
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Posibilități evolutive ale bolii celiace

Doctorand **Elena-Maria Mureșan (căș. Domșa)**

Conducător de doctorat **Prof. dr. Vasile Andreica**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Aspecte generale	17
2. Etiopatogeneză	17
2.1. Factori de mediu	17
2.2. Factori genetici	17
2.2.1. Rolul microARN (miARN)	18
2.2.2. Rolul ARN lung necodificator (ARNlnc)	20
2.3. Factori imunologici	22
2.4. Disbioza intestinală	23
2.5. Alți factori patogenetici	23
3. Caracteristici clinice și boli asociate	25
3.1. Manifestări clinice	25
3.2. Tipuri de boală celiacă	26
3.3. Boli asociate	27
4. Diagnostic	29
4.1. Teste serologice	29
4.2. Teste genetice	29
4.3. Endoscopia digestivă superioară și examenul histopatologic	30
4.4. Examinări suplimentare	30
4.5. Metode diagnostice pentru boala celiacă refractară	31
4.5.1. Aderența la dietă și diagnosticul inițial al bolii celiace	31
4.5.2. Endoscopia digestivă superioară și evaluarea histopatologică	31
4.5.3. Identificarea limfocitelor intraepiteliale aberante	31
4.5.4. Alte investigații	31
5. Complicații	33
6. Tratament	33
7. Urmărirea pacienților cu boală celiacă	35
8. Rolul polifenolilor și al nanoparticulelor de aur	35
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	41
2. Metodologie generală	41
3. Studiul 1 - Evaluarea caracteristicilor clinice și paraclinice ale pacienților cu boală celiacă nou diagnosticată și ale celor cu	45

boală celiacă aflați pe dietă fără gluten

3.1. Introducere	45
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	46
3.3. Material și metodă	46
3.4. Rezultate	48
3.5. Discuții	53
3.6. Concluzii	58

4. Studiul 2 - Evaluarea anumitor gene și microARN-uri circulante la pacienții cu boală celiacă

4.1. Introducere	59
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	60
4.3. Material și metodă	60
4.4. Rezultate	63
4.5. Discuții	72
4.6. Concluzii	75

5. Studiul 3 - Efectele luteolinei, ale extractului de Cornus mas și ale nanoparticulelor de aur funcționalizate cu extract de Cornus mas asupra celulelor Caco-2

5.1. Introducere	77
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	79
5.3. Material și metodă	79
5.4. Rezultate	82
5.5. Discuții	91
5.6. Concluzii	94

6. Discuții generale 97**7. Concluzii generale** 99**8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei** 101**REFERINȚE** 103

Cuvinte cheie: boala celiacă, dieta fără gluten, microARN-uri circulante, gene, biomarkeri, gliadina, nanoparticule de aur, polifenoli, celule Caco-2

INTRODUCERE

Boala celiacă (BC) este o afecțiune cronică autoimună, pluriorganică, cu predispoziție genetică, declanșată de ingestia de gluten, care determină modificări serologice și histologice caracteristice la nivelul intestinului subțire. Cauza exactă a BC nu este cunoscută. Se cunoaște faptul că apare o reacție imună exagerată a mucoasei

intestinale în contact cu glutenul din anumite cereale, ceea ce determină manifestări de tip intestinal și/sau extraintestinal. Boala se poate prezenta sub diverse forme clinice, din acest motiv mulți pacienți rămân nediagnosticați peste tot în lume. În majoritatea cazurilor, diagnosticul se realizează prin determinarea autoanticorpilor serici (anti-transglutaminază și anti-endomisium de tip IgA) și a biopsiei duodenale. Respectarea strictă a dietei fără gluten (DFG) întreaga viață, întrerupe răspunsul imun la peptidele glutenului și este singurul tratament eficient al bolii. Acest lucru presupune necesitatea unor tratamente noi sau adjuvante.

Studiile din ultimii ani au adus în lumină rolul microARN-urilor (miARN) în patogeniza bolii celiace. Acestea reglează expresia genelor și în viitor ar putea reprezenta biomarkeri de diferențiere clinică a pacienților, ceea ce ar putea conduce la un management personalizat al bolii.

În prezent, nu există un model care să reproducă exact complexitatea BC. Modelele in vitro utilizate au inclus diferite linii celulare printre care celulele Caco-2, care sunt accesibile și ușor de lucrat cu ele. Acestea au avut o contribuție semnificativă la patogeniza BC. De-a lungul timpului, s-au încercat diferite terapii neconvenționale cu efecte antiinflamatorii și antioxidante, precum cea cu polifenoli și materiale funcționalizate cu polifenoli, care ar putea fi recomandate în tratamentul BC.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Stadiul actual al cunoașterii este cuprins în 8 capitole. În aceste capitole sunt redată datele cele mai importante și de noutate din literatura de specialitate referitoare la BC.

Primul capitol, Aspecte generale, constă în definirea BC ca boală cronică, evolutivă și prezentarea impactului pe care această patologie îl are din punct de vedere epidemiologic, clinic.

