherato dalla concomitante positività per anticorpi anti muscolo liscio (SMA), richiedendo per la sua identificazione la ripetizione del test ad una più alta diluizione sierica. Limiti diagnostici degli EmA sono l'elevato numero di falsi negativi nei bambini al di sotto dei

2 anni di età e la elevata variabilità inter-observer dovuta all'interpretazione del test con una bassa riproducibilità ed errori di lettura dell'esame in molti laboratori. Gli EmA sono generalmente considerati il "gold standard" sierologico della celiachia nei laboratori di riferimento con una riproducibilità perfino più elevata rispetto agli anti-tTG (206), mentre risultati deludenti per questo test vengono in genere dai laboratori periferici senza specifica esperienza per la lettura dei test in IFL.

Nel 1997 la transglutaminasi tissutale (tTG), un enzima intracitoplasmatico a distribuzione ubiquitaria nell'organismo umano, liberato in corso di apoptosi, è stata identificata mediante studi in immunoblotting come il principale antigene verso cui sono diretti gli anticorpi antiendomio (178). La sensibilità degli anti-tTG di classe IgA è più elevata di quella degli EmA raggiungendo il valore medio del 98%, mentre la specificità è sicuramente inferiore (specificità media degli anti-tTG 90%). I falsi positivi per gli anti-tTG di solito presentano bassi valori di attività anticorpale (inferiori a 2 volte il cut-off). La riproducibilità degli anti-tTG è indubbiamente assai elevata in tutti i laboratori, non solo in quelli di riferimento, grazie alla assai semplice e ben standardizzata tecnica ELISA (203).

Nella esperienza del nostro laboratorio di Immunologia Clinica gli anti-tTG IgA sono positivi nel 98% dei celiaci non trattati, ma essi sono anche ritrovati in almeno il 10% dei controlli non celiaci (giardiasi, IBD, malattie autoimmuni) (203). Una transitoria positività per anti-tTG IgA, non associata a danno della mucosa duodenale, è stata osservata in pazienti con diabete autoimmune all'esordio con successiva scomparsa degli anticorpi entro 6 mesi dal loro ritrovamento (207). Il confronto fra EmA e anti-tTG mostra chiaramente che, sebbene il primo test sia più specifico, il secondo dovrebbe essere preferito come test di prima scelta per lo screening della celiachia a causa della sua elevata riproducibilità e di una più facile disponibilità di

substrato, nonché per una maggiore semplicità e diffusione della tecnica per determinare l'anticorpo.

In Italia come in molti altri paesi è disponibile un test rapido eseguito su goccia di sangue per la ricerca degli anticorpi antitransglutaminasi. Questo test è basato sulla tecnica di immunoprecipitazione e mostra una sensibilità ed una specificità medie per la celiachia intorno al 90% (208, 209). Ciò nonostante, la maggior parte dei ricercatori è concorde nel ritenere che il giusto impiego di questo test sia quello di dare una risposta preliminare circa la possibile esistenza di una celiachia, ma che, in considerazione della migliore performance garantita dai test tradizionali, questo test dovrebbe essere sempre controllato con i test tradizionali in caso sia di sua positività che di sua negatività, soprattutto se presenti sintomi compatibili con la diagnosi di celiachia.

La diagnostica sierologica della celiachia si è arricchita recentemente di un nuovo interessante marcatore, rappresentato dai DGP-AGA (210). Come è noto, dal punto di vista patogenetico, la deamidazione dei peptidi di gliadina da parte della tTG, consistente nella sostituzione di una molecola di glutammina con una di acido glutammico, rende più immunogenici e verosimilmente più specifici i peptidi di gliadina così modificati rispetto ai peptidi nativi. I linfociti T specifici per la gliadina riconoscono più attivamente i peptidi deamidati, così potenziando la stimolazione dei linfociti B con il risultato di una sintesi specifica anticorpale diretta verso questi peptidi così modificati. Dopo un iniziale entusiasmo per questi nuovi anticorpi che nei primi lavori mostravano una specificità quasi assoluta (99%), la prova sul campo ha dato risultati diversi ma pur sempre estremamente buoni. Diversi lavori pubblicati hanno riportato una sensibilità media di questi anticorpi circa del 90% ed una specificità media del 94% per la classe IgG, mentre quelli di classe IgA non sono attualmente ritenuti utili

nel migliorare il work-up diagnostico della MC e per tale motivo il loro utilizzo dovrebbe essere scoraggiato. Il confronto fra questo nuovo anticorpo ed i test tradizionali ha mostrato che i DGP IgG hanno un'accuratezza diagnostica marcatamente più elevata di quella dei tradizionali AGA; inoltre, sebbene i DGP-AGA mostrino una sensibilità chiaramente inferiore rispetto agli EmA e agli anti-tTG, la loro buona specificità, in particolare per la sottoclasse IgG, risulta essere elevata e simile a quella degli anti-tTG (211). I marker sierologici di classe IgA sono anche di grande utilità per monitorare la risposta alla dieta aglutinata. Una stretta compliance alla dieta senza glutine nei pazienti celiaci porta alla scomparsa o al significativo calo degli anticorpi entro 12 mesi (18-24 mesi se il titolo anticorpale è molto elevato) unitamente alla ricrescita dei villi intestinali. In tal senso gli anti-tTG di classe IgA devono essere considerati al momento come il test migliore per il follow-up della celiachia, mentre i DGP IgG possono essere maggiormente utili nella prima infanzia (al di sotto dei 2 anni di età) (211).

Per quanto riguarda i marker di classe IgG (esclusi i DGP IgG che si sono rivelati un test specifico per la celiachia) questi anticorpi sono di limitata utilità a causa dell'elevato numero di falsi positivi non solo in pazienti con altre patologie intestinali ed autoimmuni, ma anche in controlli sani (la loro specificità oscilla fra il 60% e l'80%). In generale, comunque, tutti i marker di classe IgG (AGA, EmA, anti-tTG, DGP-AGA) sono utili per identificare la celiachia associata al deficit di IgA (212).

Attualmente secondo il protocollo pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale del 19/08/2015 la diagnosi sierologica di celiachia nell'adulto si effettua determinando in prima battuta il dosaggio degli anti-tTG IgA unitamente alle IgA totali e per i bambini al di sotto dei due anni anche i DGP IgG. Qualora riscontrati positivi ad alto titolo in presenza di IgA totali normali si può procedere direttamente alla biopsia duodenale. Nel caso di positività a basso

titolo è utile effettuare la determinazione degli Ema IgA ed in caso di positività anche di questi, effettuare la biopsia duodenale per conferma definitiva.

Biopsia duodenale

Principale e insostituibile presidio diagnostico per la malattia celiaca è la valutazione morfologica della biopsia digiunale che ancora oggi, nonostante tutti i tentativi di ridurne il ruolo e l'efficacia, ne rappresenta il "gold standard" (194). Il patologo viene pertanto ad assumere una funzione rilevante per confermare o meno il sospetto clinico e laboratoristico di celiachia. La diagnosi istopatologica, tuttavia, è solo un momento del processo che porta alla definitiva diagnosi di celiachia, diagnosi che deve comunque essere posta in modo definitivo solo dall'internista - gastroenterologo pediatra o dell'adulto sulla base di tutti gli elementi a sua disposizione (194). In questi ultimi anni sono cambiati radicalmente i criteri istologici sui quali si basava la diagnosi di celiachia. In un non lontano passato soltanto le lesioni caratterizzate da atrofia totale o parziale severa dei villi intestinali erano sinonimo di celiachia. Oggi lo spettro delle alterazioni della mucosa intestinale compatibili con una diagnosi di celiachia si è ampliato enormemente con l'inclusione dei quadri di atrofia lieve dei villi e con le lesioni infiltrative isolate, caratterizzate da un isolato aumento dei linfociti intraepiteliali (213, 214). Per quanto riguarda le sedi del campionamento, andrebbero prelevati almeno 4 frammenti dalla seconda/terza porzione del duodeno e almeno uno dal bulbo. Fino a pochi anni fa nei bambini al di sotto dei due anni la biopsia veniva eseguita mediante l'impiego della capsula di Crosby-Watson per via perorale. Oggi, tuttavia, ci si indirizza verso l'esame endoscopico a qualsiasi età, esame che offre il vantaggio di una maggiore rapidità, di essere meglio tollerato e di

poter eseguire prelievi multipli a livello della mucosa duodenale. Presupposto fondamentale per una corretta valutazione morfologica è l'orientamento dei prelievi biotici, utilizzando filtri millipore di acetato di cellulosa (215, 216). E' sufficiente una normale colorazione in ematossilina-eosina ed eventualmente una colorazione all'acido periodico -reattivo di Schiff- (PAS) per valutare tutti gli elementi morfologici necessari (una o due sezioni a parte saranno destinate alla tipizzazione immunohistochimica con colorazione per CD3 per una più corretta definizione del numero dei linfociti intraepiteliali) (215). Dal punto di vista della microscopia ottica la mucosa intestinale normale presenta le seguenti caratteristiche: 1) villi di aspetto digitiforme con rapporto tra l'altezza dei villi e quella delle cripte sempre a favore del villo (3/1 o più); 2) numero dei linfociti intraepiteliali in condizioni di normalità non superiore a 25 linfociti per 100 cellule epiteliali. E' da ritenersi superato e non più valido il rapporto 40 linfociti per 100 cellule epiteliali; 3) le cripte hanno fundamentalmente il compito di svolgere una funzione rigenerativa per cui è possibile riscontrarvi delle mitosi; in genere il range normale è di 1 mitosi per cripta. Accanto alle cellule epiteliali vi sono cellule endocrine, Goblet cells e cellule di Paneth, che però non hanno alcun valore per quanto attiene la diagnostica della malattia celiaca; 4) a livello della lamina propria normalmente si riscontrano plasmacellule, eosinofili, istiociti, mast cells e linfociti. I neutrofili sono generalmente assenti, fatta eccezione per i casi di duodenite attiva con eventuale metaplasia gastrica strettamente correlata all'infezione da *Helicobacter pylori*. Le plasmacellule sono la componente cellulare più numerosa, così come i linfociti, talora presenti sotto forma di aggregati linfoidi, e gli eosinofili il cui valore non deve mai essere superiore a 60 per 10 campi di visione esaminati.

Le lesioni della mucosa intestinale compatibili con una diagnosi di malattia celiaca vengono distinte in 6 stadi secondo la classificazione di Marsh, modificata da Oberhuber, che viene attualmente utilizzata in pratica in tutti i centri di riferimento per la diagnosi di celiachia (Tabella 5) (213). Le lesioni di tipo 1 e di tipo 2, caratterizzate da aumento dei linfociti intraepiteliali senza o con iperplasia delle cripte in presenza di normale rapporto villi/cripte e villi di normale morfologia, sono compatibili ma non specifiche per malattia celiaca. Soltanto il 10% circa di queste lesioni intestinali minime è espressione di un danno intestinale glutine-dipendente nell'ambito di una celiachia potenziale, mentre nel restante 90% dei casi le alterazioni della mucosa intestinale sono riconducibili ad altre cause, fra cui allergie alimentari (in particolare intolleranza alle proteine del latte vaccino), morbo di Crohn, colite linfocitica, infezioni intestinali di tipo batterico e parassitario, quale ad esempio la giardiasi, immunodeficienza comune variabile, patologie autoimmuni (tiroidite autoimmune, LES, diabete mellito autoimmune), contaminazione batterica dell'intestino, trattamento con antiinfiammatori non steroidei e infezione da *Helicobacter pylori* (217-220). Fattori predittivi per una condizione di celiachia potenziale in questi casi sono l'incremento della quota di linfociti gamma/delta ricercati in immunistochemica su biopsie intestinali congelate (fino al 20-30% in condizioni di danno intestinale glutine-dipendente *versus* il 2-3% in assenza di danno correlato al glutine) e l'incremento del numero di linfociti intraepiteliali all'apice dei villi (221). Negli ultimi anni stiamo assistendo al preoccupante fenomeno di un elevato numero di diagnosi di celiachia, formulate in modo improprio sulla base di queste lesioni minime senza il loro inquadramento nel contesto dei fattori predittivi (clinici, anticorpali e genetici) per identificarne la glutine-dipendenza (220). Identificare quel 10% di pazienti in cui le lesioni intestinali minime possono predire lo sviluppo di

una celiachia è estremamente importante perché consente di circoscrivere il monitoraggio a questo sottogruppo, evitando inutili controlli ed esami nella stragrande maggioranza degli altri pazienti. La lesione tipica della celiachia è rappresentata dall'atrofia dei villi con alterazione del rapporto villi/cripte (<3:1 fino a raggiungere 1:1) ed incremento dei linfociti intraepiteliali. Questa lesione, definita come tipo 3 nella classificazione di Marsh-Oberhuber, viene a sua volta suddivisa a seconda della severità dell'atrofia in tre stadi: atrofia lieve (3a), parziale (3b) e subtotale (3c). Vi è anche una lesione atrofica di tipo 4 (atrofia totale), di assai raro riscontro, caratterizzata, oltre che dall'assenza completa dei villi, anche dal mancato incremento dei linfociti intraepiteliali. Tale lesione è espressione dell'evoluzione della celiachia verso le sue complicanze (celiachia refrattaria, digiunoileite ulcerativa e linfoma) (213). Nel tentativo di semplificare il lavoro degli anatomo-patologi e facilitare il rapporto tra patologi e clinici è stata proposta recentemente da Corazza e Villanacci una nuova versione della classificazione istologica che riduce il numero degli stadi da 6 a 3; in particolare le lesioni che caratterizzano la malattia celiaca sono state divise in due categorie: non-atrofica (grado A) e atrofica (grado B); il grado B a sua volta è stato ulteriormente suddiviso in B1 in cui il rapporto villo/cripta è inferiore a 3:1, con villi ancora individuabili, e B2 in cui i villi non sono più individuabili. La lesione di grado A, caratterizzata dall'incremento patologico del numero dei linfociti intraepiteliali, meglio riconosciuto dall'impiego di tecniche immunoistochimiche (colorazione per i CD3), con o senza iperplasia delle cripte, comprende al suo interno la lesione tipo 1 e 2 secondo la classificazione di Marsh-Oberhuber, la lesione di grado B1 raggruppa al suo interno la lesione 3a e 3b, mentre il grado B2 in pratica corrisponde alla 3c. La lesione di tipo 4 di rarissima osservazione è stata del tutto eliminata nella nuova classificazione (Tabella 6) (214). Rilevante è la

tipizzazione immunohistochimica delle popolazioni linfocitarie presenti nella mucosa duodenale. Anche se in parte già accennato è bene ribadire che per una maggiore attendibilità la conta dei linfociti intraepiteliali deve sempre prevedere l'effettuazione di tipizzazione immunohistochimica con il CD3 monoclonale. Importante è anche la valutazione con il CD8, particolarmente utile nei casi di soggetti anziani in cui non è raro il riscontro di forme refrattarie alla dieta, con possibile evoluzione in linfoma, in cui l'espressione del CD8 può essere negativa rispetto alla "norma".

Un'atrofia dei villi intestinali che entra in diagnostica differenziale soprattutto con la celiachia dell'adulto è presente in alcune condizioni patologiche di raro riscontro, fra cui l'enteropatia autoimmune, il morbo di Whipple, la gastroenterite eosinofila, la immunodeficienza comune variabile, la giardiasi, la linfangectasia intestinale ed il danno enterico da FANS.

Genetica

La tipizzazione degli antigeni di istocompatibilità (HLA) nella celiachia è un test genetico di suscettibilità che valuta la maggiore o minore predisposizione di un individuo a sviluppare la celiachia, dal momento che le molecole HLA a rischio non sono da sole sufficienti a determinare la malattia, che compare soltanto in seguito all'esposizione a fattori ambientali scatenanti. La determinazione dell'HLA trova indicazione in caso di dubbio diagnostico (ad es. discrepanza fra sierologia e biopsia) e nei familiari di 1° grado degli affetti (genitori, figli e fratelli) per decidere in questo secondo caso se continuare il follow-up anticorpale in caso di sierologia negativa, in base a linee guida nazionali ed internazionali (222, 223). La presenza dell'HLA-DQ2 (eterodimero completo o del solo allele DQB1*02) o dell'HLA-DQ8 determina un aumento del rischio di celiachia circa 50 volte

superiore rispetto alla popolazione generale, mentre l'assenza di tutti i predetti fattori rende del tutto improbabile lo sviluppo della malattia. DQ2 e DQ8 sono glicoproteine che si trovano sulla superficie di cellule del sistema immunitario formate da due catene diverse, alfa e beta, e perciò dette eterodimeri. Le catene alfa e beta sono codificate dai geni DQA1 e DQB1. Gli alleli DQA1*05 e DQB1*02 codificano per l'eterodimero DQ2 e gli alleli DQA1*03 e DQB1*0302 per l'eterodimero DQ8. Dei celiaci approssimativamente l'81% è DQ2 positivo (DQA1*05 e DQB1*02), il 10% è DQ8, il 6% è DQB1*02 positivo, ma DQA1*05 negativo, presentando soltanto la metà beta della molecola DQ2 a rischio. Da notare che circa il 25-30% dei DQ2 positivi è DQB1*02 omozigote, condizione che conferisce un maggior rischio di sviluppare la celiachia. Per la determinazione del DQ2 è quindi necessario testare sia il DQA1*05 che il DQB1*02, dal momento che la presenza di entrambi gli alleli porta ad un rischio molto più elevato della positività per il solo allele DQB1*02. Al contrario, la determinazione del DQ8 non obbligatoriamente deve prevedere la tipizzazione del gene DQA1, poiché in pratica tutti i casi DQB1*0302 positivi sono DQA1*03 positivi, ma non viceversa. La presenza del DQB1*02/*02 omozigote determina il rischio più elevato di celiachia e sembra predire l'insorgenza di forme più gravi con complicanze. Tale assetto genetico è ritrovato nel 30% circa dei celiaci e nel 10% dei controlli DQ2 positivi.

