



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale

Biologia Molecolare e Applicata (LM-6)

CELIACHIA: RUOLO DEI GENI DI SUSCETTIBILITA'

CELIAC DISEASE: ROLE OF SUSCEPTIBILITY GENES

Tesi di Laurea Magistrale di:

Nazario Angeloro

Relatore: Chiar.ma Prof.ssa Adriana Canapa

Correlatori: Dott. Giuseppe Cappucci

Dott.ssa Mariagrazia Savino

SOMMARIO

| | |
|---|----|
| ABSTRACT..... | 1 |
| SCOPO DELLA TESI..... | 2 |
| INTRODUZIONE..... | 3 |
| CAPITOLO 1..... | 4 |
| 1.1. LA CELIACHIA..... | 4 |
| 1.2. EVOLUZIONE DELLA CELIACHIA NEGLI ANNI..... | 4 |
| 1.2.1. CELIACHIA COME INTOLLERANZA AL GLUTINE..... | 5 |
| 1.2.2. CELIACHIA COME “INFEZIONE” CRONICA | 6 |
| 1.2.3. ASSOCIAZIONE TRA CELIACHIA E REAZIONI AUTOIMMUNI..... | 6 |
| 1.3. EZIOLOGIA E PATOGENESI..... | 7 |
| 1.3.1. SFONDO GENETICO..... | 8 |
| 1.3.2. FATTORI AMBIENTALI | 13 |
| 1.4. PATOLOGIA | 13 |
| 1.5. DIAGNOSI..... | 14 |
| 1.5.1. DIAGNOSI SIEROLOGICA..... | 14 |
| 1.5.2. DIAGNOSI ISTOLOGICA..... | 15 |
| 1.5.3. TIPIZZAZIONE HLA | 16 |
| 1.6. TRATTAMENTO | 17 |
| CAPITOLO 2..... | 18 |
| 2. MATERIALI E METODI | 18 |

| | |
|---|----|
| 2.1. PAZIENTI..... | 18 |
| 2.2. ISOLAMENTO ED ESTRAZIONE DEL DNA..... | 19 |
| 2.3. QUALITY CONTROL | 20 |
| 2.5. PCR-SSP: SEQUENCE SPECIFIC PRIMERS | 23 |
| 2.6. ELETTROFORESI SU GEL D'AGAROSIO..... | 24 |
| CAPITOLO 3 | 25 |
| 3. RISULTATI..... | 25 |
| 3.1. TIPIZZAZIONE HLA..... | 25 |
| 3.2. VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DOSE | 28 |
| 3.3. CORRELAZIONE TRA CELIACHIA E ASSENZA DI ALLELI | 35 |
| CAPITOLO 4..... | 37 |
| 4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI..... | 37 |
| 5. RIFERIMENTI | 43 |

ABSTRACT

La celiachia è una malattia con eziologia multifattoriale, sostenuta dall'esposizione al glutine e anche da una predisposizione genetica. Circa il 90% degli individui con morbo celiaco, infatti, è portatore di eterodimeri DQ2.5, codificati dagli alleli DQA1*05 e DQB1*02, e/o molecole DQ8, codificate da DQB1*03:02 e DQA1*03. In un minor numero di casi la celiachia si verifica in individui positivi per gli eterodimeri DQ2.x, codificati da alleli DQA1 diversi da DQA1*05 e DQB1*02, e molto raramente in pazienti negativi per questi marcatori predisponenti. La tipizzazione molecolare HLA degli eterodimeri DQ2 e DQ8 permette di valutare la predisposizione genetica per la malattia ed è un importante strumento in grado di discriminare gli individui geneticamente suscettibili alla celiachia nei gruppi a rischio (parenti di primo grado dei pazienti celiaci) da quelli con assenza di tali aplotipi, con un alto valore predittivo negativo. Pur tuttavia, l'assenza di uno dei due aplotipi DQ2 e DQ8 o di entrambi non ha un valore predittivo negativo in senso assoluto, in quanto è possibile, in una piccola percentuale di casi, osservare il morbo celiaco anche in loro assenza e in associazione ad alcune malattie genetiche (sindromi di Down, Turner o Williams) o autoimmuni. In questo studio, oltre a confermare i dati di letteratura, è anche descritta la malattia celiaca in associazione ad alcune sindromi genetiche e/o autoimmuni in assenza di predisposizione genetica.