Al doilea capitol, Etiopatogeneza, descrie diferiți factori implicați în BC precum factori de mediu, factori genetici, factori imunologici, disbioza intestinală, sistemul nervos autonom. Este discutat rolul miARN-urilor în patogeniza BC, faptul că aceste molecule reglează anumite gene, iar studii ulterioare legate de miARN-uri ar putea elucida rolul lor de potențiali biomarkeri.

În al treilea capitol sunt prezentate caracteristicile clinice ale BC cu numeroase manifestări digestive și extradigestive, tipurile de BC, de la forma clasică până la cea refractară și diferitele boli care se pot asocia acestei patologii.

În al patrulea capitol este descris felul în care se diagnostichează BC de la teste serologice specifice, teste genetice, evaluare endoscopică până la diferite alte investigații. De asemenea, sunt redată și metodele de diagnosticare ale BC refractare.

Capitolul cinci, prezintă complicațiile BC de la complicația majoră, limfomul cu celule T, la diferite tipuri de infecții, hiposplenism, enterita colagenoasă, ulcere intestinale, deficite minerale osoase, diferite neoplazii.

În capitolul șase, sunt aduse în discuție metodele de tratament ale BC punând accentul pe DFG, care trebuie respectată toată viața, acesta fiind singurul tratament recomandat în întreaga lume și eficient în momentul de față.

Capitolul șapte descrie planul de urmărire al pacienților, diferitele situații când se indică repetarea biopsie.

Capitolul opt prezintă rolul polifenolilor și al nanoparticulelor de aur asupra organismului. Studiile au demonstrat diverse efecte benefice ale compușilor fenolici precum antioxidante, antiinflamatorii, antimutagenice, anticancerigene, antibacteriene, antivirale, anti-îmbătrânire, imunomodulatoare, de vindecare a unor răni, de reducere a riscului de boli cardiovasculare, de scădere a riscului de ateroscleroză, radioprotectoare, tonice pentru păr, de depozit hormonal la femeile aflate la menopauză naturală. Polifenolii încapsulați în nanoparticule sinergice ar putea contribui la prevenirea și tratarea unor boli inflamatorii.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Studiu 1. Evaluarea caracteristicilor clinice și paraclinice ale pacienților cu boală celiacă nou diagnosticată și ale celor cu boală celiacă aflați pe dietă fără gluten

Introducere. BC afectează toate grupele de vârstă și este mai frecventă în rândul persoanelor de sex feminin. Aceasta poate avea manifestări diferite, intestinale (durere abdominală, grețuri, vărsături etc.) sau extraintestinale (anemie feriprivă, dermatită herpetiformă, carențe de vitamine, neuropatie periferică, sindrom de hepatocitoliză, hipoalbuminemie, stomatită aftoasă, etc.). Diagnosticul bolii se realizează pe baza datelor clinice, serologice, histopatologice și genetice (la cei cu discordanță între serologie și histologie; la cei aflați deja pe DFG la momentul testării; la cei cu risc crescut – cu boli autoimune/genetice, la membrii familiei). Tratamentul durează toată viața și constă în respectarea DFG, ceea ce presupune educarea pacientului în privința acestui aspect și o evaluare atentă a acestuia. Printre bolile asociate se numără tiroidita Hashimoto, diabetul zaharat de tip 1, psoriazis, dermatita herpetiformă, boala Addison, anemia hemolitică autoimună, sarcoidoza, sindromul Raynaud, sindromul Sjogren, lupus eritematos sistemic, hepatita autoimună, ciroza biliară primitivă, sindromul de intestin iritabil, colita microscopică și multe altele. La acești pacienți este importantă și evaluarea complicațiilor precum limfomul cu celule T, diverse tipuri de infecții, ulcere intestinale.

Ipoteza de lucru / obiective. Scopul acestui studiu a fost de a descrie caracteristicile clinice și paraclinice ale pacienților cu BC nou diagnosticată comparativ cu cei aflați pe DFG și de a analiza diferențele dintre loturi.

Material și metodă. Participanții la studiu au fost recrutați din cadrul Institutului Regional de Gastroenterologie și Hepatologie "Prof. dr. Octavian Fodor", Cluj-Napoca și din cadrul Clinicii Medicală IV, Cluj-Napoca, în perioada 2015-2018.

Studiul a fost de tip prospectiv, analitic, observațional și a cuprins un număr de 50 de pacienți cu BC dintre care 16 pacienți cu BC la diagnostic, aflați pe dietă ce conținea gluten (BC nou diagnosticată) și 34 de pacienți aflați pe DFG de cel puțin 1 an (BC pe DFG). Toți pacienții au fost evaluați pe baza unei fișe de studiu care a inclus date demografice, clinice și paraclinice.