Dei celiaci DQ2 positivi sul territorio italiano, approssimativamente il 65% è DRB1*03 (DR3), il 30% è eterozigote DRB1*11-12/*07 (DR5/7) e soltanto il 5% ha altri alleli DRB1. I casi che hanno solo la catena beta del dimero DQ2 sono quasi sempre DRB1*07 (DR7). Gli alleli DRB1 non modificano i rischi di malattia che dipendono esclusivamente dai loci DQ, ma la loro determinazione può essere di aiuto come convalida dei risultati. Riassumendo la tipizzazione HLA deve comprendere: a) gli alleli DQA1*05,

DQB1*02 e DQB1*0302. Per i primi due basta prendere in considerazione le prime due cifre in quanto tutti gli alleli del gruppo (DQA1*0501 e DQA1*0505 o DQB1*0201, e DQB1*0202) sono ugualmente a rischio; per il DQB1*0302 tutte e quattro le cifre devono essere determinate perché ad es. le varianti DQB1*0301 e DQB1*0303 non portano ad un aumentato rischio di celiachia; b) controlli negativi e positivi. Per maggiore completezza la tipizzazione dovrebbe anche prendere in considerazione gli alleli DQA1*03 e DRB1*03, *04, *07, *11, *12. Infine, dato di estrema importanza in considerazione della predittività di elevato rischio, dovrebbe essere sempre prevista la determinazione dello stato DQB1*02 omozigote.

Altre tecniche strumentali

Alcune tecniche strumentali si sono recentemente dimostrate utili nella diagnostica della celiachia. La loro importanza non è paragonabile a quella della biopsia duodenale e della sierologia, ma possono trovare applicazione per identificare casi di celiachia, a volte non sospettabili sul piano clinico, da confermare con gli accertamenti tradizionali.

Marker endoscopici: in corso di EGDS eseguita per altri motivi (quali sindrome dispeptica, ulcera peptica, reflusso gastroesofageo, etc..) è possibile osservare alcune alterazioni macroscopiche della mucosa duodenale, che si sono rivelate altamente predittive per celiachia. I pattern macroscopici più suggestivi di celiachia a livello della seconda terza porzione duodenale sono rappresentati dall'assenza delle pliche di Kerckring, dallo *scalloping* (dentellatura della mucosa duodenale), dal pattern a mosaico e ad acciottolato; in presenza di questi rilievi macroscopici, l'endoscopista deve sempre procedere all'esecuzione di biopsia duodenale,

anche se non espressamente richiesto prima dell'esame, nel fondato sospetto di malattia celiaca (224).

Ecografia: i principali reperti ultrasonografici che possono far nascere il sospetto di una malattia celiaca sono l'aumento del volume della colecisti a digiuno, l'incremento volumetrico dei linfonodi mesenterici, il riscontro di anse intestinali dilatate e di spessore aumentato con elevato contenuto di liquido, e la presenza di liquido libero nella cavità addominale. La concomitante presenza di tutti questi segni ecografici aumenta notevolmente la probabilità di una diagnosi di celiachia (225, 226).

Tecnica a immersione con magnificazione endoscopica: questa tecnica, basata sulla rapida introduzione, in corso di EGDS, di acqua nel lume duodenale dopo rimozione dell'aria per suzione, consente di visualizzare i villi intestinali attraverso la magnificazione endoscopica. In pazienti con EmA o anti-tTG questa metodica ha dimostrato un elevato potere predittivo per la diagnosi di celiachia, consentendo di identificare la totalità dei pazienti con atrofia dei villi. Il vantaggio di questo approccio è rappresentato dal risparmio dei costi relativi all'esecuzione della biopsia duodenale, ma ancora una volta va sottolineato che solo la biopsia duodenale, facilmente eseguibile nel corso dello stesso esame endoscopico necessario per la tecnica a immersione, può dare la certezza diagnostica (227).

Videocapsula: l'indicazione all'esecuzione di questo esame non è tanto la diagnosi, ma piuttosto lo studio delle complicanze della celiachia (linfoma, malattia celiaca refrattaria, adenocarcinoma del tenue, digiunoileite ulcerativa). Peraltro, nei pazienti, che non possono essere sottoposti ad

EGDS o che rifiutano l'esame, la capsula endoscopica è in grado di riconoscere con elevata probabilità la presenza di atrofia dei villi in una discreta percentuale di casi. Nell'ambito della caratterizzazione dei pazienti già diagnosticati tale esame può fornire informazioni sulla estensione delle lesioni dell'intestino tenue. L'esclusione della diagnosi di celiachia non può basarsi peraltro sulla assenza di atrofia dei villi alla videocapsula, ma richiede sempre l'esecuzione di una biopsia duodenale (228).

Follow-up

Una visita di controllo entro 6-12 mesi dalla diagnosi e successivamente, ogni 12-24 mesi (eccetto l'insorgenza di complicanze) è sufficiente per verificare la compliance alla dieta senza glutine, escludere la comparsa di patologie autoimmuni ed alterazioni metaboliche, ma soprattutto, diagnosticare precocemente la comparsa di eventuali complicanze quali la malattia celiaca refrattaria, il linfoma intestinale, l'adenocarcinoma del tenue e la digiunoileite ulcerativa).

I pazienti devono essere sottoposti ad una visita con valutazione dietetica e controllo degli esami ematici fra cui: emocromo, dosaggio anti-tTG IgA (o IgG se vi è deficit delle IgA), TSH, anti tireoperossidasi ed anti tireoglobulina, ferritina. Al primo controllo è utile effettuare uno screening per altre patologie autoimmuni con NOS ed anti nucleo. Nell'adulto una densitometria ossea andrebbe eseguita di routine una volta almeno, dopo 18 mesi di dieta senza glutine e ripetuta periodicamente su indicazione del curante, solo se patologica o per altre indicazioni. Dal momento che in alcuni casi la dieta aglutinata può portare ad un improvviso ed eccessivo aumento ponderale, un'attenta valutazione metabolica dovrà essere messa in atto in questi casi.

CELIACHIA E NEOPLASIE MALIGNI

L'associazione fra MC e neoplasie maligne è nota da oltre 50 anni (229) e un ritardo diagnostico di questa condizione espone ad un maggior rischio di sviluppare patologie neoplastiche (230). Negli ultimi anni un numero sempre maggiore di studi ha riportato un'aumentata incidenza da 6 a 9 volte superiore alla popolazione generale di linfoma intestinale a cellule T (230). Se si valutano le neoplasie del tratto gastrointestinale è stato riportato un aumentato rischio dei pazienti con MC di sviluppare una SBA con un Odd ratio che va da 4.29 a 59.97 (231). Nel 2002 è stato pubblicato uno studio su *Gastroenterology* che mostrava un aumentato rischio di CRA nei pazienti con malattia celiaca (rapporto standardizzato di incidenza di 1.9, con intervallo di confidenza al 95% 1.2 -2.8) (232). Nel 2012, però, il nostro gruppo di ricerca ha invece smentito tale associazione, trovando addirittura valori di rapporto standardizzato di incidenza protettivo (0.29, con intervallo di confidenza al 95% 0.07-0.45) (233). Ulteriori studi sull'associazione MC e rischio di tumori maligni epatici e pancreatici sono risultati inconcludenti mentre è stata riportata l'associazione con altri tumori quale il carcinoma papillifero della tiroide (234). Una recente metanalisi ha studiato il rapporto fra MC e rischio di cancro in generale (235). La popolazione studiata (europea e statunitense) comprendeva 55.504 pazienti celiaci in 14 diversi studi, di questi 2558 hanno sviluppato una qualche forma di cancro. L'analisi cumulativa ha mostrato un odd ratio di 1.25 (1.09-1.44 con intervallo di confidenza 95%) ed una significativa eterogeneità nei risultati ($I_2=82.6\%$, $P<0.001$) ma comunque significativa (Tabella 4). Come già descritto in letteratura il rischio di sviluppare complicanze, fra cui patologie

neoplastiche, nei pazienti con MC può essere influenzato dal periodo della vita in cui è stata fatta diagnosi di celiachia, diagnosi tardive oltre i 48 anni di età aumentano il rischio (236). I dati ricavati da metanalisi mostrano inoltre che l'odd ratio di sviluppo di una forma tumorale è differente nel periodo peri-diagnosi e post-diagnosi di MC. Infatti nel periodo peri-diagnosi l'odd ratio risulta di 1.72 (intervallo di confidenza al 95% 1.14-2.59), e nel post-diagnosi 1.09 (intervallo di confidenza al 95% 0.93-1.27). In altre parole l'inizio della dieta aglutinata nei pazienti con MC risulta protettivo nello sviluppo di un qualsiasi tumore. I casi di tumore riscontrati, invece, si erano già sviluppati al momento della diagnosi di MC e quindi il processo carcinogenico era già insorto durante la dieta libera quando il paziente non era ancora a conoscenza dell'enteropatia da glutine (235).

Celiachia e rischio di neoplasie del tratto gastrointestinale

Una metanalisi su 85.698 pazienti provenienti da Europa e Stati Uniti affetti da celiachia ha riscontrato 995 casi di neoplasie maligne del tratto gastrointestinale (1,16%) (235). In particolare l'odd ratio di sviluppare un cancro dell'apparato gastrointestinale risultava di 1.60 (IC 95%, 1.39-1.84) con una eterogeneità I_2 non significativa (Tabella 4). Analizzando solamente questo sottogruppo di neoplasie il rischio di sviluppare un tumore era sempre aumentato sia nel periodo peri-diagnosi di MC che nel post-diagnosi, anche se nel post-diagnosi era comunque inferiore (OR peri-diagnosi 3.44 vs. post-diagnosi 1.49).

Celiachia (MC) e adenocarcinoma dell'intestino tenue (SBA)

Uno studio di metanalisi condotto su 79.991 pazienti ha riscontrato una prevalenza di 75 casi di SBA con un odd ratio di rischio di sviluppo di 14.41 (IC 95%, 5.53 -37.60) con una eterogeneità I_2 significativa (90.5%, $P < 0.001$)

(Tabella 4). Anche in questo caso il periodo peri-diagnosi mostrava un rischio più elevato (OR 17.08, CI 95%, 3.59-81.20) rispetto al post-diagnosi (OR 4.64, IC 95%, 1.06-20.26)

SCOPO DELLA RICERCA

L'adenocarcinoma dell'intestino tenue (ACT) è una neoplasia estremamente rara nella popolazione generale. Secondo i dati dell'EUROCORE, si stima che questa neoplasia abbia un'incidenza di 5.7 casi / 1.000.000 di persone all'anno per un totale di 3000 casi in Europa (su una popolazione generale di circa 500.000.000) (1). I dati disponibili in letteratura suggeriscono che la malattia celiaca (MC) è associata ad un aumentato rischio di sviluppare ACT, sebbene, a tutt'oggi, non vi sono dati sulle caratteristiche cliniche, istologiche ed immunologiche di questa neoplasia quando si manifesta come complicanza della MC. Lo scopo della ricerca effettuata durante il Dottorato è consistito nel chiarire la prevalenza dell'ACT in una coorte di pazienti affetti da MC, definendo le loro caratteristiche cliniche, istologiche ed immunologiche.

MATERIALI E METODI

Popolazione dello studio

Sono stati studiati retrospettivamente 770 pazienti celiaci (F/M 599/211, ratio 3.5:1, età mediana 36 anni, range 18-80 anni), inviati fra il gennaio 1995 ed il dicembre 2014 al Centro di Riferimento Regionale per la Diagnosi ed il Follow-up della Celiachia del Policlinico S.Orsola-Malpighi, al fine di individuare casi di SBA. Tutti i pazienti inclusi nello studio hanno espresso il loro consenso informato nel momento in cui sono stati inviati all'ambulatorio per la prima volta. La casistica comprendeva pazienti con sintomi intestinali (diarrea, stipsi, dolori addominali ricorrenti, meteorismo, dispepsia, vomito, occlusione intestinale) e pazienti con sintomi extraintestinali, incluse alterazioni laboratoristiche (anemia sideropenica o da carenza di acido folico, afte ricorrenti del cavo orale, ipertransaminasemia criptogenetica, iposomia, osteoporosi inspiegabile, difetti dello smalto dentale, sindrome emorragica dovuta a deficit di vitamina K, mialgie, anomalie dell'apparato riproduttivo femminile e quadri di artrite non meglio specificata). Tutti i pazienti arruolati sono stati sottoposti a screening sierologico per celiachia mediante ricerca di anti-tTG IgA, EmA IgA e DGP IgG. Nello stesso tempo, tutti i nostri pazienti, sono stati sottoposti ad EGDS con biopsie multiple (n=5) del duodeno. Prima di sottoporsi all'endoscopia ogni paziente sottoscriveva il consenso informato secondo le regole stabilite dal Policlinico S.Orsola-Malpighi. Le biopsie dei casi identificati sono state valutate attraverso indagini immunoistochimiche impiegando anticorpi monoclonali che riconoscono markers epiteliali intestinali (e.g. MUC2, CDX2 e CD10) e gastrici (e.g. MUC5AC e MUC6). Per esplorare potenziali

target terapeutici abbiamo inoltre ricercato la presenza di mutazioni di KRAS, NRAS e BRAF mediante qRT-PCR.

Test anticorpali

Anticorpi anti transglutaminasi tissutale umana (anti-tTG)

Gli anti-tTG di classe IgA sono stati ricercati mediante un kit ELISA disponibile in commercio (Eurospital, Trieste, Italia), utilizzando come antigene transglutaminasi tissutale ricombinante umana. Brevemente, i principali passaggi del test ELISA per la loro determinazione. I sieri dei pazienti e dei controlli (alla diluizione di 1:100), i calibratori prediluiti, ed i controlli positivi e negativi vengono seminati nei pozzetti di polistirene della piastra ELISA, ove è presente la transglutaminasi tissutale. Dopo 30 minuti di incubazione a temperatura ambiente i pozzetti vengono lavati 4 volte con buffer già fornito dalla ditta produttrice. Successivamente, gli antisieri anti IgA umane, coniugati con perossidasi, vengono aggiunti ad ogni pozzetto e lasciati ad incubare per 30 minuti per consentire alle Ig umane coniugate all'enzima di legarsi agli anticorpi presenti nei pozzetti. Successivamente, le piastre vengono lavate per rimuovere le Ig non legate agli anticorpi presenti nei pozzetti ed un substrato cromogenico per la perossidasi viene aggiunto ad ogni pozzetto. Dopo 30 minuti di incubazione a temperatura ambiente, la reazione viene misurata mediante un lettore ELISA (Labsystems Multiskan, Havervill, MA, USA) a 450 nm. Il valore del cut-off è stato fissato dalla ditta produttrice del kit a 16 unità arbitrarie (AU). Tutti i sieri con lettura > 16 AU venivano considerati positivi per anti tTG.

Anticorpi antiendomisio (EmA)

Gli EmA di classe IgA sono stati determinati con metodica di immunofluorescenza indiretta utilizzando sezioni criostatiche di cordone ombelicale umano dello spessore di 4 micron, preparate nel nostro laboratorio, come substrato antigenico. I sieri venivano testati alla diluizione iniziale di 1:5, in caso di positività, si procedeva alla determinazione del titolo anticorpale. Come secondo anticorpo, è stato impiegato un antisiero anti IgA umane coniugato con FITC, usato alla diluizione di 1:100 (Dako, Copenhagen, Danimarca). Il pattern di positività degli EmA si caratterizza per una fluorescenza intensa delle fibre endomisiali che circondano le fibre muscolari lisce nella parete dei vasi del cordone ombelicale umano.