SCOPO DELLA TESI

L'obiettivo di questo studio era capire il ruolo centrale che gioca la predisposizione genetica per lo sviluppo della celiachia ed evidenziare casi di malattia non sostenuti da una base genetica.

A questo proposito si è proceduto valutando tre aspetti:

- 1- Se la presenza di un maggior numero di alleli codificanti per DQ2 e/o DQ8 sia un fattore che concorra ad un maggior rischio di malattia;
- 2- Se la presenza di un solo allele codificante per una sola catena di DQ2 o di DQ8 sia sufficiente a scatenare la celiachia;
- 3- Se la celiachia può manifestarsi in soggetti non portatori di alleli codificanti per DQ2 e DQ8.

Per rispondere a queste domande è stata effettuata la tipizzazione HLA su soggetti con familiarità e/o su soggetti che mostravano sintomi attribuibili al morbo celiaco.

INTRODUZIONE

La malattia celiaca è una condizione permanente di sensibilità al glutine che porta ad un danno all'intestino tenue con conseguente malassorbimento di nutrienti ed infiammazione della mucosa intestinale. Il mancato assorbimento di nutrienti e la mucosa intestinale infiammata possono indurre un disturbo generale dell'immunità mucosale che può portare allo sviluppo di malattie autoimmuni che coinvolgono altri organi ed apparati ed in alcuni casi possono favorire l'insorgenza di linfomi. Questa malattia si sviluppa prevalentemente nei soggetti che presentano HLA di classe II con aplotipo DQ2/DQ8 e dopo esposizione a cibi contenenti glutine. Questa è una condizione necessaria ma non sufficiente allo sviluppo della malattia. Il modello attuale della malattia non è in grado di spiegare questo fenomeno nonostante più di 20 studi di associazione "genome wide associations studies" (GWAS) hanno cercato, senza riuscirci, di identificare singoli geni responsabili di questa diversità.

CAPITOLO 1

1.1. LA CELIACHIA

La celiachia, detta anche morbo celiaco, è un'inflammatione cronica dell'intestino tenue, scatenata dall'ingestione di glutine in soggetti geneticamente predisposti. L'intolleranza al glutine è contrastata dall'organismo con la produzione di una severa risposta anticorpale che è la vera causa del danno alla mucosa intestinale e della conseguente ridotta capacità di assorbimento da parte dell'intestino. Una risposta anticorpale ripetuta nel tempo può anche determinare sviluppo di altre malattie autoimmuni che coinvolgono altri organi ed apparati ed in alcuni casi possono favorire l'insorgenza dei linfomi. [Guandalini S. 2014]

La celiachia si manifesta, dopo l'introduzione del glutine nella dieta, con una enteropatia infiammatoria a diversi gradi di severità dalla quasi assenza di segni e sintomi a importante malnutrizione dovuta all'appiattimento dei villi nell'intestino tenue e quindi alla forte riduzione della superficie di assorbimento di questo organo.

1.2. EVOLUZIONE DELLA CELIACHIA NEGLI ANNI

La celiachia è una malattia descritta scientificamente in età contemporanea. Le teorie sulla sua patogenesi sono cambiate molto da quando è stata scoperta ad oggi, grazie alle nuove tecnologie che hanno permesso di capire sempre meglio la malattia a livello molecolare. Ad oggi la patogenesi della celiachia non è del tutto chiara, ripercorrere le tappe dello studio della malattia ci permette di avere un quadro più completo delle varie teorie che cercano o hanno provato a spiegarla.