Rezultate. Vârsta la diagnostic, vârsta la intrarea în studiu, sexul și mediul de proveniență al pacienților au fost apropiate ca și valori în cele două loturi analizate. Majoritatea pacienților, atât din lotul cu BC nou diagnosticată cât și din lotul cu BC pe DFG, au fost de sex feminin și proveneau din mediu urban. 56,2% dintre pacienții cu BC nou diagnosticată și 50% dintre cei cu BC pe DFG au avut manifestări extraintestinale. Durata de la debutul bolii până la diagnostic a avut o mediană de 1 (0-2) la cei cu BC nou diagnosticată și 0 (0-1) la cei cu BC pe DFG, cu diferențe statistice semnificative între cele două grupuri ($p=0,03$). Respectarea strictă a DFG a fost relatată de 50% dintre pacienții aflați în grupul DFG. Cei mai mulți dintre pacienți erau normoponderali în ambele loturi. 62,5% dintre pacienții nou diagnosticați și 58,8% dintre cei pe DFG au prezentat anticorpi specifici negativi. Toți pacienții din lotul cu BC nou diagnosticată au prezentat atrofie vilozitară din punct de vedere histologic. Peste 50% dintre pacienții pe DFG aveau stadiul histologic Marsh-Oberhuber 3. Între grupuri au fost diferențe statistice semnificative ($p=0,03$). La bolnavii la care au existat discordanță între histologie și serologie, antigenele HLA-DQ2 și/sau HLA-DQ8 au fost pozitive. O proporție mare de pacienți a avut *Helicobacter pylori* negativ în ambele loturi. Complicațiile infecțioase au fost prezente la 2 dintre pacienții nou diagnosticați și la 6 dintre cei aflați pe DFG. În grupul pacienților cu BC nou diagnosticată cele mai frecvente manifestări de tip intestinal au fost balonarea, durerile abdominale și scăderea în greutate, iar în grupul celor cu BC pe DFG, durerile abdominale, scăderea în greutate, balonarea și diareea. În privința balonării, valoarea p a fost semnificativă statistic între grupuri ($p=0,02$). Manifestările extraintestinale cele mai frecvent întâlnite în ambele loturi au fost fatigabilitatea/astenia și neuropatia periferică a membrelor inferioare. Numărul de cazuri cu trombocitoză a fost mai mare în grupul BC nou diagnosticată față de grupul DFG, având semnificație statistică ($p=0,02$). Cele mai frecvente boli asociate au fost bolile de esofag și stomac, atât la cei nou diagnosticați, cât și la cei aflați pe DFG.

Concluzii. Acest studiu pune în evidență complexitatea acestei boli cu diferitele manifestări clinice și patologii asociate.

Studiu 2. Evaluarea anumitor gene și microARN-uri circulante la pacienții cu boală celiacă

Introducere. Patogeneza BC nu a fost clar elucidată. Unele studii au investigat implicarea miARN-urilor în mai multe boli digestive, printre care și BC. Analiza expresiei genelor, a interacțiunilor proteină-proteină și a diverselor căi implicate, ar

putea contribui la o mai bună înțelegere a bolii și la descoperirea unor biomarkeri de prognostic, diagnostic și tratament.

Ipoteza de lucru / obiective. Scopul acestui studiu a fost evaluarea expresiei genelor Wnt family member 3 (WNT3), Wnt family member 11 (WNT11), tumor necrosis factor alpha (TNF α), mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1), AKT serine/threonine kinase 3 (AKT3), phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha (PIK3CA), cyclin D1 (CCND1) și a miARN-urilor circulante miR-192-5p, miR-194-5p, miR-449a, miR-638 la pacienții cu BC, evidențierea potențialelor legături ale acestora cu aspectele clinice ale pacienților și posibilitatea utilizării lor ca și biomarkeri.

Material și metodă. Participanții la studiu au fost recrutați din cadrul Institutului Regional de Gastroenterologie și Hepatologie "Prof. dr. Octavian Fodor", Cluj-Napoca și din cadrul Clinicii Medicală IV, Cluj-Napoca, în perioada 2015-2018. Studiul realizat a fost de tip prospectiv, analitic, observațional și a cuprins un număr de 58 de persoane. Acestea au fost împărțite în 3 grupuri: grupul 1, din care au făcut parte 15 pacienți cu BC la diagnostic (Nou diagnosticați); grupul 2, din care au făcut parte 33 de pacienți cu BC aflați pe DFG de minim 1 an (DFG); grupul 3, de control, din care au făcut parte 10 subiecți (Martor). S-au realizat analize comparative între lotul Nou diagnosticați și lotul Martor, între lotul DFG și lotul Martor și între lotul Nou diagnosticați și lotul DFG. Pentru determinarea genelor și a miARN-urilor, de la toți participanții la studiu s-au recoltat probe de sânge care au fost procesate pentru a obține ser, plasmă și pelete leucocitare (celule mononucleare din sângele periferic – PBMC). Extractul de leucocite a fost introdus în soluție TriReagent și păstrat la -80°C.