Anticorpi verso i peptidi di gliadina deamidati (DGP)

I DGP di classe IgG sono stati ricercati utilizzando un kit ELISA disponibili in commercio (Eurospital, Trieste, Italia). L'antigene utilizzato è costituito da un peptide sintetico di gliadina che è stato ricostruito mantenendo la stessa conformazione del peptide originale che è stato selettivamente deamidato. Il valore di cut-off per questo test, fissato dalla ditta produttrice, è di 16 AU.

Analisi immunoistochimiche negli SBA

L'analisi è stata effettuata unicamente nei casi di SBA associato a MC individuati mediante lo studio retrospettivo della casistica del nostro centro dal 1995 al 2014. I pezzi anatomici erano stati fissati, al tempo della diagnosi di malattia, in formalina 4% e inclusi in paraffina. Sono stati recuperati i blocchetti di paraffina dall'Anatomia Patologica del Policlinico S.Orsola-Malpighi. Da questi sono state ottenute sezioni seriali di 2µm, fissate con ematossilina-eosina per la ri-valutazione istologica di conferma di SBA. I pezzi anatomici dei casi identificati sono stati valutati attraverso indagini

immunoistochimiche impiegando anticorpi monoclonali che riconoscono markers epiteliali intestinali (e.g. MUC2, CDX2 e CD10) e gastrici (e.g. MUC5AC e MUC6). La necessità di ricercare marker di tipo gastrico è dovuta al fatto che le neoplasie del tenue associate a malattie infiammatorie croniche intestinali mostrano in letteratura positività per MUC5AC e MUC6 in una alta percentuale di casi. Venivano inoltre valutate le caratteristiche della mucosa non neoplastica dei margini circostanti la neoplasia per escludere la presenza di una eventuale metaplasia gastrica e/o presenza di neoplasia in situ. L'analisi immunoistochimica è stata realizzata mediante sistema Ventana Automatic Stainer; (VENTANA MEDICAL SYSTEMS, INC.). Gli anticorpi monoclonali per i marker intestinali (MUC 2, CDX2 e CD10) e gastrici (MUC5AC e MUC6) utilizzati, sono prodotti dalla Biogenex, San Ramon, CA. Le cellule sono state considerate positive mediante una valutazione semi-quantitativa contando la percentuale di cellule positive in 5 differenti campi da 0.12 mm² ad ingrandimento 40X. Casi che mostravano una positività superiore al 20% sono stati considerati positivi. (Immagini da 1 a 5)

Analisi genetico-molecolari degli SBA

L'estrazione dell'RNA per la qRT-PCR al fine di valutare i geni KRAS, NRAS e BRAF è stata ottenuta a partire dagli stessi campioni fissati in paraffina, utilizzando un kit commerciale QuickExtract™ FFPE RNA Extraction Kit (Epicentre an Illumina Company, Madison, Wisconsin, USA). In particolare sono state tagliate, utilizzando un microtomo, 3 fette dello spessore di 10 µm. Tali fette sono state immerse in 100 µl della soluzione fornita dal kit "QuickExtract FFPE RNA Extraction Solution" e centrifugata per 1 minuto a 14.000 rpm. La soluzione con il tessuto rimasta sul fondo dopo la centrifugazione è stata riscaldata in un termociclatore per 30 minuti

a 56°C e poi per 2 minuti a 98°C. La qualità e concentrazione dell'RNA ottenuto è stata verificata misurando l'assorbanza a 260 e 280 nm con uno spettrofotometro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Cambridge, MA, USA). Una volta ottenuto l'RNA si è proceduto a sintetizzare a partire da questo il c-DNA utilizzando il kit Maxima Universal First strand C-DNA synthesis. In particolare, 1 µg di RNA purificato è stato retrotrascritto in 15 µl di soluzione contenente, acqua RNAsi free, Random Primers (0.5 µL), OligodT (0.5 µL) e dNTP (10mM 1 µL). La soluzione ottenuta è stata incubata per 5 min a 65°C e poi portata a 4°C. A questo punto veniva aggiunto 1 µL di trascrittasi inversa Maxima H Minus e 4 µL di RT buffer. La soluzione viene quindi incubata a 25°C per 10 minuti, poi a 50°C per 1 ora, successivamente la reazione viene fermata portando la temperatura a 85°C per 5 minuti. L'espressione dei geni studiati è stata determinata mediante Real-Time PCR utilizzando il sistema Thermal Cycler CFX96 (Bio-Rad Laboratories, USA). Il cDNA precedentemente ottenuto è stato diluito 1:3.2 con H₂O, ed un totale di 1 µl di cDNA è stato amplificato utilizzando SYBR Green Master Mix Reagent 1X (Applied Biosystem, Applera) e specifici primer 5' e 3' per ciascun gene. I passaggi dell'amplificazione utilizzati sono i seguenti: 95°C per 30 secondi e successivamente 40 cicli comprendenti 5 secondi a 95°C e 15 secondi a 60°C. E' stato utilizzato un software per l'analisi delle curve di dissociazione e il livello di espressione del mRNA è stato normalizzato rispetto ad un gene endogeno di riferimento (GAPDH).

RISULTATI

Sono stati identificati cinque casi (0.65%) di SBA su 770 pazienti affetti da MC. Tutti e 5 i casi erano di sesso femminile (età media 53, range 38-72). La diagnosi di SBA è stata contestuale a quella di MC in tre casi su cinque. Nei soggetti che hanno sviluppato un SBA le caratteristiche cliniche della MC all'esordio erano diarrea cronica e malassorbimento (MC classica) in tre casi, mentre gli altri due casi mostravano unicamente anemia sideropenica ed epigastralgia (MC non classica). In tutti e cinque i pazienti gli anticorpi della celiachia (anti transglutaminasi - tTGA- ed anti endomisio - EmA) erano presenti ad alto titolo alla diagnosi (titolo medio tTGA: 91 AU, range 86-114 AU; titolo medio EmA: 1:160, range 1:80 -1:320). La tipizzazione dello HLA eterodimero per la celiachia mostrava la positività per DQ2 in tutti i casi, con un DQ2 in omozigosi in un solo caso.

La biopsia duodenale alla diagnosi di MC, mostrava una severa atrofia mucosale (grado 3C secondo Marsh-Oberhüber) in 4 casi su 5, mentre il rimanente caso mostrava un'atrofia lieve dei villi (grado 3A).

Al momento della diagnosi di SBA il quadro clinico di questi pazienti era caratterizzato da diarrea in 3 casi e da episodi subocclusivi (con vomito) negli altri due casi. La più frequente localizzazione anatomica del SBA lungo il tenue era il digiuno con 4 casi su cinque, mentre nel rimanente caso la neoplasia era localizzata nel duodeno.

Mediante il work-up diagnostico messo in atto con l'utilizzo di diverse indagini, quali ecografia delle anse intestinali, videocapsula ed enterotc o enterorm, la diagnosi di SBA è sempre stata formulata prima dell'intervento chirurgico di resezione in tutti e cinque i casi. Più precisamente la diagnosi

è stata formulata mediante biopsia tramite enteroscopia con doppio pallone nei 4 casi a localizzazione digiunale, mentre con una EGDS nel caso a localizzazione duodenale.

L'esame istologico eseguito mostrava la presenza in tre casi di un carcinoma di alto grado, scarsamente differenziato (grado III-IV) (Immagini 6 e 7) con importante coinvolgimento linfonodale e metastasi (fegato, peritoneo e pancreas) in due casi su tre ad alto grado. I restanti due casi mostravano invece adenocarcinomi intestinali di tipo tubulare a basso grado (Immagine 8), ben differenziati, senza coinvolgimento linfonodale o metastatico. Nei tre pazienti con malattia avanzata la strategia terapeutica utilizzata è consistita in una resezione chirurgica intestinale seguita da cicli di chemioterapia adiuvante (protocollo FOLFOX, in un caso associato a bevacizumab) mentre nei due casi con malattia localizzata è stata eseguita unicamente la resezione chirurgica.

I 5 pazienti hanno eseguito uno stretto follow-up semestrale e 3 sono ancora in vita (di cui due senza ripresa di malattia dopo più di 5 anni dalla diagnosi di SBA), mentre due sono deceduti rispettivamente ad un anno ed a 5 anni dalla diagnosi. Entrambi i pazienti deceduti erano affetti da una neoplasia avanzata con un SBA di alto grado, scarsamente differenziato. Oltre ai dati clinici quali prevalenza, clinica e prognosi del SBA associato a MC, lo studio ha avuto, come ulteriore obiettivo, quello di identificare marcatori immunoistopatologici che caratterizzano lo SBA nei pazienti affetti da celiachia. Almeno uno dei markers intestinali ricercati risultavano espressi nelle neoplasie studiate. Specificamente CDX2 era espresso in 4 neoplasie, CD10 in 3 e MUC2 in 4. Al contrario, i markers gastrici (MUC5AC e MUC6) sono risultati negativi nelle neoplasie studiate. L'istologico della paziente che aveva una localizzazione duodenale della malattia mostrava una

zona di metaplasia foveolare gastrica positiva per MUC5AC, nel contesto di una neoplasia MUC5AC negativa. In un caso di neoplasia digiunale avanzata (grado IV) era presente un focus di neoplasia intraepiteliale ad alto grado adiacente al carcinoma invasivo.

Per quanto riguarda la ricerca di mutazioni di KRAS, sono state trovate in 2 neoplasie su 5 (codone 12 esone 2), mentre non sono state riscontrate mutazioni di NRAS (esoni 2, 3, 4) o BRAF (esone 15).

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti da questo studio sono di grande interesse per la comunità scientifica in quanto lo SBA associato a MC sembra avere caratteristiche cliniche, istologiche e fenotipiche differenti rispetto al SBA sporadico o associato alle malattie infiammatorie croniche intestinali (M. Crohn).

I nostri risultati confermano ed ampliano i dati presenti in letteratura riguardo l'elevato rischio dei soggetti con MC di sviluppare un SBA. Sebbene il nostro studio non prevedesse una popolazione di controllo, utilizzando il dato di prevalenza di SBA fornito dalla letteratura (5 casi per milione di persone), l'odd ratio di sviluppo di un SBA nei pazienti con MC risulterebbe essere di 1307 volte aumentato rispetto alla popolazione generale. Tale dato associato al costante aumento delle diagnosi di celiachia, è un campanello di allarme verso un ulteriore aumento dell'incidenza dei casi di SBA nei prossimi anni. Il nostro studio riveste da questo punto di vista un importante ruolo, poiché sebbene l'associazione SBA-MC sia nota da anni, tale osservazione è basata unicamente su un modesto numero di pazienti e molta della letteratura presente è costituita da case report (237-241). Dal punto di vista patogenetico, diversamente dagli SBA associati a Morbo di Crohn dove vi è evidenza di una sequenza displasia-carcinoma (242), negli SBA associati a celiachia non è mai stata dimostrata la presenza di una lesione premaligna o di una displasia della mucosa atrofica adiacente alla lesione cancerosa (243). In letteratura è stata quindi ipotizzata una verosimile sequenza adenoma -carcinoma anche nel SBA associato a MC (244). I risultati emersi dal nostro studio sembrano però porre in discussione tale ipotesi in quanto abbiamo identificato in un caso un focus di neoplasia intraepiteliale ad alto grado adiacente al carcinoma invasivo, senza segni di adenoma, ed in un

ulteriore caso è stata individuata una zona di metaplasia foveolare gastrica positiva per MUC5AC, nel contesto di una neoplasia MUC5AC negativa. Non è stato possibile porre ipotesi sull'evoluzione della lesione neoplastica negli altri 3 casi di SBA individuati, poiché sono stati scoperti in stadi avanzati e l'eventuale lesione precancerosa, qualora presente, poteva essere già scomparsa, lasciando il posto al carcinoma invasivo. Ulteriori studi saranno necessari per cercare di chiarire quale sia la reale evoluzione patogenetica degli SBA associati a celiachia e se veramente anche questo sottotipo di SBA segua come gli SBA associati a Morbo di Crohn la via adenoma-carcinoma. Tale obiettivo è ovviamente strettamente associato alla necessità di individuare queste lesioni il più precocemente possibile e di conseguenza sarà necessaria una diffusione della cultura di questa neoplasia spesso sottovalutata dai clinici e dai patologi, che consentirebbe anche di migliorare drammaticamente la sua prognosi. Purtroppo la maggior parte della letteratura a riguardo dell'associazione SBA-MC è stata pubblicata riguarda casistiche degli anni '70 – '80 e primi anni'90, quando la celiachia aveva una presentazione clinica ed una epidemiologia completamente differente rispetto ai giorni nostri (56, 237-241). La stragrande maggioranza dei casi descritti in letteratura avevano una lunga storia di MC caratterizzata da sintomi classici quali diarrea e malassorbimento. I pazienti della nostra casistica, invece, sono stati tutti diagnosticati negli ultimi 20 anni e rispecchiano maggiormente quella che è la realtà al giorno d'oggi, caratterizzata dall'enorme aumento delle diagnosi di celiachia ed il cambiamento di presentazione clinica di questa condizione, attualmente in maggioranza con fenotipo non-classico e manifestazioni extraintestinali. Proprio per questo, mentre in passato l'SBA veniva sempre diagnosticato in soggetti celiaci con una lunga storia di sintomi classici quali diarrea e malassorbimento, la nostra casistica mostra che sono presenti casi con

sintomatologia non classica e sintomi extraintestinali quali ad esempio anemia sideropenica. La presentazione clinica della malattia celiaca associata a SBA nei nostri 5 casi non sembra essere legata ad un fenotipo particolare secondo la classificazione di Oslo: infatti erano presenti sia pazienti con sintomatologia classica (3 pazienti) che non classica (2 pazienti). Questo fa sorgere numerosi interrogativi su quanto approfondito debba essere lo studio ed il follow-up di un paziente celiaco diagnosticato in età avanzata, poiché anche i pazienti senza sintomi intestinali possono comunque presentare un SBA in stadio iniziale. Purtroppo al momento non sono disponibili linee guida di indirizzo su come gestire il follow-up dei pazienti con malattia celiaca di lunga data non trattata (245). Nonostante ciò, sarà fondamentale che sia i clinici che i patologi considerino sempre la MC nella diagnosi differenziale dei pazienti con adenomi del piccolo intestino o carcinomi.

Ulteriore dato di assoluta novità emerso dallo studio, riguarda la più frequente incidenza di SBA nel sesso femminile (tutti e 5 i casi nel nostro studio), infatti in letteratura è riportata una maggior frequenza di casi nella popolazione maschile (238). Ciò distinguerebbe l'SBA associato a MC dagli altri SBA sporadici o associati ad altre condizioni ed il motivo di tale inversione di tendenza potrebbe essere dovuto alla maggior incidenza di celiachia nel sesso femminile. Cosa ancor più interessante è che tutti i nostri casi erano portatori di un HLA-DQ2, di cui un caso con omozigosi. Alcuni lavori in letteratura suggeriscono infatti che le complicanze siano più frequenti nei soggetti con un DQ2 omozigote (236), ma questo non sembra essere il caso dell'SBA, che comunque mostra una spiccata associazione con l'HLA DQ2 e non con il DQ8. In nessuno dei 5 casi lo SBA è stato preceduto da una malattia celiaca refrattaria, confermando i dati della letteratura che

dimostrano che la malattia celiaca refrattaria predispone allo sviluppo del linfoma intestinale, ma non del SBA (236). Ulteriore dato emerso riguarda l'età media inferiore rispetto agli SBA non associati a MC 53 anni vs 63 anni, e il rischio di sviluppo di un SBA sembra essere maggiore nei pazienti con una malattia celiaca di vecchia data e non riconosciuta. Nella nostra casistica, infatti, una paziente aveva avuto una diagnosi di celiachia in giovane età ma non aveva seguito una dieta aglutinata stretta fino alla diagnosi di SBA, occorsa dopo oltre 20 anni. Come descritto in altri case report presenti in letteratura, la diagnosi di celiachia in quasi tutti i nostri pazienti (4/5) è stata eseguita in contemporanea con la diagnosi di SBA (237-241). E' quindi possibile ipotizzare che l'esecuzione di una dieta aglutinata stretta possa ridurre drasticamente l'aumentato rischio di SBA dei pazienti con MC. Uno screening di routine per SBA nei pazienti celiaci non è attualmente raccomandato, ma a nostro avviso è fondamentale eseguirlo in tutti quei soggetti celiaci che presentino sintomi di ostruzione, calo ponderale o dolore addominale. Qualora venga riscontrato un SBA, un approccio aggressivo sia chirurgico che medico è giustificato, stante la buona sopravvivenza a 5 anni. Viceversa, anche nei pazienti operati per un qualsiasi SBA dovrebbe essere esclusa la presenza di una malattia celiaca mediante la valutazione istologica dei pezzi anatomici asportati durante l'intervento, l'esecuzione dei test sierologici ed eventualmente anche una biopsia intraoperatoria del duodeno. Tale condotta è giustificata in quanto la diagnosi di celiachia è spesso effettuata successivamente o contemporaneamente a quella della neoplasia e la dieta aglutinata potrebbe sicuramente ridurre il rischio di morbidità intestinale post-operatoria. Nonostante ciò, non è ancora chiaro se l'inizio di una dieta aglutinata possa prevenire anche una eventuale ricaduta di malattia neoplastica e ulteriori studi saranno necessari per approfondire questo aspetto.