La celiachia è stata descritta per la prima volta dal medico greco Areteo di Cappadocia vissuto nell'impero romano nel primo secolo A.C. Areteo osservò e descrisse una malattia intestinale con diarrea untuosa, pallore e perdita di peso. Dopo questa descrizione passarono quasi 2000 anni senza altre descrizioni della malattia. Verso la fine del 1800 il medico inglese Samuel Gee descrisse la medesima malattia ed influenzato dagli scritti di Areteo la chiamò celiachia riprendendo la parola greca “koiliakos” che significa addome. Gee osservò che la malattia si verificava in persone di qualsiasi età anche se il maggior numero dei casi si riscontrava tra i bambini con un'età compresa tra 1 e 5 anni. Le persone affette da questa malattia presentavano delle feci liquide in grande quantità e dall'aspetto chiaro, presentavano inoltre debolezza muscolare, cachessia, pallore e gonfiore.

Per spiegare questa malattia Gee ipotizzò che si trattasse di un'indigestione cronica dei carboidrati, potenzialmente curabile modificando la dieta. [Tommasini A. 2011] [Aziz I. 2015]

1.2.1.CELIACHIA COME INTOLLERANZA AL GLUTINE

Nel 1952, il medico australiano Charlotte M. Anderson, dimostrò che la celiachia non è da attribuirsi all'indigestione dei carboidrati ma si tratta di un'intolleranza al glutine che si sviluppa dopo la sua ingestione. In questo stesso periodo furono osservate, attraverso biopsie intestinali, le lesioni tipiche della celiachia ovvero un appiattimento dei villi intestinali inducendo una riduzione della superficie assorbente dell'intestino e favorendo infiltrazioni di linfociti nella mucosa. Le analisi istologiche condotte sulle biopsie intestinali cominciarono ad essere usate per

diagnosticare la celiachia che iniziò ad essere considerata una malattia rara con una prevalenza di 1:5000.

[Anderson C. 1952] [Tommasini A. 2011] [Aziz I. 2015]

1.2.2.CELIACHIA COME “INFEZIONE” CRONICA

Negli anni '60 vennero indentificati anticorpi anti-glutine nei pazienti celiaci. Si ipotizzò che il glutine potesse essere l'agente responsabile della malattia e che venisse riconosciuto dall'organismo come un patogeno verso il quale il sistema immunitario produceva anticorpi. Nello stesso periodo si capì che alcuni polimorfismi nei geni che codificano per il complesso maggiore di istocompatibilità (HLA) aumentavano il rischio di sviluppare la malattia e questo rafforzò ancora di più questa idea. Grazie alla diagnosi sierologica vennero identificati casi di celiachia con sintomi molto più lievi di quella conosciuta fino ad ora. Questa forma di celiachia con anticorpi anti-glutine, le tipiche alterazioni del lume intestinale ed una sintomatologia molto più lieve venne chiamata “celiachia silente”. Comprendendo anche questi casi più lievi nella cliachia, si arrivava ad avere una prevalenza di 1:250. [Tommasini A. 2011] [Aziz I. 2015]

1.2.3.ASSOCIAZIONE TRA CELIACHIA E REAZIONI AUTOIMMUNI

Negli anni '70, grazie a nuove tecniche di immunofluorescenza, venne osservata nei soggetti celiaci la formazione di anticorpi in grado di legarsi a proteine dell'organismo. In particolare furono individuati degli anticorpi in grado di legarsi al tessuto connettivo di sostegno del muscolo liscio e furono chiamati anticorpi anti endomisio (EMA). Questi furono utilizzati

per la diagnosi della celiachia e permisero di individuare alcuni soggetti positivi agli anticorpi anti-endomisio che non presentavano i segni e i sintomi della malattia ma solo un'infiltrazione di leucociti nella mucosa intestinale con una preponderanza di linfociti. Questa forma di celiachia fu chiamata "celiachia latente".