Rezultate. 60% dintre pacienții cu BC nou diagnosticată și aproximativ 50% dintre pacienții cu BC pe DFG s-au prezentat cu manifestări de tip extraintestinal. Majoritatea pacienților cu BC (aproximativ 60%) au prezentat anticorpi negativi la intrarea în studiu. În grupul DFG, cei mai mulți dintre pacienții se aflau în stadiul Marsh-Oberhuber 3 (aproximativ 60%), iar procentul de pacienți complianți la DFG în mod strict, a fost de 51,5%. Majoritatea genelor evaluate au fost supraexprimate în grupurile de pacienți cu BC comparativ cu grupul martor. Dintre cele șapte gene, TNF α , MAPK1 și CCND1 au avut valori crescute semnificativ statistic în grupul nou diagnosticați ($p=0,0249$, $p=0,0019$, $p=0,0275$) comparativ cu grupul martor. În grupul DFG expresia genelor a fost mai crescută față de grupul nou diagnosticați, fără diferențe statistice semnificative. Dintre miARN-urile circulante evaluate, miR-194-5p a avut valori apropiate de cea semnificativă statistic atât în grupul pacienților nou diagnosticați comparativ cu grupul martor ($p=0,0510$), cât și în grupul celor aflați pe DFG comparativ cu grupul martor ($p=0,0671$). Celelalte miARN-uri au fost fie supraexprimate, fie subexprimate în grupurile în care comparația s-a realizat cu grupul martor. Majoritatea miARN-urilor au avut o expresie crescută în grupul DFG comparativ cu grupul nou diagnosticați, fără diferențe statistice semnificative. Programul DIANA-miRPath a evidențiat o activitate funcțională intensă a miR-192-5p

și miR-449a. Analiza integrativă a miARN-urilor și ARNm-urilor cu ajutorul platformei miRNet a evidențiat interacțiuni între miR-194-5p, miR-449a și gena CCND1.

Concluzii. Majoritatea genelor și miARN-urilor circulante au avut valori crescute la pacienții cu BC, comparativ cu grupul martor. Dintre genele evaluate, TNF α , MAPK1 și CCND1 au avut valori semnificative statistic în grupul pacienților nou diagnosticați comparativ cu grupul martor. În ceea ce privește expresia de miARN-uri, dintre cele evaluate, miR-194-5p a avut valori apropiate de cea semnificativă statistic atât în grupul pacienților nou diagnosticați comparativ cu grupul martor, cât și în grupul celor aflați pe DFG comparativ cu grupul martor.

Studiu 3. Efectele luteolinei, ale extractului de Cornus mas și ale nanoparticulelor de aur funcționalizate cu extract de Cornus mas asupra celulelor Caco-2

Introducere. Studiile au demonstrat că gliadina are efecte citotoxice sau imunomodulatorii, de inducere a stresului oxidativ și de eliberare a citokinelor proinflamatorii. La momentul actual, nu există un model care să reproducă cu exactitate complexitatea BC. Analiza funcției de barieră epitelială se bazează în principal pe celule Caco-2 sau pe biopsii intestinale. Efectele glutenului asupra celulelor Caco-2 s-au reflectat în creșterea nivelului citokinelor inflamatorii. Celulele Caco-2 au adus o contribuție la patogeneza BC în ceea ce privește rolul microbiomului intestinal. Despre polifenoli și materiale funcționalizate cu polifenoli s-au realizat numeroase studii. Datorită efectelor antiinflamatorii, antioxidante și de promovare a funcției barierei intestinale, polifenolii ar putea avea un rol în tratamentul BC.

Ipoteza de lucru / obiective. Studiul nostru a urmărit evaluarea efectelor nanoparticulelor de aur funcționalizate cu polifenoli din extract de corn (Coarne+AuNP) comparativ cu extractul obținut din fructele de corn (Coarne) și cu luteolina (Luteolina) asupra stresului oxidativ, inflamației și apoptozei în celulele Caco-2 expuse la gliadină.

Material și metodă. Pentru identificarea efectelor luteolinei, ale extractului de Cornus mas și ale nanoparticulelor de aur (AuNP) funcționalizate cu extract de Cornus mas asupra celulelor Caco-2, s-a realizat pregătirea și caracterizarea extractului de fructe și a nanoparticulelor de aur, cultura celulelor și testarea viabilității, evaluarea stresului oxidativ, evaluarea inflamației și a căilor de semnalizare, evaluarea apoptozei, evaluarea celulelor cu ajutorul microscopiei electronice de transmisie.

Rezultate. S-au administrat AuNP funcționalizate cu extract de Cornus mas (Coarne+AuNP), extract de Cornus mas (Coarne) și luteolină (Luteolina) în celulele Caco-2 expuse sau nu la gliadină. Au fost analizați markerii stresului oxidativ (nivelul malondialdehidei-MDA, catalazei-CAT și superoxid dismutazei-SOD), răspunsul inflamator (inducibile nitric oxide synthase 2-NOS2, TNF- α , TNF-related apoptosis-inducing ligand-TRAIL), semnalizarea celulară și factorii de transcripție implicați în apoptoză (nuclear factor-kappa B-NF-kB și forma sa fosforilată-pNF-kB, Bcl-2-like

protein 4-BAX, B-cell lymphoma 2-BCL2, p53 protein-p53). Pre-tratamentul cu coarne+AuNP, coarne și luteolină a redus stresul oxidativ, activitatea NOS2, expresia NF-kB și pNF-kB. Tratamentul cu coarne și coarne+AuNP a crescut expresia p53 și a scăzut nivelul BCL2, efectul cel mai pronunțat observându-se la coarne+AuNP. Datele obținute au evidențiat că coarne+AuNP atenuează unele efecte asupra celulelor Caco-2 prin modularea stresului oxidativ, inflamației și apoptozei.