Altra caratteristica peculiare del SBA associato a MC riguarda la localizzazione delle lesioni neoplastiche che risulta essere differente rispetto ai casi non associati a MC. Nella nostra casistica la localizzazione più frequente è risultata essere il digiuno in 4 casi su cinque. In letteratura è descritto come i casi di SBA associati a Morbo di Crohn siano più frequenti nell'ileo, mentre nei casi di SBA sporadico la localizzazione più frequente risulta essere quella duodenale (6). Ulteriore nuovo dato emerso dal nostro studio, e che sottolinea un'ulteriore differenza con gli SBA associati a Morbo di Crohn, risulta essere l'assenza di marker istopatologici di tipo gastrico (MUC5AC e MUC6). L'assenza di marker di tipo gastrico associata a positività per CDX2 (presente in 4 casi su 5) come noto dalla letteratura, indirizza verso una neoplasia meno aggressiva e con migliore prognosi (246). In questo senso l'SBA associato a MC potrebbe essere una variante meno aggressiva e con più possibilità di cura e tale possibilità è suggerita anche dalla sopravvivenza dei pazienti del nostro studio. Infatti ben 3 pazienti su 5 sono ancora in vita dopo oltre 5 anni di follow-up ed un quarto è andato incontro ad exitus al quinto anno di malattia. Le due pazienti decedute per la malattia erano state entrambe diagnosticate in stadio IV, ma hanno mostrato una sopravvivenza molto differente. La prima con una neoplasia CDX2 positiva, nonostante la presenza di una malattia in IV stadio con metastasi multiple è sopravvissuta 5 anni. La seconda, invece, con analoga stadiazione di malattia ma con una neoplasia CDX2 negativa, è andata incontro ad exitus dopo 13 mesi dalla diagnosi. La sopravvivenza degli SBA associati a MC con positività per CDX2 sono straordinariamente migliori rispetto ai casi di SBA sporadici ed associati a M. di Crohn che mostrano una sopravvivenza media a 5 anni del 14-30% (6). Da ultimo lo studio di marcatori genetici quali KRAS, BRAF e NRAS possono essere importanti indicatori prognostici per i pazienti celiaci con SBA, consentendo

la possibile esecuzione di trattamenti medici individualizzati. Il nostro studio ha identificato la presenza di mutazione del gene KRAS due neoplasie. La presenza di un sottogruppo di neoplasie con mutazioni del KRAS può avere importanti ricadute terapeutiche, in particolare sull'utilizzo di anticorpi monoclonali quali Bevacizumab e Cetuximab, consentendo un ulteriore miglioramento della prognosi in questa sottocategoria di pazienti.

In conclusione, i soggetti che hanno un SBA associato a celiachia sembrano avere una migliore sopravvivenza rispetto a quelli con SBA sporadico. Tale prognosi potrebbe essere ulteriormente migliorabile con una maggiore attenzione della comunità scientifica verso l'associazione MC-SBA, consentendo di diagnosticare la malattia in stadi precoci. Nonostante lo stretto legame fra fattori ambientali quali la dieta e la patogenesi del carcinoma possano essere sicuramente accentuate nella popolazione celiaca, i nostri risultati possono essere di rilevanza in altri tipi di neoplasie gastrointestinali come i tumori del colon retto o dello stomaco. Ulteriori studi saranno necessari per chiarire quale sia la verità e come mai neoplasie istologicamente molto simili come gli SBA abbiano prognosi, epidemiologia, localizzazione e possibilità terapeutiche così differenti.

APPENDICE

TABELLE

Tabella 1 – Mutazioni riscontrate nell’Adenocarcinoma del tenue (SBA)

	N.pazienti	Anormalità p53	Alterazioni β -catenina	Overespressione HER2	Mutazione APC	Mutazione KRAS	Fenotipo dMMR
Wheeler et al. (27)	21	24%	48%		0%		5%
Arai et al. (28)	15	27%			8%	53%	
Blaker et al. (29)	17				18%		12%
Aparicio et al. (30)	63	42%	20%	3.9%		43%	14%
Svrcek et al. (32)	27	52%	7.4%				7%
Overman et al. (33)	54			1.7%			35%
Blaker et al. (34)	21		24%		10%	57%	
Planck et al. (38)	89						18%

Riadattato da Aparicio et. al 2014 Dig Liver Dis

Tabella 2 Confronto degli esami strumentali utilizzati nel work-up diagnostico di una sospetta neoplasia del piccolo intestino

Esame	Vantaggi	Svantaggi
RX diretto dell'addome	Può mostrare un'ostruzione e perforazioni	Non specifico
Rx prime vie del tubo digerente e pasto frazionato del tenue con bario	Può mostrare masse, difetti di mucosa o intussuscezioni	Non studia nulla di extraluminale; non utile nella stadiazione
EnteroTc/ EnteroRM	Molto più sensibili e specifiche del pasto frazionato	Possono richiedere il posizionamento di un endoscopio fino al duodeno
TC	Consente la stadiazione; può aiutare nella diagnosi del tipo di tumore	Non visualizza il lume e la superficie mucosale
EGDS	Visualizzazione diretta della superficie mucosale del duodeno; consente di biopsiare ed effettuare polipectomie	Invasivo e giunge al massimo fino al duodeno
Enteroscopia Push	Consente di visualizzare il digiuno prossimale e di effettuare biopsie	Invasivo, non permette la visualizzazione di tutto il piccolo intestino
Enteroscopia con doppio pallone	Consente la teorica visualizzazione di tutto il piccolo intestino con possibilità di biopsiare ed effettuare manovre interventive	Invasivo; disponibile solo in pochi centri. Rischio di complicanze quali perforazione o pancreatite
Videocapsula	Non invasivo, consente la visualizzazione di tutto l'intestino	Non consente di effettuare biopsie o manovre interventive. Non eseguibile se sospettata ostruzione

Tabella 3 Stadiazione TNM per i tumori dell'intestino tenue

Primary tumor (T)			
TX	Primary tumor cannot be assessed		
T0	No evidence of primary tumor		
Tis	Carcinoma in situ		
T1a	Tumor invades lamina propria		
T1b	Tumor invades submucosa		
T2	Tumor invades muscularis propria		
T3	Tumor invades through the muscularis propria into the subserosa or into the nonperitonealized perimuscular tissue (mesentery or retroperitoneum) with extension 2 cm or less*		
T4	Tumor perforates the visceral peritoneum or directly invades other organs or structures (includes other loops of small intestine, mesentery, or retroperitoneum more than 2 cm, and abdominal wall by way of serosa; for the duodenum only, invasion of pancreas or bile duct)		
Regional lymph nodes (N)			
NX	Regional lymph nodes cannot be assessed		
N0	No regional lymph node metastasis		
N1	Metastasis in 1-3 regional lymph nodes		
N2	Metastasis in four or more regional lymph nodes		
Distant metastasis (M)			
M0	No distant metastasis		
M1	Distant metastasis		
Anatomic stage/prognostic groups			
Stage 0	Tis	N0	M0
Stage I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
Stage IIA	T3	N0	M0
Stage IIB	T4	N0	M0
Stage IIIA	Any T	N1	M0
Stage IIIB	Any T	N2	M0
Stage IV	Any T	Any N	M1

Riadattato da AJCC Cancer Staging Manual, Seventh Edition (2010) published by Springer New York, Inc.

Tabella 4 Rischio di neoplasie nella Malattia Celiaca

Tipo di neoplasia	n. di studi	n. di pazienti celiaci	n. di pazienti con neoplasia	Odds ratio	I²(%)	P
Tutte le neoplasie	14	55.504	2558	1.25 (1.09-1.44)	82,6	<0.001
Neoplasie GI	12	85.698	995	1.60 (1.39-1.84)	34	0.118
Esofago	8	79.365	67	3.72 (1.90-7.28)	82	<0.001
Stomaco	6	81.088	97	1.53 (0.96-2.44)	68,9	0.007
Intestino tenue	8	79.991	75	14.4 (5.53-37.60)	90.5	<0.001
Colon	8	80.688	340	1.15 (0.86-1.56)	57,6	0.021
Retto	5	78.339	120	0.90 (0.71-1.14)	0	0.505
Fegato	4	76.342	98	2.16 (0.94-4.96)	76,2	0.006
Pancreas	6	78.339	143	1.51 (0.76-2.99)	73	0.002

Riadattato da Yuehua Han et. al Medicine 2015

Tabella 5 Classificazione di Marsh-Oberhuber

Classificazione di Marsh-Oberhuber						
	Tipo 0	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3a	Tipo 3b	Tipo 3c
LIE	<25	>25	>25	>25	>25	>25
Cripte	Normali	Normali	Ipertrofiche	Ipertrofiche	Ipertrofiche	Ipertrofiche
Villi	Normali	Normali	Normali	Atrofia lieve	Atrofia parziale	Atrofia subtotale
Villi/Cripte	>3:1	>3.1	>3:1	<3:1	<3:1	<3:1
LIE: linfociti intraepiteliali. Lesione Tipo 4: atrofia totale dei villi con assenza di LIE, espressione di celiachia con complicanze, di raro riscontro.						

Tabella 6 Confronto fra le 2 classificazioni per la biopsia duodenale

Classificazione istologica di Marsh-Oberhuber	Classificazione istologica di Corazza-Villanacci
Lesione tipo 1	Grado A Non atrofia
Lesione tipo 2	
Lesione tipo 3a	Grado B1 Atrofia parziale
Lesione tipo 3b	
Lesione tipo 3c	Grado B2 Atrofia totale
Lesione tipo 4	

IMMAGINI

Immagine 1- Positività immunoistochimica per CDX2 nel contesto di un SBA G2 caratterizzato da cellule tubulari e cribriformi, pseudostratificazione dei nuclei e orletto a spazzola.

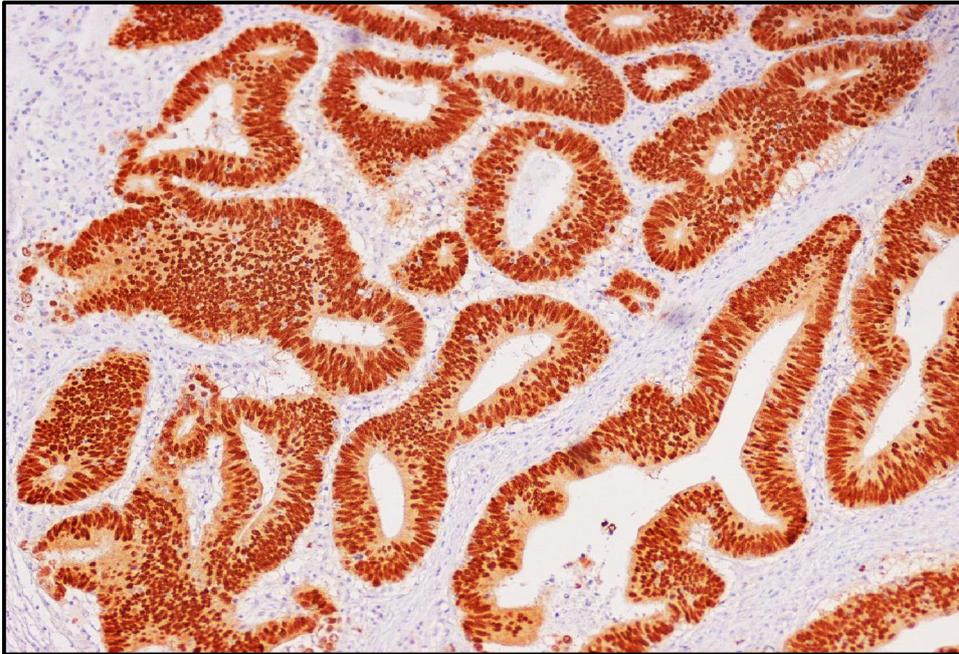


Immagine 2 – Positività immunoistochimica per CD10 nel contesto di un SBA G2 caratterizzato da cellule tubulari e cribriformi, pseudostratificazione dei nuclei e orletto a spazzola.

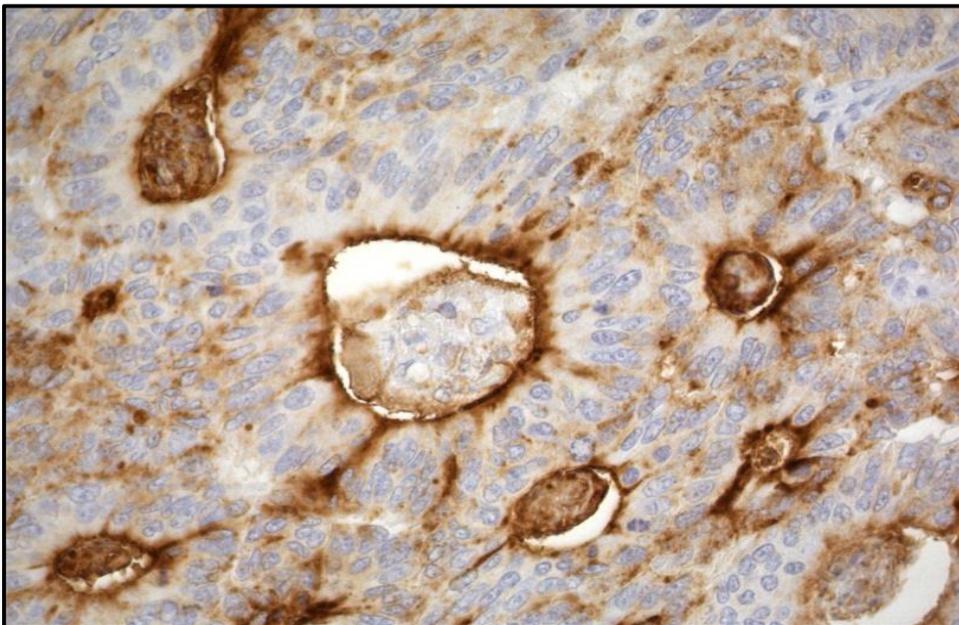


Immagine 3 – Positività immunoistochimica per MUC2 nel contesto di un SBA G2 caratterizzato da cellule tubulari e cribriformi, pseudostratificazione dei nuclei e orletto a spazzola

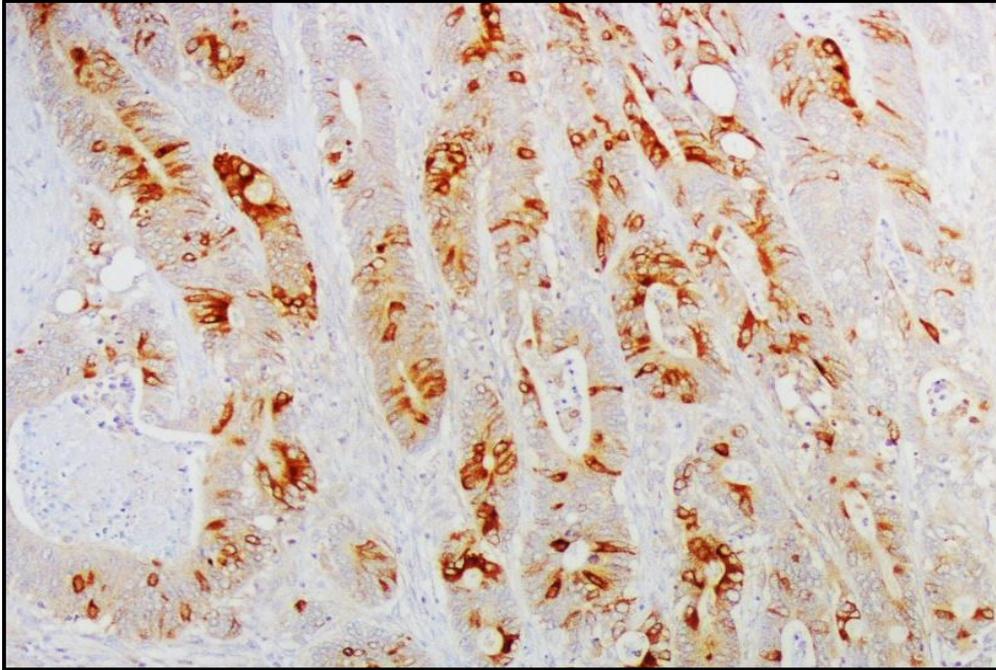


Immagine 4 - Positività immunoistochimica per MUC6 nel contesto di un SBA G2 caratterizzato da cellule tubulari e cribriformi, pseudostratificazione dei nuclei e orletto a spazzola