La proteina target degli EMA non venne individuata fino al 1997 quando il gruppo di Walburga Dieterich la identificò con la trans-glutaminasi tissutale (tTG). [Dieterich W. 1997] [Tommasini A. 2011] [Aziz I. 2015]

Lo sviluppo di questi autoanticorpi aprì la porta all'associazione tra la celiachia e l'autoimmunità. Nei soggetti predisposti il glutine è un fattore di rischio per l'insorgenza di malattie autoimmuni e il rischio aumenta all'aumentare del tempo di esposizione agli alimenti che lo contengono. [Catassi C. 1995] [Ventura A. 1999] [Tommasini A. 2011] [Aziz I. 2015]

1.3. EZIOLOGIA E PATOGENESI

La celiachia è una malattia multifattoriale. In quanto tale, è il risultato dell'interazione tra fattori genetici e ambientali. I genotipi DQ2 e DQ8 sono stati ben descritti in letteratura come fattori predisponenti importanti e necessari. È ormai sempre più riconosciuto che molteplici fattori ambientali sono attori chiave come il microbiota, la quantità e la tempistica dell'esposizione iniziale al glutine, le infezioni e i modelli di alimentazione [Sabatino e Corazza, 2009 ; Tjon *et al* , 2010 ; Fasano e Catassi, 2011 ; Lionetti e Catassi, 2011].

1.3.1.SFONDO GENETICO

Sebbene l'esatta base genetica della malattia non sia stata determinata, alcuni individui sembrano essere geneticamente predisposti a sviluppare la malattia. I marcatori che sono stati particolarmente associati al morbo celiaco sono gli eterodimeri HLA-DQ2 e/o DQ8. Esiste una notevole influenza genetica nella malattia celiaca, con il 90-100% degli individui malati che possiedono la molecola HLA di classe II DQ2 e/o DQ8 rispetto al 30% della popolazione generale. [Doolan A. et al, 2005]

Queste molecole sono espresse sulla superficie della cellula presentante l'antigene nella lamina propria dell'intestino e svolgono un ruolo centrale nella patogenesi della malattia celiaca perché sono responsabili della presentazione di peptidi di glutine modificati alle cellule T CD4+, suscitando così una risposta immunitaria specifica per il glutine. [Molberg *et al* , 1997 ; van Belzen *et al* , 2004]

Infatti, entrambe le molecole, nella loro struttura, possiedono tasche con residui amminoacidici carichi positivamente necessari per legare peptidi con carica negativa. Il glutine è una molecola altamente eterogenea ricca di residui di glutamina e prolina che l'intestino umano non riesce a digerire completamente. Di conseguenza, i peptidi di glutine intatti rimangono nel lume e alcuni attraversano la barriera intestinale. Dopo aver attraversato il compartimento sottomucoso, tali frammenti entrano in contatto con l'enzima ubiquitario tTG che li deamida, generando peptidi con carica negativa, ideali per interagire con le molecole HLA-DQ2 e/o DQ8. Successivamente, i peptidi del glutine deamidato vengono presentati alle cellule T CD4 + che innescano la reazione infiammatoria secondaria al

rilascio di IFN- γ e all'attivazione dei linfociti intraepiteliali citotossici CD8 +. Non è ancora noto come il tTG, che normalmente è intracellulare e nella sua forma inattiva, sia attivato e capace di provocare la reazione di deamidazione dei peptidi del glutine. [Krini M. et al, 2012]

Le proteine HLA-DQ (DQ) sono codificate dai geni del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe II localizzati sul braccio corto del cromosoma numero 6, (6p21.3), storicamente nota come regione dell'antigene "D" (regione HLA-D). [Sciurti M. et al, 2018]

Questa regione comprende i geni HLA-DP, DQ e DR, che codificano per le molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II. Queste, strutturalmente, sono costituite da due diverse subunità, una catena α e una catena β a formare un $\alpha\beta$ -eterodimero.

Ogni subunità di DQ2 e di DQ8 è codificata dal proprio gene. La subunità α è codificata dal gene *HLA-DQA1* e la subunità β è codificata dal gene *HLA-DQB1*. Entrambi i loci sono caratterizzati da un'ampia variabilità genetica nella popolazione umana. [Krini M. et al, 2012]. Nello specifico, le catene alfa e beta che costituiscono l'eterodimero DQ2 sono codificate rispettivamente dagli alleli HLA DQA1*05 e DQB1*02; invece, le catene alfa e beta dell'eterodimero DQ8 sono codificate rispettivamente dagli alleli DQA1*03 e DQB1*03:02. [Siddiqui K. et al, 2021]

Più raramente, i pazienti affetti da celiachia sono portatori di molecole DQ2.X in cui gli eterodimeri alpha/beta sono codificati dagli alleli DQA1 \neq *05 e DQB1*02 rispettivamente.