Concluzii. Gliadina a redat majoritatea mecanismelor implicate în patogeneza bolii, mai puțin apoptoza și procesele asociate. Pre-tratamentul cu coarne, coarne+AuNP sau luteolină a determinat efecte antioxidante și antiinflamatorii, creșterea expresiei p53, în special coarne+AuNP, indicând rolul lor ca tratament adjuvant promițător în BC.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

În această lucrare se observă polimorfismul clinic al BC, cu formele atipice și patologii asociate, unde educarea pacientului de a respecta în mod strict DFG are un rol foarte important în evoluția bolii. Aprofundarea acestei patologii, testarea persoanelor cu manifestări atipice și a celor cu risc crescut de BC ar putea conduce la o rată de diagnosticare mai mare și ar putea preveni complicațiile pe termen lung.

Întrucât cauza exactă a bolii nu a fost identificată, teza oferă o nouă perspectivă asupra patogenezei BC prin evaluarea genelor, a miARN-urilor circulante și prin analiza rețelelor de interacțiune miARN-ARNm. Înțelegerea mecanismelor moleculare și a căilor implicate în această boală, ar putea conduce la apariția de noi biomarkeri și terapii țintite. De asemenea, evaluarea legăturii dintre miR-194-5p, miR-449a și gena CCND1 ar putea oferi noi direcții de cercetare și oportunități de terapie personalizată și țintită.

Studiul realizat pe celule Caco-2 oferă și el informații importante în legătură cu mecanismele patogenetice ce stau la baza BC și managementul său terapeutic. Aceste celule sunt un model aparte in vitro, cu caracteristici asemănătoare epiteliului intestinului subțire, ce permit deplasarea nanoparticulelor dincolo de barierele epiteliale, la fel cum se realizează transportul celular în organism. Chiar dacă acest model nu este unul perfect, pentru că nu reproduce toate aspectele patogenetice ale bolii, utilizarea gliadinei pentru provocarea BC a declanșat majoritatea mecanismelor implicate în patogeneză. Coarne+AuNP, coarne și luteolina au avut efecte antioxidante și antiinflamatorii, au amplificat expresia p53, demonstrând rolul acestora ca tratament adjuvant promițător, în special al coarne+AuNP.

Această teză de doctorat și-a propus o abordare cât mai amplă a BC pornind de la caracteristicile clinice și paraclinice ale bolii până la evidențierea unor mecanisme patogenetice relevante pentru diagnosticul, tratamentul, urmărirea și prognosticul acestei boli.

ABSTRACT OF THE DOCTORAL THESIS

Possible courses in the evolution of celiac disease

Doctoral candidate **Elena-Maria Mureşan (căş. Domşa)**

Doctoral supervisor **Prof. dr. Vasile Andreica**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	13
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. General aspects	17
2. Etiopathogenesis	17
2.1. Environmental factors	17
2.2. Genetic factors	17
2.2.1. Role of microRNAs (miRNAs)	18
2.2.2. Role of long non-coding RNA (lncRNA)	20
2.3. Immune factors	22
2.4. Intestinal dysbiosis	23
2.5. Other pathogenetic factors	23
3. Clinical features and associated diseases	25
3.1. Clinical manifestations	25
3.2. Types of celiac disease	26
3.3. Associated diseases	27
4. Diagnosis	29
4.1. Serum tests	29
4.2. Genetic tests	29
4.3. Upper gastrointestinal endoscopy and histopathological examination	30
4.4. Additional tests	30
4.5. Diagnostic methods for refractory celiac disease	31
4.5.1. Adherence to diet and initial diagnosis of celiac disease	31
4.5.2. Upper gastrointestinal endoscopy and histopathological assessment	31
4.5.3. Identification of aberrant intraepithelial lymphocytes	31
4.5.4. Other investigating examinations	31
5. Complications	33
6. Treatment	33
7. Follow up of patients with celiac disease	35
8. Role of polyphenols and gold nanoparticles	35
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Working hypothesis / objectives	41
2. General methodology	41

3. Study 1 – Evaluation of clinical and paraclinical characteristic features of patients with newly diagnosed celiac disease and those with celiac disease on gluten-free diet	45
3.1. Introduction	45
3.2. Working hypothesis/objectives	46
3.3. Material and method	46
3.4. Results	48
3.5. Discussion	53
3.6. Conclusions	58
4. Study 2 – Assessment of certain genes and circulating microRNAs in patients with celiac disease	59
4.1. Introduction	59
4.2. Working hypothesis/objectives	60
4.3. Material and method	60
4.4. Results	63
4.5. Discussion	72
4.6. Conclusions	75
5. Study 3 – Effects of luteolin, Cornus mas extract and gold nanoparticles functionalized with Cornus mas extract on Caco-2 cells	77
5.1. Introduction	77
5.2. Working hypothesis/objectives	79
5.3. Material and method	79
5.4. Results	82
5.5. Discussion	91
5.6. Conclusions	94
6. General discussion	97
7. General conclusions	99
8. Originality and innovative contributions of the thesis	101
REFERENCES	103