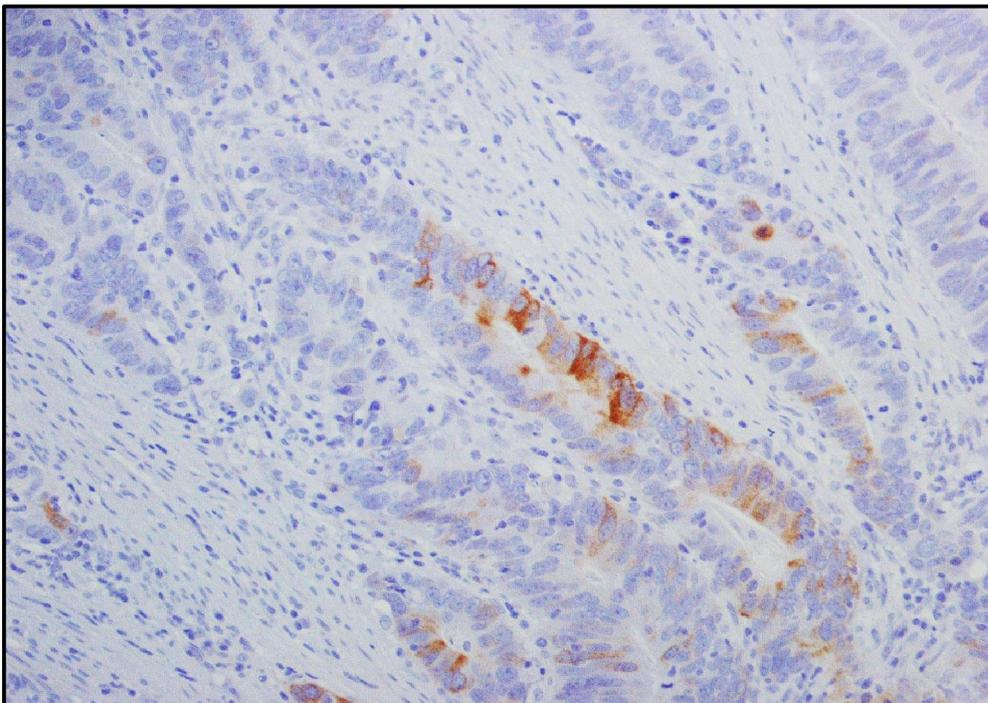


Immagine 5 – Positività per MUC5AC di una zona di metaplasia foveolare gastrica nel contesto di un SBA duodenale MUC5AC negativo

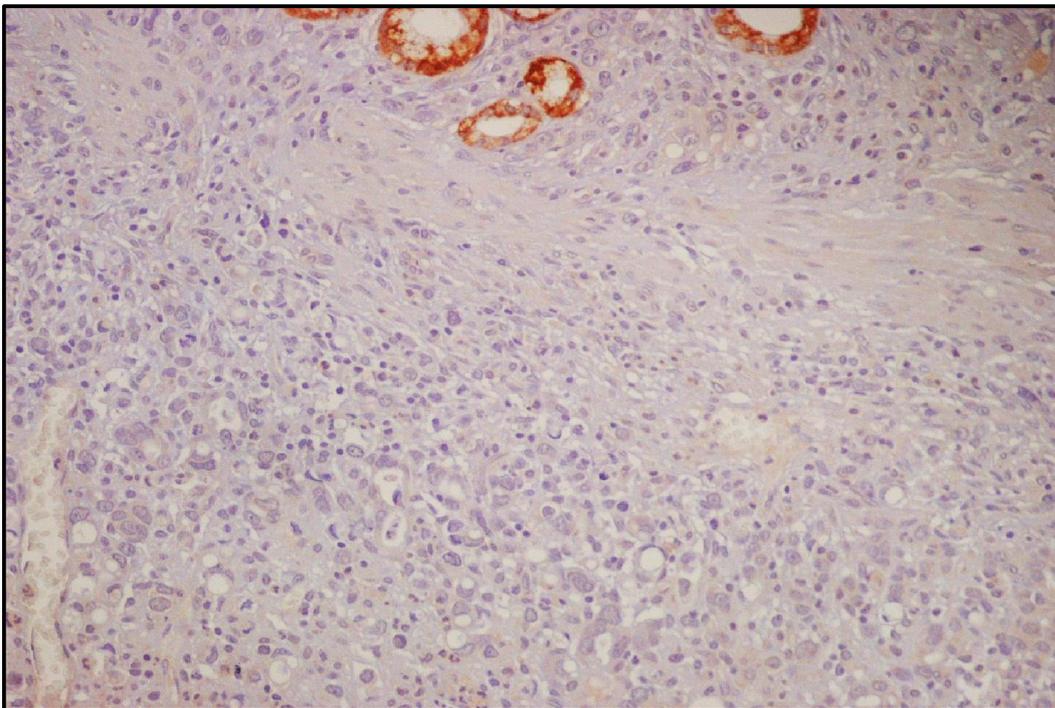


Immagine 6 – SBA di tipo intestinale G3 colorazione in ematossilina-eosina

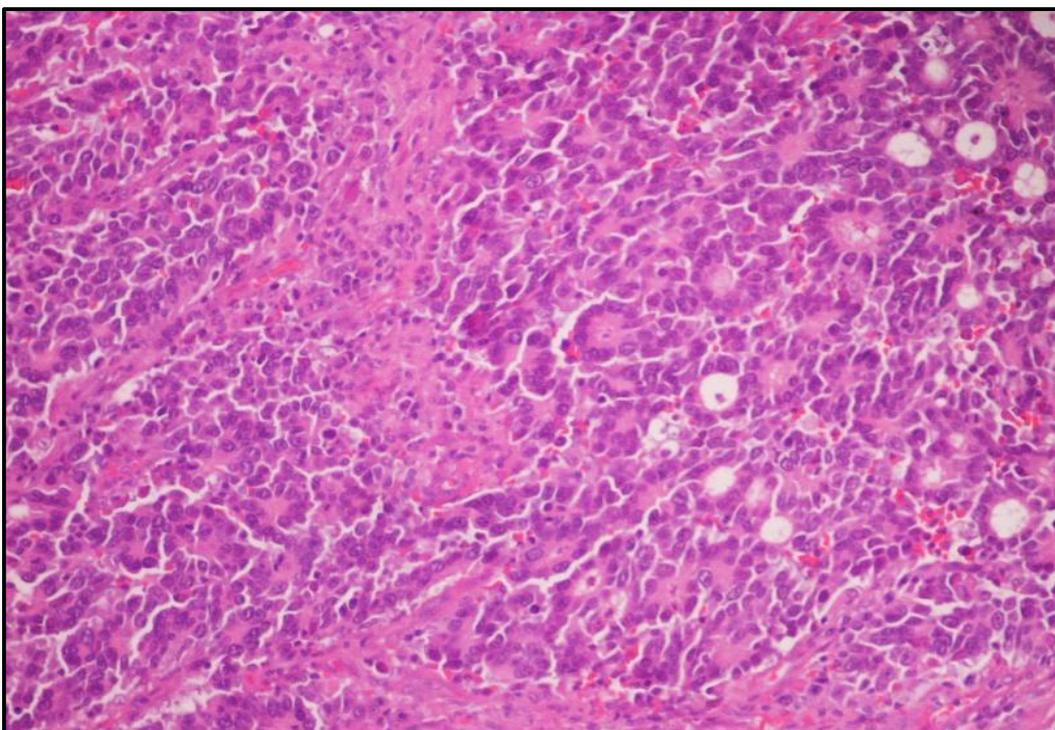


Immagine 7- Adenocarcinoma del tenue G4 scarsamente differenziato

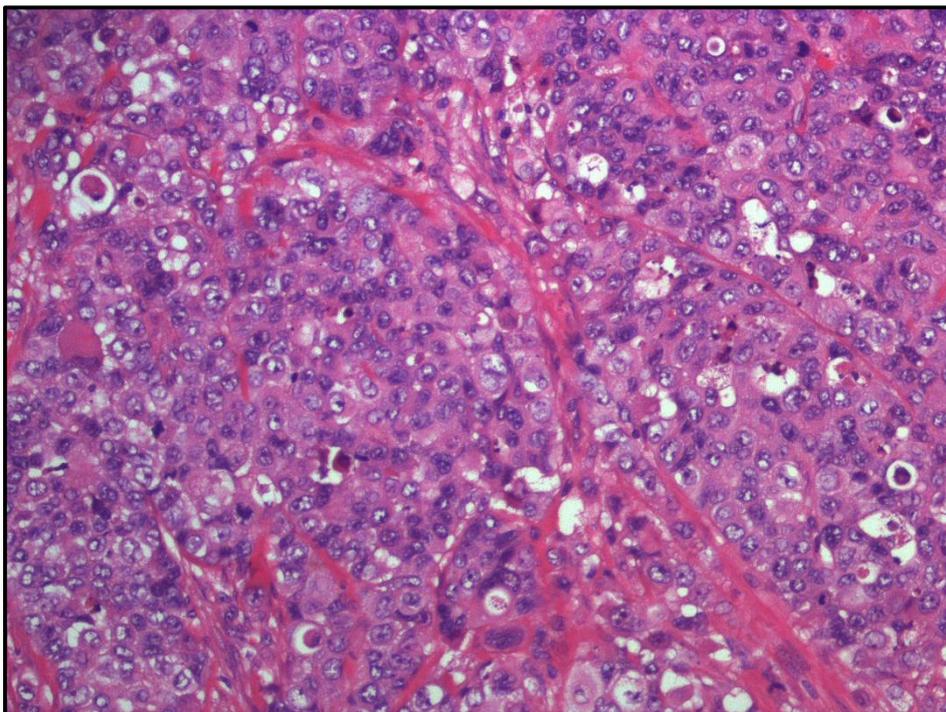
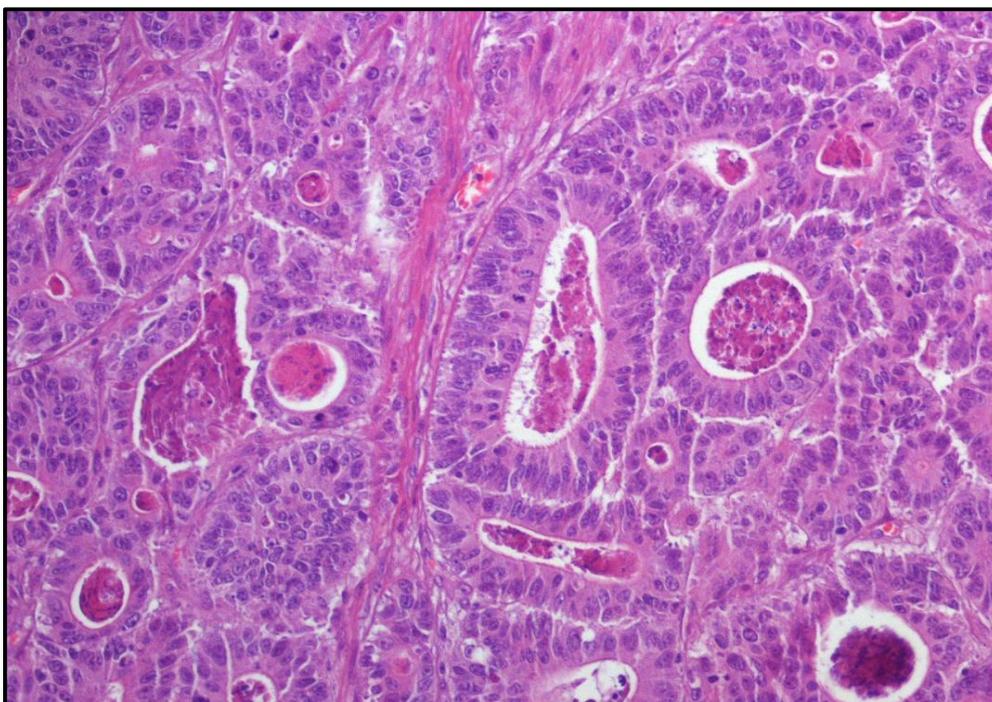


Immagine 8 -Adenocarcinoma del tenue G2 caratterizzato da cellule tubulari e cribriformi, pseudostratificazione dei nuclei e orletto a spazzola



RINGRAZIAMENTI

Desidero innanzitutto ringraziare il mio relatore Prof. Giovanni Barbara ed il Correlatore Prof. Umberto Volta per la disponibilità e la supervisione durante tutto il percorso di dottorato.

Ringrazio il Prof. Roberto De Giorgio per la guida ed i suggerimenti che mi ha fornito negli ultimi anni.

Ringrazio il Prof. Luigi Bolondi per avermi concesso la possibilità di portare avanti questo lavoro di ricerca e per la possibilità di afferire all'Ambulatorio Celiachia.

Ringrazio il Prof. Mauro Bernardi e tutto il Consiglio della Scuola di Specializzazione in Medicina Interna per avermi concesso la possibilità di eseguire questo percorso di Dottorato congiuntamente a quello della Specialità.

Ringrazio i precedenti Coordinatori della Scuola di Dottorato Prof. Andrea Stella e Prof. Mauro Gargiulo per avermi concesso l'onore di fare parte di questa Scuola.

Ringrazio il nuovo Coordinatore Prof.ssa Annalisa Patrizi e tutto il Consiglio della Scuola di Dottorato in Scienze Chirurgiche, in particolare il Prof. Massimo Campieri, per avermi ammesso all'esame finale in questa sessione.

Ringrazio la Dott.ssa Donatella Santini per aver messo a disposizione le biopsie che hanno permesso la realizzazione dello studio.

Ringrazio il Dott. Alessandro Vanoli per le analisi istologiche e per le analisi genetico-molecolari.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Reynolds I, Healy P, Mcnamara DA. Malignant tumours of the small intestine. *Surgeon*. 2014;12:263-70.
- 2) Xynopoulos D, Mihas AA, Paraskevas E, Dimitroulopoulos D, Heuman DM. Small bowel tumors. *Annals of Gastroenterology* 2002;15:18-35.
- 3) Neugut AI, Jacobson JS, Suh S, et al. The epidemiology of cancer of the small bowel. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 1998;7:243–51.
- 4) Fonte: Surveillance, Epidemiology, and End Results Program, 1975-2005, Division of Cancer Control and Population Sciences, National Cancer Institute, 2008.
- 5) Haselkorn T, Whittemore AS, Lilienfeld DE. Incidence of small bowel cancer in the United States and worldwide: geographic, temporal, and racial differences. *Cancer Causes Control*. 2005; 16:781-7.
- 6) Aparicio T, Zaanani A, Svrcek M, Laurent-Puig P, Carrere N, Manfredi S, Locher C, Afchain P. Small bowel adenocarcinoma: epidemiology, risk factors, diagnosis and treatment. *Dig Liver Dis*. 2014;46:97-104.
- 7) Neugut AI, Marvin MR, Rella VA, Chabot JA. An overview of adenocarcinoma of the small intestine. *Oncology*. 1997;11:529–36.
- 8) Abraham J, Gulley JL, Allegra CJ. *Handbook of clinical oncology* 3rd Edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2010, Philadelphia.
- 9) Arai M, Shimizu S, Imai Y, et al. Mutations of the Ki-ras, p53 and APC genes in adenocarcinomas of the human small intestine. *Int J Cancer*. 1997; 70:390-5.

- 10) Wheeler JM, Warren BF, Mortensen NJ, et al. An insight into the genetic pathway of adenocarcinoma of the small intestine. *Gut*. 2002;50:218-23.
- 11) Svrcek M, Jourdan F, Sebbagh N, et al. Immunohistochemical analysis of adenocarcinoma of the small intestine: a tissue microarray study. *J Clin Pathol*. 2003;56:898-903.
- 12) Blaker H, von Herbay A, Penzel R, et al. Genetics of adenocarcinomas of the small intestine: frequent deletions at chromosome 18q and mutations of the SMAD4 gene. *Oncogene*. 2002;21:158-64.
- 13) Bilimoria KY, Bentrem DJ, Wayne JD, et al. Small bowel cancer in the United States: changes in epidemiology, treatment, and survival over the last 20 years. *Annals of Surgery* 2009;249:63–71.
- 14) Lepage C, Bouvier AM, Manfredi S, et al. Incidence and management of primary malignant small bowel cancers: a well-defined French population study. *The American Journal of Gastroenterology* 2006;101:2826–32.
- 15) Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2008;58:71–96.
- 16) Kummar S, Ciesielski TE, Fogarasi MC. Management of small bowel adenocarcinoma. *Oncology (Williston Park)* 2002;16:1364–9.
- 17) Faivre J, Trama A, De Angelis R, et al. Incidence, prevalence and survival of patients with rare epithelial digestive cancers diagnosed in Europe in 1995–2002. *European Journal of Cancer* 2012;48:1417–24.
- 18) Dabaja BS, Suki D, Pro B, Bonnen M, Ajani J. Adenocarcinoma of the small bowel: presentation, prognostic factors, and outcome of 217 patients. *Cancer* 2004;101:518–26.