Figura 1: Molto raramente, i pazienti affetti da celiachia sono portatori di diverse molecole DQ. Qui si indicano come DQX.5 gli eterodimeri codificati dall'allele DQA1*05 in assenza di varianti DQB1*02 o *03:02 mentre le molecole DQX.x sono formate da una catena alfa DQA1 ≠ *05 e da una catena DQB1 ≠ *02 o ≠ *03:02 catena beta.

I loci DQ, come detto, sono in stretto legame genetico con HLA-DR ma sono meno strettamente legati a HLA-DP, HLA-A, HLA-B e HLA-C.

Esiste infatti una forte associazione (linkage disequilibrium) tra gli aplotipi DQ2 e DQ8 con il DRB: si tratta, cioè, di geni contigui sul cromosoma 6. Infatti la maggior parte dei pazienti con malattia celiaca presenta nella stessa regione cromosomica, in sequenza, gli alleli DRB1*03, DQA1*05:01 e DQB1*02:01 (si parla di aplotipo DR3 o anche aplotipo DQ2); in altri casi si osservano in sequenza gli alleli DRB1*04, DQA1*03:01 e DQB1*03:02 (si parla di aplotipo DR4 o anche aplotipo DQ8). Gli alleli DQA1 e DQB1, codificanti per le catene alfa e beta di DQ2, possono trovarsi sullo stesso cromosoma come nell'aplotipo DR3 (configurazione cis); oppure le due catene dell'eterodimero DQ2 possono

essere codificate in trans (gli alleli DQA1 e DQB1 sono localizzati su cromosomi omologhi). Nella configurazione trans l'allele DQA1*05:05 è in associazione con DRB1*11 o DRB1*12 o DRB1*13 e l'allele DQB*02:02, localizzato sul cromosoma omologo rispetto a quello in cui è presente DQA1, è in associazione con l'allele DRB*07. [Krini M. et al, 2012].

In sintesi, gli alleli HLA-DQA1*05 e DQB1*02 potrebbero essere ereditati in una delle due configurazioni: DQ2.5 cis, sullo stesso cromosoma; o DQ2.5 trans, dove ogni allele è localizzato su uno dei due cromosomi omologhi e quindi ereditati ciascuno da ciascun genitore. Il DQ2.5 cis appare molto spesso, come detto, in linkage con DRB1*03:1, che venne inizialmente associato al rischio di malattia celiaca.

Circa il 90-95% dei pazienti celiaci è positivo per alleli che codificano per l'HLA-DQ2 e più specificatamente per HLA-DQ2.5 in cis o in trans (figura 2).