Keywords: celiac disease, gluten-free diet, circulating microRNAs, genes, biomarkers, gliadin, gold nanoparticles, polyphenols, Caco-2 cells

INTRODUCTION

Celiac disease (CD) is a chronic autoimmune, multiorgan disease, with genetic predisposition, triggered by gluten ingestion, which determines characteristic serum and histological changes at the level of the small bowel. The exact cause of CD is not known. What is known is the existence of an exaggerated reaction of the intestinal mucosa in contact with gluten contained in certain cereals, which triggers intestinal or extra-intestinal manifestations. The disease may present under several clinical forms, which is the reason why many patients remain undiagnosed worldwide. In most cases diagnosis is established by determination of serum antibodies (type IgA anti-transglutaminase and anti-endomisium) and duodenal biopsy. Strict adherence to the gluten-free diet (GFD) is the only effective treatment of the disease. This prompts for the need of new or adjuvant therapies.

Recent years studies have evidenced the role of microRNAs (miRNAs) in the pathogenesis of celiac disease. They regulate gene expression and could represent biomarkers of clinical differentiation between patients, which may lead to a personalized management of the disease in the future.

There is no model at present which might reproduce the complexity of CD. In vitro models included different cell lines, among which Caco-2, which are accessible and easy to work with. They had a significant contribution to the pathogenesis of CD. Along time, various unconventional therapies have been attempted, with anti-inflammatory and antioxidant effects, such as polyphenols and materials functionalized with polyphenols, which might be recommended in the treatment of CD.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

Current state of knowledge is covered by 8 chapters. The chapters highlight the most important and recent data in literature regarding CD.

The first chapter, General aspects, includes the definition of CD as a chronic progressive disease and presents the epidemiological and clinical impact of the disease.

The second chapter, Etiopathogenesis, describes the various factors involved in CD, such as environmental, genetic, immune factors, intestinal dysbiosis, autonomous nervous system. The role of miRNAs in the CD pathogenesis is discussed, the fact that these molecules regulate certain genes, while further studies on miRNAs could elucidate their role as potential biomarkers.

The third chapter deals with the characteristic features of CD and its numerous digestive and extra-digestive manifestations, types of CD, from the classical to the refractory form, together with other conditions that may be associated.

The fourth chapter describes the methods of CD diagnosis, from specific serological and genetic test to endoscopic examination and other investigations. The diagnostic methods of refractory CD are also presented.

Chapter 5 presents the CD complications, from major ones, T cell lymphoma, to various infections, hyposplenism, collagenous enteritis, intestinal ulcers, bone mineral deficits, neoplasia.

Chapter 6 discusses the various therapeutic methods, with emphasis on gluten-free diet, which must be respected throughout life, being the only treatment universally accepted and effective at present.

Chapter 7 describes the follow-up strategies of patients, the situations in which biopsy should be repeated.

Chapter 8 presents the role of polyphenols and gold nanoparticles on the body. Studies have demonstrated various beneficial effects of phenolic compounds, such as antioxidant, anti-inflammatory, antimutagenic, anticancerous, antibacterial, antiviral, anti-ageing, immunomodulating, wound healing, reduction of cardiovascular risks and atherosclerotic risk, radioprotective, hair tonic, hormonal deposit in women at natural menopause. Polyphenols encapsulated in synergetic nanoparticles could contribute to the prevention and treatment of certain inflammatory diseases.

PERSONAL CONTRIBUTION

Study 1 – Evaluation of clinical and paraclinical characteristic features of patients with newly diagnosed celiac disease and those with celiac disease on gluten-free diet

Introduction. CD affects all ages, being more frequent in women. It has various manifestations: intestinal (abdominal pain, nausea, vomiting etc.) or extra-intestinal (iron-deficiency anemia, dermatitis herpetiformis, vitamin deficiencies, peripheral neuropathy, aphtous stomatitis etc.). The diagnosis is based on clinical, serological, histopathological and genetic tests (the latter in case of discrepancy between serum and histological tests, in patients already on GFD at the time of testing, in those at high risk – with autoimmune / genetic diseases, in family members). Treatment is life-long and consists of adherence to the GFD, which means educating and monitoring patients regarding this aspect. Among associated conditions are: Hashimoto's thyroiditis, type 1 diabetes, psoriasis, dermatitis herpetiformis, Addison's disease, autoimmune hemolytic anemia, sarcoidosis, Raynaud's syndrome, Sjogren's syndrome, systemic lupus erythematosus, autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis, irritable bowel syndrome, microscopic colitis and many other. In these patients it is important to assess complications such as T cell lymphoma, various types of infections, intestinal ulcers.

Working hypothesis / objectives. The aim of the study was to describe the clinical and paraclinical characteristic features of patients with newly diagnosed CD in comparison with those on GFD and analyze the differences between the two groups.