- 19) Howe JR, Karnell LH, Menck HR, et al. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. Adenocarcinoma of the small bowel: review of the National Cancer Data Base, 1985–1995. *Cancer* 1999;86:2693–706.
- 20) Moon YW, Rha SY, Shin SJ, et al. Adenocarcinoma of the small bowel at a single Korean institute: management and prognosticators. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2010;136:387–94.
- 21) Wu AH, Yu MC, Smoking Mack TM. alcohol use, dietary factors and risk of small intestinal adenocarcinoma. *International Journal of Cancer* 1997;70:512–7.
- 22) Kaerlev L, Teglbaerg PS, Sabroe S, et al. Is there an association between alcohol intake or smoking and small bowel adenocarcinoma? Results from a European multi-center case-control study. *Cancer Causes Control* 2000;11:791–7.
- 23) Chow WH, Linet MS, McLaughlin JK, et al. Risk factors for small intestine cancer. *Cancer Causes Control* 1993;4:163–9.
- 24) Negri E, Bosetti C, La Vecchia C, et al. Risk factors for adenocarcinoma of the small intestine. *International Journal of Cancer* 1999;82:171–4.
- 25) Schottenfeld D, Beebe-Dimmer JL, Vigneau FD. The epidemiology and pathogenesis of neoplasia in the small intestine. *Annals of Epidemiology* 2009;19:58–69.
- 26) Delaunoy T, Neczyporenko F, Limburg PJ, et al. Pathogenesis and risk factors of small bowel adenocarcinoma: a colorectal cancer sibling. *The American Journal of Gastroenterology* 2005;100:703–10.

- 27) Wheeler JM, Warren BF, Mortensen NJ, et al. An insight into the genetic pathway of adenocarcinoma of the small intestine. *Gut* 2002;50:218–23.
- 28) Arai M, Shimizu S, Imai Y, et al. Mutations of the Ki-ras, p53 and APC genes in adenocarcinomas of the human small intestine. *International Journal of Cancer* 1997;70:390–5.
- 29) Blaker H, von Herbay A, Penzel R, et al. Genetics of adenocarcinomas of the small intestine: frequent deletions at chromosome 18q and mutations of the SMAD4 gene. *Oncogene* 2002;21:158–64.
- 30) Aparicio T, Svrcek M, laforest A, et al. Small bowel adenocarcinoma phenotype according to the primary localisation. *Annals of Oncology* 2012;23, ix234.
- 31) Breuhahn K, Singh S, Schirmacher P, et al. Large-scale N-terminal deletions but not point mutations stabilize beta-catenin in small bowel carcinomas, suggesting divergent molecular pathways of small and large intestinal carcinogenesis. *The Journal of Pathology* 2008;215:300–7.
- 32) Svrcek M, Jourdan F, Sebbagh N, et al. Immunohistochemical analysis of adenocarcinoma of the small intestine: a tissue microarray study. *Journal of Clinical Pathology* 2003;56:898–903.
- 33) Overman MJ, Pozadzides J, Kopetz S, et al. Immunophenotype and molecular characterisation of adenocarcinoma of the small intestine. *British Journal of Cancer* 2010;102:144–50.
- 34) Blaker H, Helmchen B, Bonisch A, et al. Mutational activation of the RAS-RAFMAPK and the Wnt pathway in small intestinal adenocarcinomas. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 2004;39:748–53.

- 35) Fu T, Guzzetta AA, Jeschke J, et al. KRAS G>A mutation favors poor tumor differentiation but may not be associated with prognosis in patients with curatively resected duodenal adenocarcinoma. *International Journal of Cancer* 2012.
- 36) Zaanan A, Meunier K, Sangar F, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer: from molecular oncogenic mechanisms to clinical implications. *Cellular Oncology (Dordrecht)* 2011;34:155–76.
- 37) Aparicio T, Schischmanoff O, Poupardin C, et al. Deficient mismatch repair phenotype is a prognostic factor for colorectal cancer in elderly patients. *Digestive and Liver Disease* 2012.
- 38) Planck M, Ericson K, Piotrowska Z, et al. Microsatellite instability and expression of MLH1 and MSH2 in carcinomas of the small intestine. *Cancer* 2003;97:1551–7.
- 39) Warth A, Kloor M, Schirmacher P, et al. Genetics and epigenetics of small bowel adenocarcinoma: the interactions of CIN, MSI, and CIMP. *Modern Pathology* 2011;24:564–70.
- 40) Jagelman DG, DeCosse JJ, Bussey HJ. Upper gastrointestinal cancer in familial adenomatous polyposis. *Lancet* 1988;1:1149–51.
- 41) Offerhaus GJ, Giardiello FM, Krush AJ, et al. The risk of upper gastrointestinal cancer in familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 1992;102:1980–2.
- 42) Bulow S, Alm T, Fausa O, et al. Duodenal adenomatosis in familial adenomatous polyposis. DAF Project Group. *International Journal of Colorectal Disease* 1995;10:43–6.

- 43) Vasen HF, Bulow S, Myrholm T, et al. Decision analysis in the management of duodenal adenomatosis in familial adenomatous polyposis. *Gut* 1997;40:716–9.
- 44) Watson P, Lynch HT. Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer* 1993;71:677–85.
- 45) Vasen HF, Wijnen JT, Menko FH, et al. Cancer risk in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer diagnosed by mutation analysis. *Gastroenterology* 1996;110:1020–7.
- 46) Aarnio M, Mecklin JP, Aaltonen LA, et al. Life-time risk of different cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome. *International Journal of Cancer* 1995;64:430–3.
- 47) Bonadona V, Bonaiti B, Olschwang S, et al. Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in Lynch syndrome. *Journal of the American Medical Association* 2011;305:2304–10.
- 48) Babba T, Schischmanoff O, Lagorce C, et al. Small bowel carcinoma revealing HNPCC syndrome. *Gastroentérologie Clinique et Biologique* 2010;34:325–8.
- 49) Schulmann K, Brasch FE, Kunstmann E, et al. HNPCC-associated small bowel cancer: clinical and molecular characteristics. *Gastroenterology* 2005;128:590–9.
- 50) Giardiello FM, Brensinger JD, Tersmette AC, et al. Very high risk of cancer in familial Peutz–Jeghers syndrome. *Gastroenterology* 2000;119:1447–53.

- 51) Bernstein CN, Blanchard JF, Kliewer E, et al. Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer* 2001;91:854–62.
- 52) Jess T, Loftus Jr EV, Velayos FS, et al. Risk of intestinal cancer in inflammatory bowel disease: a population-based study from olmsted county, Minnesota. *Gastroenterology* 2006;130:1039–46.
- 53) Palascak-Juif V, Bouvier AM, Cosnes J, et al. Small bowel adenocarcinoma in patients with Crohn’s disease compared with small bowel adenocarcinoma de novo. *Inflammatory Bowel Diseases* 2005;11:828–32.
- 54) Shaukat A, Virnig DJ, Howard D, et al. Crohn’s disease and small bowel adenocarcinoma: a population-based case–control study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2011;20:1120–3.
- 55) Piton G, Cosnes J, Monnet E, et al. Risk factors associated with small bowel adenocarcinoma in Crohn’s disease: a case-control study. *The American Journal of Gastroenterology* 2008;103:1730–6.
- 56) Volta U, Caio G, Stanghellini V, De Giorgio R. The changing clinical profile of celiac disease: a 15-year experience (1998-2012) in an Italian referral center. *BMC Gastroenterol.* 2014;14:194.
- 57) Malamut G, Cellier C. Complications of coeliac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2015;29:451-8.
- 58) Han Y, Chen W, Li P, Ye J. Association Between Coeliac Disease and Risk of Any Malignancy and Gastrointestinal Malignancy: A Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore).* 2015;94:e1612.
- 59) Malignancy in adult celiac disease. Freeman HJ. *World J Gastroenterol.* 2009;15:1581-3.

- 60) Swinson CM, Slavin G, Coles EC, et al. Coeliac disease and malignancy. *Lancet* 1983;1:111–5.
- 61) Howdle PD, Jalal PK, Holmes GK, et al. Primary small-bowel malignancy in the UK and its association with coeliac disease. *Quarterly Journal of Medicine* 2003;96:345–53.
- 62) Askling J, Linet M, Gridley G, et al. Cancer incidence in a population-based cohort of individuals hospitalized with celiac disease or dermatitis herpetiformis. *Gastroenterology* 2002;123:1428–35.
- 63) International Rare Cancers Initiative - Small Bowel Adenocarcinoma Group meeting http://www.eortc.org/irci/wpcontent/uploads/2015/09/small_bowelasco2014.pdf
- 64) Talamonti MS, Goetz LH, Rao S, et al. Primary cancers of the small bowel: analysis of prognostic factors and results of surgical management. *Archives of Surgery* 2002;137:564–70.
- 65) Maglinte DD, O'Connor K, Bessette J, et al. The role of the physician in the late diagnosis of primary malignant tumors of the small intestine. *Am J Gastroenterol* 1991; 86:304.
- 66) Ross A, Mehdizadeh S, Tokar J, et al. Double balloon enteroscopy detects small bowel mass lesions missed by capsule endoscopy. *Dig Dis Sci* 2008; 53:2140.
- 67) Yamagami H, Oshitani N, Hosomi S, et al. Usefulness of double-balloon endoscopy in the diagnosis of malignant small-bowel tumors. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; 6:1202.
- 68) Bessette JR, Maglinte DD, Kelvin FM, Chernish SM. Primary malignant tumors in the small bowel: a comparison of the small-bowel enema and

conventional follow-through examination. *AJR Am J Roentgenol* 1989; 153:741.

69) Bruneton JN, Drouillard J, Bourry J, et al. [Adenocarcinoma of the small intestine. Current state of diagnosis and treatment. A study of 27 cases and a review of the literature]. *J Radiol* 1983; 64:117.

70) Vuori JV. Primary malignant tumours of the small intestine. Analysis of cases diagnosed in Finland, 1953-1962. *Acta Chir Scand* 1971; 137:555.

71) Boudiaf M, Jaff A, Soyer P, et al. Small-bowel diseases: prospective evaluation of multi-detector row helical CT enteroclysis in 107 consecutive patients. *Radiology* 2004; 233:338.

72) Minardi AJ Jr, Zibari GB, Aultman DF, et al. Small-bowel tumors. *J Am Coll Surg* 1998; 186:664.

73) Laurent F, Raynaud M, Biset JM, et al. Diagnosis and categorization of small bowel neoplasms: role of computed tomography. *Gastrointest Radiol* 1991; 16:115.

74) Buckley JA, Siegelman SS, Jones B, et al. The accuracy of CT staging of small bowel adenocarcinoma: CT/pathologic correlation. *Journal of Computer Assisted Tomography* 1997;21:986–91.

75) Horton KM, Fishman EK. The current status of multidetector row CT and three-dimensional imaging of the small bowel. *Radiologic Clinics of North America* 2003;41:199–212.

76) Horton KM, Fishman EK. Multidetector-row computed tomography and 3-dimensional computed tomography imaging of small bowel neoplasms: current concept in diagnosis. *J Comput Assist Tomogr* 2004; 28:106.

- 77) Levy AD, Remotti HE, Thompson WM, et al. Gastrointestinal stromal tumors: radiologic features with pathologic correlation. *Radiographics* 2003; 23:283.
- 78) Paulsen SR, Huprich JE, Fletcher JG, et al. CT enterography as a diagnostic tool in evaluating small bowel disorders: review of clinical experience with over 700 cases. *Radiographics* 2006; 26:641.
- 79) Pilleul F, Penigaud M, Milot L, et al. Possible small-bowel neoplasms: contrast-enhanced and water-enhanced multidetector CT enteroclysis. *Radiology* 2006; 241:796.
- 80) Van Weyenberg SJ, Meijerink MR, Jacobs MA, et al. MR enteroclysis in the diagnosis of small-bowel neoplasms. *Radiology* 2010; 254:765.
- 81) Masselli G, Poletini E, Casciani E, et al. Small-bowel neoplasms: prospective evaluation of MR enteroclysis. *Radiology* 2009; 251:743.
- 82) Pappalardo G, Gualdi G, Nunziale A, et al. Impact of magnetic resonance in the preoperative staging and the surgical planning for treating small bowel neoplasms. *Surg Today* 2013; 43:613.
- 83) Cronin CG, Scott J, Kambadakone A, et al. Utility of positron emission tomography/CT in the evaluation of small bowel pathology. *Br J Radiol* 2012; 85:1211.
- 84) Watanabe N, Hayashi S, Kato H, et al. FDG-PET imaging in duodenal cancer. *Ann Nucl Med* 2004; 18:351.
- 85) Sperti C, Pasquali C, Fiore V, et al. Clinical usefulness of 18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the management of patients with nonpancreatic periampullary neoplasms. *Am J Surg* 2006; 191:743.

- 86) Pennazio M, Spada C, Eliakim R, et al. Small-bowel capsule endoscopy and device-assisted enteroscopy for diagnosis and treatment of small-bowel disorders: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Clinical Guideline. *Endoscopy* 2015; 47:352.
- 87) Cobrin GM, Pittman RH, Lewis BS. Increased diagnostic yield of small bowel tumors with capsule endoscopy. *Cancer* 2006; 107:22.
- 88) Lewis BS, Eisen GM, Friedman S. A pooled analysis to evaluate results of capsule endoscopy trials. *Endoscopy* 2005; 37:960.
- 89) Kita H. Overview of deep small bowel enteroscopy. UpToDate 2015. http://www.uptodate.com/contents/overview-of-deep-small-bowel-enteroscopy?source=see_link
- 90) Fry LC, Bellutti M, Neumann H, et al. Incidence of bleeding lesions within reach of conventional upper and lower endoscopes in patients undergoing double-balloon enteroscopy for obscure gastrointestinal bleeding. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; 29:342.
- 91) ASGE TECHNOLOGY COMMITTEE, DiSario JA, Petersen BT, et al. Enteroscopes. *Gastrointest Endosc* 2007; 66:872.
- 92) Benz C, Jakobs R, Riemann JF. Do we need the overtube for push-enteroscopy? *Endoscopy* 2001; 33:658.
- 93) Taylor AC, Chen RY, Desmond PV. Use of an overtube for enteroscopy--does it increase depth of insertion? A prospective study of enteroscopy with and without an overtube. *Endoscopy* 2001; 33:227.
- 94) Ali R, Diehl D, Shieh F, et al. Deep enteroscopy with a conventional colonoscope: Initial multicenter study using the NaviAid balloon system. *Am J Gastroenterol* 2013; 108:S596.

- 95) Li X, Chen H, Dai J, et al. Predictive role of capsule endoscopy on the insertion route of double-balloon enteroscopy. *Endoscopy* 2009; 41:762.
- 96) Möschler O, May A, Müller MK, et al. Complications in and performance of double-balloon enteroscopy (DBE): results from a large prospective DBE database in Germany. *Endoscopy* 2011; 43:484.
- 97) Mensink PB, Haringsma J, Kucharzik T, et al. Complications of double balloon enteroscopy: a multicenter survey. *Endoscopy* 2007; 39:613.
- 98) Tsujikawa T, Saitoh Y, Andoh A, et al. Novel single-balloon enteroscopy for diagnosis and treatment of the small intestine: preliminary experiences. *Endoscopy* 2008; 40:11.
- 99) Kawamura T, Yasuda K, Tanaka K, et al. Clinical evaluation of a newly developed single-balloon enteroscope. *Gastrointest Endosc* 2008; 68:1112.
- 100) Upchurch BR, Sanaka MR, Lopez AR, Vargo JJ. The clinical utility of single-balloon enteroscopy: a single-center experience of 172 procedures. *Gastrointest Endosc* 2010; 71:1218.
- 101) Frantz DJ, Dellon ES, Grimm IS, Morgan DR. Single-balloon enteroscopy: results from an initial experience at a U.S. tertiary-care center. *Gastrointest Endosc* 2010; 72:422.
- 102) Ramchandani M, Reddy DN, Gupta R, et al. Diagnostic yield and therapeutic impact of single-balloon enteroscopy: series of 106 cases. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24:1631.
- 103) Takano N, Yamada A, Watabe H, et al. Single-balloon versus double-balloon endoscopy for achieving total enteroscopy: a randomized, controlled trial. *Gastrointest Endosc* 2011; 73:734.