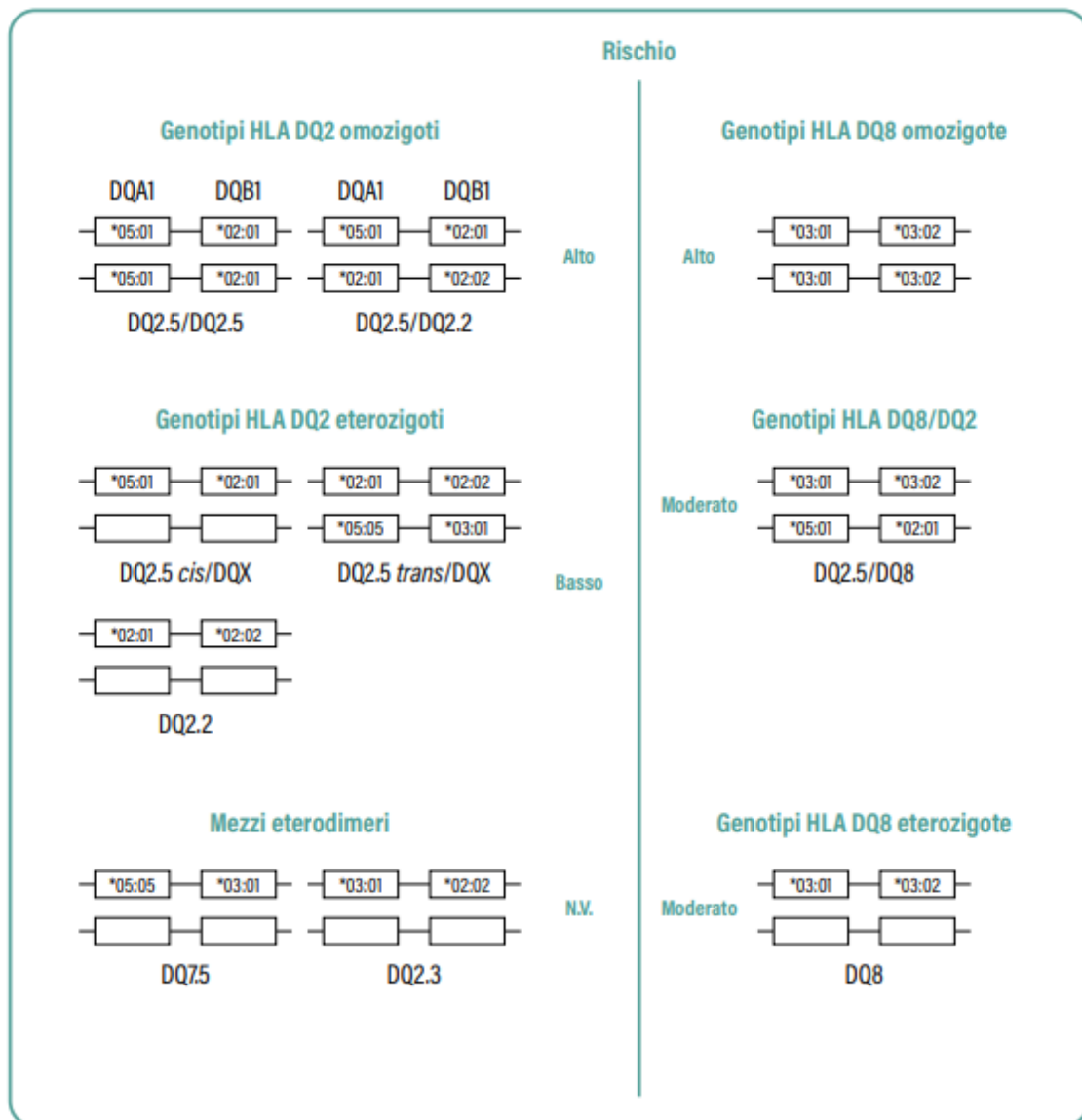


Figura 2. Genotipi HLA associati a morbo celiaco.

Il 12% dei soggetti celiaci, invece, presenta l'eterodimero HLA-DQ8; e solo circa il 3% circa dei celiaci presenta entrambi gli eterodimeri. [Siddiqui K., et al, 2021]. Molto raramente si osservano soggetti celiaci con metà eterodimero come nella molecola HLA-DQ2.3 o nella HLA-DQ7.5

Seppure molto raramente, sono stati riportati nella malattia celiaca dei genotipi HLA non-DQ2, non-DQ8. In uno studio americano la frequenza di

individui EMA positivi ma negativi per HLA -DQ2 e - DQ8 era assai ridotta (0.16 %).

In definitiva, la presenza di questi alleli è necessaria ma non sufficiente per lo sviluppo della malattia: infatti, sebbene l'allele HLA-DQ2 sia comune nella popolazione bianca (il 30.0 % delle persone è portatore), quasi il 3.0 % di loro svilupperà la celiachia. Il rischio di sviluppare la celiachia per le persone portatrici degli alleli a rischio è stimato tra il 36.0 e il 53.0 %. Studi di linkage genetico hanno finora identificato altre tre regioni cromosomiche ufficialmente riconosciute come fattori genetici predisponenti per la malattia celiaca: 5q31-q33 (CELIAC2), 2q33 (CELIAC3) e 19p13.1 (CELIAC4). [Sciurto M. et al, 2018]

1.3.2.FATTORI AMBIENTALI

L'unico fattore ambientale ben definito necessario per lo sviluppo della celiachia è ovviamente il glutine. Tuttavia, è stata fornita un'ampia mole di prove, specialmente negli ultimi anni, che altri fattori sono coinvolti e possono entrare in gioco in varie forme. Tra questi, l'influenza che le abitudini alimentari hanno sullo sviluppo immunitario, la composizione del microbiota intestinale e l'effetto a lungo termine delle infezioni acquisite durante l'infanzia [Pozo R. et al 2012].