Material and method. The study participants were recruited among the patients of “Prof. dr. Octavian Fodor” Regional Institute of Gastroenterology and Hepatology, Cluj-Napoca, and 4th Medical Clinic, Cluj-Napoca, during 2015-2018. It was a prospective, analytical, observational study including 50 patients with CD, 16 at diagnosis and with gluten in their diet (Newly diagnosed CD) and 34 already on GFD for more than one year (CD on GFD). All the patients had a study record that included demographic, clinical and paraclinical data.

Results. Age at diagnosis, age at study entry, sex and background were similar in the two study groups. Most patients, from both groups, were females and from urban background; 56.2% of the newly diagnosed CD patients and 50% of those on GFD had extra-intestinal manifestations. Duration from disease onset to diagnosis had a median of 1 (0-2) in newly diagnosed CD and 0 (0-1) in GFD patients, the difference being statistically significant ($p=0.03$). Strict adherence to GFD was reported by 50% of the GFD patients. Most of the patients of both groups had normal bodyweights; 62.5% of the newly diagnosed and 58.8% of the GFD group were negative for specific antibodies. All the patients in the newly diagnosed group presented villous atrophy at histology. Over 50% of the GFD had Marsh-Oberhuber 3 histological stage. There were statistically significant differences between the groups ($p=0.03$). In patients with diverging histological and serum tests, HLA-DQ2 and/or HLA-DQ8 antigens were positive. A larger proportion of patients had negative *Helicobacter pylori* in both groups. Infectious complications were found in 2 newly diagnosed patients and 6 on GFD. In the newly diagnosed group the most frequent intestinal manifestations were bloating, abdominal pain and weight loss, while those on GFD complained of abdominal pain, weight loss, bloating and diarrhea. Regarding bloating, the p value was statistically significant between groups ($p=0.02$). The most frequent extra-intestinal manifestations in both groups were fatigue/asthenia, peripheral neuropathy in the lower limbs. The number of cases with thrombocytosis was higher in the newly diagnosed group compared to GFD, with statistical significance ($p=0.02$). The most frequent associated conditions were esophagus and stomach diseases, in both study groups.

Conclusions. This study evidenced the complexity of celiac disease, its diverse clinical manifestations and associated pathological conditions.

Study 2 – Assessment of certain genes and circulating microRNAs in patients with celiac disease

Introduction. CD pathogenesis is not fully elucidated yet. Some studies have investigated the implication of miRNAs in several digestive diseases, among which CD. The analysis of gene expression, protein-protein interactions and of various pathways

involved could contribute to a better understanding of the disease and discovery of new biomarkers for prognosis, diagnosis and therapy.

Working hypothesis / objectives. The aim of this study was to assess the expression of Wnt family member 3 (WNT3), Wnt family member 11 (WNT11), tumor necrosis factor alpha (TNF α), mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1), AKT serine/threonine kinase 3 (AKT3), phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha (PIK3CA), cyclin D1 (CCND1) and circulating miRNAs miR-192-5p, miR-194-5p, miR-449a, miR-638 in patients with CD, to evidence possible relationships with clinical aspects and their potential use as biomarkers.

Material and methods. The study participants were recruited among the patients of "Prof. dr. Octavian Fodor" Regional Institute of Gastroenterology and Hepatology, Cluj-Napoca, and 4th Medical Clinic, Cluj-Napoca, during 2015-2018. The prospective, analytical observational study was carried out on 58 patients, divided into 3 groups: group 1 - 15 patients with CD at diagnosis (Newly diagnosed); group 2 - 33 patients with CD on GFD for at least one year (GFD); group 3 - 10 controls (Control). Comparative analyses were performed between the 3 groups, Newly diagnosed, GFD and Control. To determine genes and miRNAs, blood samples were collected from all the subjects to obtain serum, plasma and leukocyte pellets (peripheral blood mononuclear cells - PBMC). Leukocyte extract was introduced into TriReagent solution and kept at -80°C.

Results. 60% of the patients with newly diagnosed CD and about 50% of those on GFD had extra-intestinal manifestations. Most patients with CD (about 60%) had negative antibodies at study entrance. In the GFD group, most patients were in Marsh-Oberhuber 3 stage (approximately 60%), while the percentage strictly complying with the GFD was 51.5%. The majority of the genes examined were overexpressed in the CD patients compared to controls. Of the seven genes, TNF α , MAPK1 and CCND1 had significantly increased values in the newly diagnosed group ($p=0,0249$, $p=0,0019$, $p=0,0275$) compared to controls. In the GFD group gene expression was increased compared to the newly diagnosed group, but without statistical significance. Among the circulating miRNAs assessed, miR-194-5p had values close to statistical significance in the newly diagnosed group, compared to controls ($p=0,0510$), and also in the GFD group compared to controls ($p=0,0671$). The other miRNAs were either overexpressed or underexpressed in the groups that were compared to controls. Most miRNAs had higher expression in the GFD group compared to the newly diagnosed group, without statistical significance. The DIANA-miRPath program evidenced intense functional activity of miR-192-5p and miR-449a. The integrative analysis of miRNAs and mRNAs using miRNet platform evidenced interactions between miR-194-5p, miR-449a and CCND1 gene.