- 104) Domagk D, Mensink P, Aktas H, et al. Single- vs. double-balloon enteroscopy in small-bowel diagnostics: a randomized multicenter trial. *Endoscopy* 2011; 43:472.
- 105) Aktas H, de Ridder L, Haringsma J, et al. Complications of single-balloon enteroscopy: a prospective evaluation of 166 procedures. *Endoscopy* 2010; 42:365.
- 106) Khashab MA, Lennon AM, Dunbar KB, et al. A comparative evaluation of single-balloon enteroscopy and spiral enteroscopy for patients with mid-gut disorders. *Gastrointest Endosc* 2010; 72:766.
- 107) Akerman PA, Agrawal D, Chen W, et al. Spiral enteroscopy: a novel method of enteroscopy by using the Endo-Ease Discovery SB overtube and a pediatric colonoscope. *Gastrointest Endosc* 2009; 69:327.
- 108) Buscaglia JM, Dunbar KB, Okolo PI 3rd, et al. The spiral enteroscopy training initiative: results of a prospective study evaluating the Discovery SB overtube device during small bowel enteroscopy (with video). *Endoscopy* 2009; 41:194.
- 109) Judah JR, Draganov PV, Lam Y, et al. Spiral enteroscopy is safe and effective for an elderly United States population of patients with numerous comorbidities. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010; 8:572.
- 110) Morgan D, Upchurch B, Draganov P, et al. Spiral enteroscopy: prospective U.S. multicenter study in patients with small-bowel disorders. *Gastrointest Endosc* 2010; 72:992.
- 111) Messer I, May A, Manner H, Ell C. Prospective, randomized, single-center trial comparing double-balloon enteroscopy and spiral enteroscopy in

patients with suspected small-bowel disorders. *Gastrointest Endosc* 2013; 77:241.

112) Akerman P, Contero D. Severe complications of spiral endoscopy in the first 1750 patients. *Gastrointest Endosc* 2009; 69:AB127.

113) Zaman A, Sheppard B, Katon RM. Total peroral intraoperative enteroscopy for obscure GI bleeding using a dedicated push enteroscope: diagnostic yield and patient outcome. *Gastrointest Endosc* 1999; 50:506.

114) Ress AM, Benacci JC, Sarr MG. Efficacy of intraoperative enteroscopy in diagnosis and prevention of recurrent, occult gastrointestinal bleeding. *Am J Surg* 1992; 163:94.

115) Talamonti MS, Goetz LH, Rao S, Joehl RJ. Primary cancers of the small bowel: analysis of prognostic factors and results of surgical management. *Arch Surg* 2002; 137:564.

116) Zhu L, Kim K, Domenico DR, et al. Adenocarcinoma of duodenum and ampulla of Vater: clinicopathology study and expression of p53, c-neu, TGF-alpha, CEA, and EMA. *J Surg Oncol* 1996; 61:100.

117) Overman MJ, Varadhachary GR, Kopetz S, Adinin R, Lin E, Morris JS, Eng C, Abbruzzese JL, Wolff RA. Phase II study of capecitabine and oxaliplatin for advanced adenocarcinoma of the small bowel and ampulla of Vater. *J Clin Oncol*. 2009;27:2598-603.

118) Zaanan A, Costes L, Gauthier M, et al. Chemotherapy of advanced smallbowel adenocarcinoma: a multicenter AGEO study. *Annals of Oncology* 2010;21:1786–93.

- 119) Dabaja BS, Suki D, Pro B, et al. Adenocarcinoma of the small bowel: presentation, prognostic factors, and outcome of 217 patients. *Cancer* 2004; 101:518.
- 120) Alvi MA, McArt DG, Kelly P, Fuchs MA, Alderdice M, McCabe CM, Bingham V, McGready C, Tripathi S, Emmert-Streib F, Loughrey MB, McQuaid S, Maxwell P, Hamilton PW, Turkington R, James JA, Wilson RH, Salto-Tellez M. Comprehensive molecular pathology analysis of small bowel adenocarcinoma reveals novel targets with potential for clinical utility. *Oncotarget*. 2015;6:20863-74.
- 121) Terada T. Malignant tumors of the small intestine: a histopathologic study of 41 cases among 1,312 consecutive specimens of small intestine. *Int J Clin Exp Pathol*. 2012;5:203-9.
- 122) Lee MJ, Lee HS, Kim WH, et al. Expression of mucins and cytokeratins in primary carcinomas of the digestive system. *Mod Pathol* 2003; 16:403.
- 123) Chen ZM, Wang HL. Alteration of cytokeratin 7 and cytokeratin 20 expression profile is uniquely associated with tumorigenesis of primary adenocarcinoma of the small intestine. *Am J Surg Pathol* 2004; 28:1352.
- 124) AJCC (American Joint Committee on Cancer) Cancer Staging Manual, 7th ed, Edge, SB, Byrd, DR, Compton, CC, et al (Eds), Springer, New York 2010. p.181.
- 125) Overman MJ, Hu CY, Wolff RA, et al. Prognostic value of lymph node evaluation in small bowel adenocarcinoma: analysis of the surveillance, epidemiology, and end results database. *Cancer* 2010;116:5374–82.

- 126) Nicholl MB, Ahuja V, Conway WC, et al. Small bowel adenocarcinoma: understaged and undertreated. *Annals of Surgical Oncology* 2010;17:2728–32.
- 127) Veyrieres M, Baillet P, Hay JM, et al. Factors influencing long-term survival in 100 cases of small intestine primary adenocarcinoma. *The American Journal of Surgery* 1997;173:237–9.
- 128) Kaklamanos IG, Bathe OF, Franceschi D, et al. Extent of resection in the management of duodenal adenocarcinoma. *The American Journal of Surgery* 2000;179:37–41.
- 129) Sohn TA, Lillemoe KD, Cameron JL, et al. Adenocarcinoma of the duodenum: factors influencing long-term survival. *Journal of Gastrointestinal Surgery* 1998;2:79–87.
- 130) Halfdanarson TR, McWilliams RR, Donohue JH, et al. A single-institution experience with 491 cases of small bowel adenocarcinoma. *The American Journal of Surgery* 2010;199:797–803.
- 131) Agrawal S, McCarron EC, Gibbs JF, et al. Surgical management and outcome in primary adenocarcinoma of the small bowel. *Annals of Surgical Oncology* 2007;14:2263–9.
- 132) Wu TJ, Yeh CN, Chao TC, et al. Prognostic factors of primary small bowel adenocarcinoma: univariate and multivariate analysis. *World Journal of Surgery* 2006;30:391–8.
- 133) Overman MJ, Kopetz S, Lin E, et al. Is there a role for adjuvant therapy in resected adenocarcinoma of the small intestine. *Acta Oncologica* 2010;49:474–9.

- 134) Overman MJ, Varadhachary GR, Kopetz S, et al. Phase II study of capecitabine and oxaliplatin for advanced adenocarcinoma of the small bowel and ampulla of Vater. *Journal of Clinical Oncology* 2009;27:2598–603.
- 135) Crawley C, Ross P, Norman A, Hill A, et al. The Royal Marsden experience of a small bowel adenocarcinoma treated with protracted venous infusion 5-fluorouracil. *British Journal of Cancer* 1998;78:508–10.
- 136) Czaykowski P, Hui D. Chemotherapy in small bowel adenocarcinoma: 10-year experience of the British Columbia Cancer Agency. *Clinical Oncology: A Journal of the Royal College of Radiologists* 2007;19:143–9.
- 137) Fishman PN, Pond GR, Moore MJ, et al. Natural history and chemotherapy effectiveness for advanced adenocarcinoma of the small bowel: a retrospective review of 113 cases. *American Journal of Clinical Oncology* 2006;29:225–31.
- 138) Gibson MK, Holcroft CA, Kvols LK, et al. Phase II study of 5-fluorouracil, doxorubicin, and mitomycin C for metastatic small bowel adenocarcinoma. *Oncologist* 2005;10:132–7.
- 139) Jigyasu D, Bedikian AY, Stroehlein JR. Chemotherapy for primary adenocarcinoma of the small bowel. *Cancer* 1984;53:23–5.
- 140) Locher C, Malka D, Boige V, et al. Combination chemotherapy in advanced small bowel adenocarcinoma. *Oncology* 2005;69:290–4.
- 141) Overman MJ, Kopetz S, Wen S, et al. Chemotherapy with 5-fluorouracil and a platinum compound improves outcomes in metastatic small bowel adenocarcinoma. *Cancer* 2008;113:2038–45.

- 142) Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer* 2007;7:573–84.
- 143) Zaanan A, Gauthier M, Malka D, et al. Second-line chemotherapy with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI regimen) in patients with advanced small bowel adenocarcinoma after failure of first-line platinum-based chemotherapy: a multicenter AGEO study. *Cancer* 2011;117:1422–8.
- 144) Fasano A, Catassi C. Celiac disease. *N Engl J Med*. 2012;367:2419-26.
- 145) Volta U, Caio G, Tovoli F, De Giorgio R. Non-celiac gluten sensitivity: questions still to be answered despite increasing awareness. *Cell Mol Immunol*. 2013 Sep;10(5):383-92.
- 146) de Lorgeril M, Salen P. Gluten and wheat intolerance today: are modern wheat strains involved? *Int J Food Sci Nutr*. 2014;65:577-81.
- 147) Van den Broeck HC¹, de Jong HC, Salentijn EM, Dekking L, Bosch D, Hamer RJ, Gilissen LJ, van der Meer IM, Smulders MJ. Presence of celiac disease epitopes in modern and old hexaploid wheat varieties: wheat breeding may have contributed to increased prevalence of celiac disease. *Theor Appl Genet*. 2010;121:1527-39.
- 148) De Ritis G., Auricchio S., Jones H.W., Lew E.J.L., Bernardin J.E., Kasarda D.D.: In vitro (organ culture) studies of the toxicity of specific A-gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology* 94:41-49, 1988.
- 149) Qiao S.W., Bergseng E., Molberg Ø., Xia J., Fleckenstein B., Khosla C., Sollid L.M.: Antigen presentation to celiac lesion-derived T cells of a 33-

mer gliadin peptide naturally formed by gastrointestinal digestion. J. Immunol. 173:1757-62, 2004.

150) Sollid L., Thorsby E.: HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. Gastroenterology 105:910-922, 1993.

151) Congia M., Cucca F., Frau F., Lampis R., Melis L., Clemente M.G., Cao A., De Virgilis S.: A gene dosage effect of the DQA1*0501/DQB1*0201 allelic combination influences the clinical heterogeneity of celiac disease. Hum. Immunol. 40:138-142, 1994.

152) Catassi C, Fasano A. Celiac Disease Diagnosis: Simple Rules Are Better Than Complicated Algorithms. Am J Med 2010;123:691-3.

153) Karell K, Louka AS, Moodie SJ, et al. HLA type in celiac disease patients not carrying the DQA1*05-DQB1*02 (DQ2) heterodimer: results from the European Genetics Cluster on Celiac Disease. Hum Immunol. 2003;64:469-477

154) Korponay-Szabò IR, Halttunen T, Szalai Z, Laurila K, Király R, Kovács JB, Fésus L, Mäki M. *In vivo targeting of intestinal and extraintestinal transglutaminase 2 by coeliac autoantibodies.* Gut 2004; 53:641-648

155) Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A, Green PH, Hadjivassiliou M, Kaukinen K, Kelly CP, Leonard JN, Lundin KE, Murray JA, Sanders DS, Walker MM, Zingone F, Ciacci C. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. Gut. 2013 Jan;62(1):43-52.

156) Pittschieler K., Ladinser B.: Coeliac disease screened by a new strategy. Acta Paediatr. suppl 412:42-45, 1996.

- 157) Corazza G.R., Andreani M.L., Biagi F., Corrao G., Pretolani S., Giulianelli G., Ghironzi G., Gasbarrini G.: The smaller size of the 'coeliac iceberg' in adults. *Scand. J. Gastroenterol.* 32:917-919, 1997.
- 158) Johnston S.D., Watson R.G.P., McMillan S.A., Sloan J., Love A.H.G.: Prevalence of coeliac disease in Northern Ireland. *Lancet* 350:1370, 1997
- 159) Kolho K.L., Farkkila M.A., Savilahti E.: Undiagnosed coeliac disease is common in Finnish adults. *Scand. J. Gastroenterol.* 33:1280-1283, 1998
- 160) Ivarsson A., Persson L.A., Juto P., Peltonen M., Suhr O., Hernell O.: High prevalence of undiagnosed coeliac disease in adults: a Swedish population-based study. *J. Intern. Med.* 245:63-68, 1999.
- 161) Riestra S., Fernandez E., Rodrigo L., Garcia S., Ocio G.: Prevalence of coeliac disease in the general population of Northern Spain. *Scand. J. Gastroenterol.* 35:398-402, 2000.
- 162) Volta U., Bellentani S., Bianchi F.B., Brandi G., De Franceschi L., Miglioli L., Granito A., Balli F., Tiribelli C.: High prevalence of celiac disease in Italian general population. *Dig. Dis. Sci.* 46:1500-1505, 2001.
- 163) Mäki M., Mustalahti K., Kokkonen J., Kulmala P., Haapalahti M., Karttunen T., Ilonen J., Laurila K, Dahlbom I., Hansson T., Höpfl P., Knip M.: Prevalence of celiac disease among children in Finland. *N. Engl. J. Med.* 348:2517-24, 2003
- 164) Catassi C, Räscher IM, Gandolfi L, Pratesi R, Fabiani E, El Asmar R, Frijia M, Bearzi I, Vizzoni L.: Why is coeliac disease endemic in the people of the Sahara? *Lancet* 354:647-8, 1999
- 165) Meloni G, Dore A, Fanciulli G, Tanda F, Bottazzo GF. Subclinical coeliac disease in schoolchildren from northern Sardinia. *Lancet.* 1999;353:37.

- 166) Jiang L.L., Zhang B.L., Liu Y.S.: Is adult celiac disease really uncommon in Chinese? *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 10:168-71, 2009.
- 167) Godkin A., Jewell D.: The pathogenesis of celiac disease. *Gastroenterology* 115:206-210, 1998.
- 168) Zanoni G., Navone R., Lunardi C., Tridente G., Bason C., Sivori S., Beri R., Dolcino M., Valletta E., Corrocher R., Puccetti A.: In celiac disease a subset of autoantibodies against transglutaminase binds toll-like receptor 4 and induces activation of monocytes. *PloS. Med.* 3:e358, 2006.
- 169) Stene L.C., Honeyman M.C., Hoffenberg E.J., Haas J.E., Sokol R.J., Emery L., Taki I., Norris J.M., Erlich H.A., Eisenbarth G.S., Rewers M.: Rotavirus infection frequency and risk of celiac disease autoimmunity in early childhood: a longitudinal study. *Am. J. Gastroenterol.* 101:2333-2340, 2006.
- 170) Akobeng AK, Ramanan AV, Buchan I, Heller RF. Effect of breast feeding on risk of coeliac disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Arch Dis Child.* 2006;9:39-43.
- 171) Myléus A, Ivarsson A, Webb C, Danielsson L, Hernell O, Högberg L, Karlsson E, Lagerqvist C, Norström F, Rosén A, Sandström O, Stenhammar L, Stenlund H, Wall S, Carlsson A. Celiac disease revealed in 3% of Swedish 12-year-olds born during an epidemic. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009;49:170-6.
- 172) Ludvigsson JF, Fasano A. Timing of introduction of gluten and celiac disease risk. *Ann Nutr Metab.* 2012;60 Suppl 2:22-9.
- 173) Ivarsson A, Myléus A, Norström F, van der Pals M, Rosén A, Högberg L, Danielsson L, Halvarsson B, Hammarroth S, Hernell O, Karlsson E,

Stenhammar L, Webb C, Sandström O, Carlsson A. Prevalence of childhood celiac disease and changes in infant feeding. *Pediatrics*. 2013;131:e687-94.

174) Szajewska H, Shamir R, Chmielewska A, Pięćcik-Lech M, Auricchio R, Ivarsson A, Kolacek S, Koletzko S, Korponay-Szabo I, Mearin ML, Ribes-Koninckx C, Troncone R; PREVENTCD Study Group. Systematic review with meta-analysis: early infant feeding and coeliac disease--update 2015. *Aliment Pharmacol Ther*. 2015;41:1038-54.