1.4. PATOLOGIA

L'impatto dei processi fisiopatologici sopra delineati è uno stato infiammatorio dell'intestino tenue che provoca un profondo squilibrio nell'architettura della mucosa, con appiattimento dei villi, infiltrazione di linfociti nell'epitelio e aumento della densità e profondità delle cripte (figura 3). Questi cambiamenti si verificano in un continuum,

passando dal normale a un completo appiattimento dei villi in una lenta progressione. La figura mostra i cambiamenti progressivi, come descritto da Marsh [Marsh, 1992].

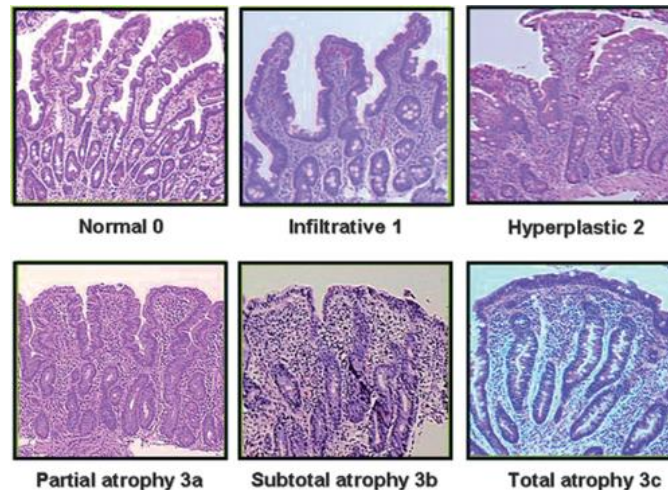


Figura 3. Architettura della mucosa intestinale

1.5. DIAGNOSI

1.5.1. DIAGNOSI SIEROLOGICA

La diagnosi si basa sui test sierologici, il cui scopo è la ricerca degli autoanticorpi prodotti dall'attivazione dei linfociti B in seguito all'ingestione di glutine, e sulla biopsia dell'intestino tenue.

Secondo la Società Europea di Gastroenterologia Pediatrica, Epatologia e Nutrizione (ESPGHAN), la diagnosi di malattia celiaca può essere confermata da un aumento del titolo anticorpale specifico associato ad un'alterazione della mucosa duodenale osservata all'analisi istologica, o se il titolo anticorpale supera di 10 volte i limiti superiori in associazione ai sintomi tipici del malassorbimento.

La diagnosi sierologica di celiachia si basa sulla presenza dei seguenti anticorpi: anticorpi antigliadina (AGA), immunoglobuline A (IgA) e immunoglobuline G (IgG); anticorpi antiendomio (anti-EmA); anticorpi transglutaminasi anti-tissutale (anti-tTG) e gliadina antideamidata peptide (anti-DGP). L'AGA è diventato obsoleto e non è più raccomandato per la diagnosi nella popolazione adulta a causa dei suoi bassi livelli di sensibilità e specificità. tTG-IgA è stato raccomandato come il singolo test sierologico più efficiente per il rilevamento di celiachia, mentre EMA-IgA può essere utilizzato come test di conferma in caso di risultati borderline positivi (bassi titoli) o possibilmente falsi positivi di test per anti-tTG IgA che possono verificarsi in altre malattie autoimmuni. [Schiavon N. et al, 2017].