Conclusions. The majority of the genes and circulating miRNAs had high values in CD patients compared to controls. Among the genes assessed, TNF α , MAPK1 and CCND1 had statistically significant values in the newly diagnosed group compared to

controls. Regarding the miRNAs expression, miR-194-5p had values close to statistical significance in both study groups in comparison to controls.

Study 3 – Effects of luteolin, Cornus mas extract and gold nanoparticles functionalized with Cornus mas extract on Caco-2 cells

Introduction. Studies have shown that gliadin has cytotoxic or immunomodulating effects, inducing oxidative stress and release of proinflammatory cytokines. At present there is no model that could precisely reproduce the complexity of CD. The analysis of the epithelial barrier function is based mainly on Caco-2 cells or intestinal biopsies. The effect of gluten on Caco-2 cells was reflected in the increased level of inflammatory cytokines. Caco-2 cells contributed to the pathogenesis of CD regarding the role of intestinal microbiome. Many studies have been published on polyphenols and materials functionalized with polyphenols. Due to their anti-inflammatory, antioxidant and intestinal barrier promotion capacity, polyphenols could play a role in the treatment of CD.

Working hypothesis / objectives. Our study investigated the effects of gold nanoparticles functionalized with polyphenols from Cornus mas extract (Cornus mas+AuNP) compared to Cornus mas fruit extract (Cornus mas) and luteolin (Luteolin) on oxidative stress, inflammation and apoptosis of Caco-2 cells exposed to gliadin.

Material and method. In order to evidence the effects of luteolin, Cornus mas extract and gold nanoparticles (AuNP) functionalized with Cornus mas extract on Caco-2 cells, we performed the preparation and characterization of fruit extracts and gold nanoparticles, cell culture, viability testing, assessment of oxidative stress, inflammation and signaling pathways, apoptosis and cells by using transmission electron microscopy.

Results. AuNP functionalized with Cornus mas extract (Cornus mas+AuNP), Cornus mas extract (Cornus mas) and luteolin (Luteolin) were administered into Caco-2 cells exposed or not to gliadin. Markers of oxidative stress were analyzed (malondialdehyde-MDA, catalase-CAT and superoxide dismutase-SOD levels), inflammatory response (inducible nitric oxide synthase 2-NOS2, TNF- α , TNF-related apoptosis-inducing ligand-TRAIL), cellular signaling and transcription factors involved in apoptosis (nuclear factor-kappa B-NF-kB and its phosphorylated form -pNF-kB, Bcl-2-like protein 4-BAX, B-cell lymphoma 2-BCL2, p53 protein-p53). Pre-treatment with Cornus mas+AuNP, Cornus mas and luteolin reduced oxidative stress, NOS2 activity, NF-kB and pNF-kB expression. Treatment with Cornus mas and Cornus mas+AuNP increased p53 expression and lowered BCL2 level, the most marked effect being with Cornus mas+AuNP. The data obtained evidenced that Cornus mas+AuNP lessens some of the effects on Caco-2 cells by modulating oxidative stress, inflammation and apoptosis.

Conclusions. Gliadin reproduced most of the mechanisms involved in the CD pathogenesis, except apoptosis and associated processes. Pre-treatment with Cornus mas, Cornus mas+AuNP or luteolin had antioxidant and anti-inflammatory effects, increased p53 expression, especially Cornus mas+AuNP, pointing to their promising role as additional therapy of CD.

Originality and innovative contributions of the thesis

This scientific work has evidenced the clinical polymorphism of CD, with atypical forms and associated conditions, the absolute necessity for the patient to strictly comply with the GFD. A deeper insight into the mechanisms of the disease, testing of people with atypical manifestations and high risk of CD could lead to a higher diagnostic rate and could prevent long-term complications.

As the exact cause of the disease has not been identified, this thesis offers a new perspective on the pathogenesis of CD, by assessing genes, circulating miRNAs and interaction networks between miRNA-mRNA. Understanding of the molecular mechanisms and pathways involved in this disease could lead to the identification of novel biomarkers and targeted therapies. Also, the evaluation of the links between miR-194-5p, miR-449a and CCND1 gene could open new direction of research and opportunities for personalized and targeted therapies.

The study on Caco-2 cells also provided useful information regarding the pathogenetic mechanisms that lie at the basis of CD and its management. These cells represent a special model in vitro, having characteristic features similar to the small bowel epithelium, allowing the movement of nanoparticles across epithelial barriers, like the cellular transport in the body. Even though it is not a perfect model, as it does not reproduce all the pathogenetic aspects of the disease, the use of gliadin to induce CD triggered most mechanisms involved in pathogenesis. Cornus mas+AuNP, Cornus mas and Luteolin had antioxidant and anti-inflammatory effects, enhanced p53 expression, documenting their role as a promising adjuvant therapy, especially Cornus mas+AuNP.

This doctoral thesis has aimed at an ample approach of celiac disease, starting from its clinical and paraclinical features to the evidence of pathogenetic mechanisms that are relevant for the diagnosis, therapy, follow-up and prognosis of this disease.