175) Szajewska H, Shamir R, Mearin L, Ribes-Koninckx C, Catassi C, Domellöf M, Fewtrell MS, Husby S, Papadopoulou A, Vandenplas Y, Castillejo G, Kolacek S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, Lionetti E, Polanco I, Troncone R. Gluten Introduction and the Risk of Coeliac Disease: A Position Paper by the European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2016;62:507-13.

176) Andrén Aronsson C, Lee HS, Koletzko S, Uusitalo U, Yang J, Virtanen SM, Liu E, Lernmark Å, Norris JM, Agardh D; TEDDY Study Group. Effects of Gluten Intake on Risk of Celiac Disease: A Case-Control Study on a Swedish Birth Cohort. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2016;14:403-409.e3.

177) Leonard MM, Camhi S, Huedo-Medina TB, Fasano A. Celiac Disease Genomic, Environmental, Microbiome, and Metabolomic (CDGEMM) Study Design: Approach to the Future of Personalized Prevention of Celiac Disease. *Nutrients*. 2015;7:9325-36

178) Dieterich W., Ehnis T., Bauer M., Donner P., Volta U., Riecken E., Schuppan D.: Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat. Med*. 3:797-801, 1997.

- 179) Diosdado B., Wijmenga C.: Molecular mechanisms of the adaptive, innate and regulatory immune responses in the intestinal mucosa of celiac disease patients. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 5:681-700, 2005.
- 180) Jabri B., Kasarda D.D., Green P.H.: Innate and adaptive immunity: the yin and yang of celiac disease. *Immunol. Rev.* 206:219-231, 2005.
- 181) Fasano A.: Regulation of intercellular tight junctions by zonula occludens toxin and its eukariotic analogue zonulin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 915:214-222, 2000.
- 182) Fasano A.: Celiac disease: how to handle a clinical chamaleon. *N. Engl. J. Med.* 348:2568-2570, 2003.
- 183) Woods W.: Coeliac disease: the great imitator. *Med. J. Aust.* 181:371, 2004
- 184) Volta U, Caio G, Tovoli F, De Giorgio R. Gut-liver axis: an immune link between celiac disease and primary biliary cirrhosis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013;7:253-61.
- 185) Volta U, Tovoli F, Caio G. Clinical and immunological features of celiac disease in patients with Type 1 diabetes mellitus. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011;5:479-87.
- 186) Caio G, De Giorgio R, Venturi A, Giancola F, Latorre R, Boschetti E, Serra M, Ruggeri E, Volta U. Clinical and immunological relevance of anti-neuronal antibodies in celiac disease with neurological manifestations. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* 2015;8:146-52.
- 187) Gale L., Wimalaratna H., Brotodiharjo A., Duggan J.M.: Down's syndrome is strongly associated with coeliac disease. *Gut* 40:492-496, 1997.

- 188) Bonamico M., Pasquino A.M., Mariani P., Danesi H.M., Culasso F., Mazzanti L., Petri A., Bona G.: Prevalence and clinical picture of celiac disease in Turner syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87:5495-5498, 2002.
- 189) Giannotti A., Tiberio G., Castro M., Virgilio F., Colistro F., Ferretti F., Digilio M.C., Gambarara M., Dallapiccola B.: Coeliac disease in Williams syndrome. *J. Med. Genet.* 38:767-768, 2001.
- 190) Iltanen S., Collin P., Korpela M., Holm K., Partanen J., Polvi A., Mäki M.: Celiac disease and markers of celiac latency in patients with primary Sjögren's syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* 94:1042-1046, 1999.
- 191) Ciacci C., Cavallaro R., Iovino P., Sabbatini F., Palumbo A., Amoruso D., Tortora R., Mazzacca G.: Allergy prevalence in adult celiac disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113:1199-203, 2004.
- 192) Leeds J.S., Höroldt B.S., Sidhu R., Hopper A.D., Robinson K., Toulson B., Dixon L., Lobo A.J., McAlindon M.E., Hurlstone D.P., Sanders D.S.: Is there an association between coeliac disease and inflammatory bowel diseases? A study of relative prevalence in comparison with population controls. *Scand. J. Gastroenterol.* 42:1214-20, 2007.
- 193) Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, Troncone R, Giersiepen K, Branski D, Catassi C, Lelgeman M, Mäki M, Ribes-Koninckx C, Ventura A, Zimmer KP; ESPGHAN Working Group on Coeliac Disease Diagnosis; ESPGHAN Gastroenterology Committee. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012;54:136-60.

- 194) Caio G, Volta U. Coeliac disease: changing diagnostic criteria? *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* 2012;5:119-22.
- 195) Volta U. Dallo screening alla diagnosi. In: *Malattia celiaca, Educazione permanente in malattie digestive*, Il Pensiero Scientifico Editore, Roma, pag. 29, 1996.
- 196) Halfdanarson T.R., Litzow M.R., Murray J.A.: Hematologic manifestations of celiac disease. *Blood* 109:412-421, 2007.
- 197) Ciacci C., Cirillo M., Giorgetti G., Alfinito F., Franchi A., Mazzetti di Pietralata M., Mazzacca G.: Low plasma cholesterol: a correlate of nondiagnosed celiac disease in adults with hypochromic anemia. *Am. J. Gastroenterol.* 94:1888-1891, 1999.
- 198) Volta U., Granito A., De Franceschi L., Petrolini N., Bianchi F.B.: Anti-tissue transglutaminase antibodies as predictors of silent coeliac disease in patients with hypertransaminasaemia of unknown origin. *Dig. Liver. Dis.* 33:420-425, 2001.
- 199) Corazza G.R., Zoli G., Di Sabatino A., Ciccocioppo R., Gasbarrini G.: A reassessment of splenic hypofunction in celiac disease. *Am. J. Gastroenterol.* 94:391-397, 1999.
- 200) Caraceni P, Benazzi B, Caio G, Zaccherini G, Domenicali M, Volta U. Hyposplenism as a cause of pneumococcal meningoenzephalitis in an adult patient with celiac disease. *Ital J Med* 2011; 5:124-127.
- 201) Di Sabatino A., Rosado M.M., Cazzola P., Riboni R., Biagi F., Carsetti R., Corazza G.R.: Splenic hypofunction and the spectrum of autoimmune and malignant complications in celiac disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 4:179-86, 2006.

- 202) Lazzari R., Volta U., Bianchi F.B., Collina A., Pisi E. R1 reticulin antibodies: marker of celiac disease in children on a normal diet and on gluten challenge. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 3:516-22, 1984
- 203) Volta U, Fabbri A, Parisi C, Piscaglia M, Caio G, Tovoli F, Fiorini E. Old and new serological tests for celiac disease screening. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2010;4:31-5.
- 204) Ferreira M., Lloyd Davies S., Butler M., Scott D., Clark M., Kumar P.: Endomysial antibody: is it the best test for coeliac disease? *Gut* 33:1633-1637, 1992.
- 205) Volta U., Molinaro N., De Franceschi L., Fratangelo D., Bianchi FB. IgA anti-endomysial antibodies on human umbilical cord tissue for celiac disease screening: save both money and monkeys. *Dig. Dis. Sci.* 40:1902-1905, 1995.
- 206) Stern M., Working Group on Serologic Screening for Celiac Disease.: Comparative evaluation of serologic tests for celiac disease: a European initiative toward standardization. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 31:513-519, 2000.
- 207) Salardi S., Volta U., Zucchini S., Fiorini E., Maltoni G., Vaira B., Cicognani A.: Prevalence of celiac disease in children with type 1 diabetes mellitus increased in the mid-1990 s: an 18-year longitudinal study based on anti-endomysial antibodies. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 46:612-14, 2008.
- 208) Korponay-Szabó I.R., Szabados K., Pusztai J., Uhrin K., Ludmány E., Nemes E., Kaukinen K., Kapitány A., Koskinen L., Sipka S., Imre A., Mäki M.: Population screening for coeliac disease in primary care by district nurses using a rapid antibody test: diagnostic accuracy and feasibility study. *Br. Med. J.* 335:1244-1247, 2007.

- 209) Nemec G., Ventura A., Stefano M., Di Leo G., Baldas V., Tommasini A., Ferrara F., Taddio A., Città A., Sblattero D., Marzari R., Not T.: Looking for celiac disease: diagnostic accuracy of two rapid commercial assays. *Am. J. Gastroenterol.* 101:1597-1600, 2006.
- 210) Volta U., Granito A., Fiorini E., Parisi C., Piscaglia M., Pappas G., Muratori P., Bianchi F.B.: Usefulness of antibodies to deamidated gliadin peptides in celiac disease diagnosis and follow-up. *Dig. Dis. Sci.* 53:1582-8, 2008.
- 211) Amarri S, Alvisi P, De Giorgio R, Gelli MC, Cicola R, Tovoli F, Sassatelli R, Caio G, Volta U. Antibodies to deamidated gliadin peptides: an accurate predictor of coeliac disease in infancy. *J Clin Immunol.* 2013;33:1027-30.
- 212) Cataldo F., Marino V., Ventura A., Bottaro G., Corazza G.R.: Prevalence and clinical features of selective immunoglobulin A deficiency in coeliac disease: an Italian multicentre study. *Gut* 42: 362-365, 1998.
- 213) Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H. The histopathology of celiac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 11:1185-1194, 1999.
- 214) Corazza G.R., Villanacci V.: Coeliac Disease: some considerations on the histological diagnosis. *J. Clin. Pathol.* 58; 573-574, 2005.
- 215) Villanacci V, Ceppa P, Tavani E, Vindigni C, Volta U; Gruppo Italiano Patologi Apparato Digerente (GIPAD); Società Italiana di Anatomia Patologica e Citopatologia Diagnostica/International Academy of Pathology, Italian division (SIAPEC/IAP). Coeliac disease: the histology report. *Dig Liver Dis.* 2011 Mar;43 Suppl 4:S385-95.

- 216) Rostami-Nejad M, Villanacci V, Hogg-Kollars S, Volta U, Manenti S, Reza-Zali M, Caio G, Giovenali P, Barakauskiene A, Kazenaite E, Becheanu G, Diculescu M, Pellegrino S, Magazzù G, Casella G, Di-Bella C, Decarli N, Biancalani M, Bassotti G, Rostami K. Endoscopic and histological pitfalls in the diagnosis of celiac disease: A multicentre study assessing the current practice. *Rev Esp Enferm Dig.* 2013 Jul;105(6):326-33.
- 217) Brown I., Mino-Kenudson M., Deshpande V., Lauwers G.Y.: Intraepithelial lymphocytosis in architecturally preserved proximal small intestinal mucosa. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 130:1020-1025, 2006.
- 218) Biagi F., Bianchi P.I., Campanella J., Badulli C., Martinetti M., Klersy C., Alvisi C., Corazza G.R.: The prevalence and the causes of minimal intestinal lesions in patients complaining of symptoms suggestive of enteropathy. A follow-up study. *J. Clin. Pathol.* 61:1116-1118, 2008.
- 219) Kakar S., Nehra V., Murray J.A., Dayharsh G.A., Burgart L.J.: Significance of intraepithelial lymphocytosis in small bowel biopsy samples with normal mucosa architecture. *Am. J. Gastroenterol.* 98:2027-2033, 2003.
- 220) Upton M.P.: "Give us this day our daily bread". Evolving concepts in celiac sprue. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 132:1594-1599, 2008.
- 221) Biagi F., Luinetti O., Campanella J., Klersy C., Zambelli C., Villanacci V., Lanzini A., Corazza G.R.: Intraepithelial lymphocytes in the villous tip do they indicate potential coeliac disease? *J. Clin. Pathol.*; 57:835-839, 2004.
- 222) van Heel D.A., Hunt K., Greco L., Wijmenga C.: Genetics in coeliac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 19:323-39, 2005.

- 223) Mazzilli M.C., Calabrò A., Catassi C, Greco L., Mengioni F., Troncone R., Cardi E.: Linee guida per la standardizzazione del test HLA per la celiachia. *Celiachia Notizie* 1:18-19, 2008.
- 224) Brocchi E., Corazza G.R., Caletti G., Treggiari E.A., Barabara L., Gasbarrini G.: Endoscopic demonstration of loss of duodenal folds in the diagnosis of celiac disease. *N. Engl. J. Med.* 319:741-744, 1988.
- 225) Fraquelli M., Colli A., Colucci A., Bardella M.T., Trovato C., Pometta R., Pagliarulo M., Conte D.: Accuracy of ultrasonography in predicting celiac disease. *Arch. Intern. Med.* 164:169-174, 2004.
- 226) Fiorini E, Serra C, Fabbri A, Parisi C, Piscaglia M, Caio G, Bianchi G, Volta U. Ultrasonographic signs in coeliac disease: a correlation with clinical, serological and histological features. *WFUMB Euroson Ultraschall* 2011.
- 227) Cammarota G., Cesaro P., Martino A., Zuccalà G., Cianci R., Nista E., Larocca L.M., Vecchio F.M., Gasbarrini A., Gasbarrini G.: High accuracy and cost-effectiveness of a biopsy-avoiding endoscopic approach in diagnosing coeliac disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 23, 61-69, 2006.
- 228) Rondonotti E., De Franchis R.: Diagnosing coeliac disease: is the videocapsule a suitable tool? *Dig. Liver. Dis.* 39:145-147, 2007.
- 229) Williams MJ, Sutherland DH, Clark CG. Lymphomasarcoma of the small intestine with a malabsorption syndrome and pneumatosis intestinalis. Report of a case with peroral jejunal biopsy. *Gastroenterology* 1963;45:550e7.
- 230) Silano M, Volta U, Mecchia AM, et al. Delayed diagnosis of coeliac disease increases cancer risk. *BMC Gastroenterology.* 2007;7:8;

- 231) Ilus T, Kaukinen K, Virta LJ, et al. Incidence of malignancies in diagnosed celiac patients: a population-based estimate. *Am J Gastroenterol*. 2014;109:1471–1477.
- 232) Askling J, Linet M, Gridley G, et al. Cancer incidence in a population-based cohort of individuals hospitalized with celiac disease or dermatitis herpetiformis. *Gastroenterology*. 2002;123:1428–1435.
- 233) Volta U, Vincentini O, Quintarelli F, et al. Collaborating Centres of the Italian Registry of the Complications of Celiac D. Low risk of colon cancer in patients with celiac disease. *Scand J Gastroenterol*. 2014;49:564–568
- 234) Volta U, Vincentini O, Silano M; Collaborating Centers of the Italian Registry of Celiac Disease. Papillary cancer of thyroid in celiac disease. *J Clin Gastroenterol*. 2011;45:e44-6.
- 235) Han Y, Chen W, Li P, Ye J. Association Between Coeliac Disease and Risk of Any Malignancy and Gastrointestinal Malignancy: A Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94:e1612.
- 236) Biagi F, Gobbi P, Marchese A, Borsotti E, Zingone F, Ciacci C, Volta U, Caio G, Carroccio A, Ambrosiano G, Mansueto P, Corazza GR. Low incidence but poor prognosis of complicated coeliac disease: a retrospective multicentre study. *Dig Liver Dis* 2013;
- 237) Kenwright S. Coeliac disease and small bowel carcinoma. *Postgrad Med J* 1972;48:673–7.
- 238) Holmes GK, Dunn GI, Cockel R, et al. Adenocarcinoma of the upper small bowel complicating coeliac disease. *Gut* 1980;21:1010–16.
- 239) Javier J, Lukie B. Duodenal adenocarcinoma complicating celiac sprue. *Dig Dis Sci* 1980;25:150–3.

- 240) Farrell DJ, Shrimankar J, Griffin SM. Duodenal adenocarcinoma complicating coeliac disease. *Histopathology* 1991;19:285–7.
- 241) Selby WS, Gallagher ND. Malignancy in a 19-year experience of adult coeliac disease. *Dig Dis Sci* 1979;24:684–8.
- 242) Simpson S, Traube J, Riddell RH. The histologic appearance of dysplasia (precarcinomatous change) in Crohn's disease of the small and large intestine. *Gastroenterology* 1981;81:492–501.
- 243) Bruno CJ, Batts KP, Ahlquist DA. Evidence against flat dysplasia as a regional field defect in small bowel adenocarcinoma associated with coeliac sprue. *Mayo Clin Proc* 1997;72:320–2.
- 244) Fishman MJ, Jeejeebhoy KN, Gopinath N, et al. Small intestinal villous adenoma and coeliac disease. *Am J Gastroenterol* 1990;85:748–51.
- 245) American Gastroenterological Association medical position statement: Coeliac Sprue. *Gastroenterology* 2001;120:1522–5.
- 246) Jun SY, Eom DW, Park H, Bae YK, Jang KT, Yu E, Hong SM. Prognostic significance of CDX2 and mucin expression in small intestinal adenocarcinoma. *Mod Pathol*. 2014;27:1364-74.