È disponibile un nuovo biomarcatore sierologico per la celiachia, il neo-epitopo tTg (tTg-neo), con elevata sensibilità e specificità. La tTg-neo IgG ha dimostrato prestazioni migliori rispetto alla tTg-IgA ed è stata raccomandata come nuova tecnica diagnostica per CD. Poiché nessun test diagnostico è efficace al 100% nella diagnosi di CD, si raccomanda una ricerca combinata di anticorpi celiaci per un'accuratezza diagnostica ottimale. [Lerner A., 2016]

1.5.2. DIAGNOSI ISTOLOGICA

La biopsia dell'intestino tenue è stata fondamentale per la conferma della diagnosi di celiachia sin dalla fine degli anni '50. Al giorno d'oggi, le biopsie duodenali distali (4-8 frammenti) rivelano reperti istologici tipici: atrofia dei villi, iperplasia delle cripte e infiltrato infiammatorio linfocitario. [Nadhem ON. et al, 2015].

È importante sottolineare che la sierologia positiva con istologia normale, precedentemente denominate celiachia latente, è ora definita celiachia potenziale [Ciclitira PJ. et al, 2001].

La biopsia dell'intestino tenue viene eseguita durante l'esofagogastroduodenoscopia (EGDS) ed è seguita dall'analisi istologica. Il grado di attività della malattia in base ai risultati istologici sulla biopsia è classificato in base ai criteri di Marsh-Oberhuber.

L'American College of Gastroenterology raccomanda il test dell'antigene leucocitario umano (HLA) per DQ2 e DQ8 in caso di disaccordo tra risultati sierologici e istologici [Tapia R. et al, 2013]; tuttavia, alcuni autori eseguono la determinazione dell'HLA in pazienti con anti-tTG positivi ed EmA negativi per identificare risultati tTG falsi positivi [Tampona M. et al, 2006].

1.5.3. TIPIZZAZIONE HLA

La presenza di una delle combinazioni HLA DQ2 e/o HLA DQ8, di predisposizione genetica, determina un aumento del rischio di celiachia, mentre l'assenza delle stesse rende del tutto improbabile lo sviluppo della malattia.

La tipizzazione HLA è un test genetico che pur non avendo un significato diagnostico assoluto può contribuire a risolvere casi dubbi; viene soprattutto utilizzato per il suo significato predittivo negativo in quanto soggetti negativi per DQ2, DQ8 e DQB1*02 ammalano molto raramente.

L'indagine HLA è indicata come test di II livello in caso di incertezza diagnostica (p.e. anticorpi e/o biopsia dubbi o discrepanti) o in soggetti

appartenenti a categorie a rischio, cioè familiari di celiaci (genitori, figli e fratelli) e pazienti affetti da malattie associate alla celiachia.

Il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) è formato dagli antigeni HLA (Human Leukocyte antigen) codificati da differenti geni. Si tratta un complesso poligenico e polimorfico tanto che esiste una notevole variabilità antigenica dovuta a differenze anche per un solo amminoacido. Il polimorfismo allelico può essere individuato solo utilizzando tecniche molecolari capaci di cogliere e mettere in risalto tali differenze.

Gli antigeni HLA sono stati inizialmente definiti utilizzando tecniche di microlinfocitotossicità sierologica che utilizzavano una batteria di antisieri accuratamente selezionati per riconoscere distinti HLA sulla superficie dei linfociti. Negli ultimi 20 anni, tecniche di tipizzazione più precise basate sul DNA hanno sostituito i metodi sierologici nelle applicazioni cliniche. Diversi metodi molecolari sono utilizzati per la tipizzazione HLA (*Sequence Specific Primers-PCR*; analisi Reverse Dot Blot e Real Time PCR) e, recentemente, sono stati sviluppati diversi kit commerciali per genotipizzare specificamente gli alleli DQA1/DQB1 associati alla celiachia (DQA1*05, DQB1 *02 e DQB1*03:02) per test più semplici e rapidi.

1.6. TRATTAMENTO

Finora, l'unico trattamento disponibile ed efficace per la celiachia è l'adozione di una dieta priva di glutine per tutta la vita, che potrebbe portare alla normalizzazione dei parametri sierologici e alla regressione del danno mucoso.

CAPITOLO 2

2. MATERIALI E METODI

E' stato condotto uno studio trasversale che includeva 306 pazienti con tecnica di campionamento intenzionale non casuale. Tutti i campioni sono stati raccolti presso il Laboratorio di Immunogenetica dell'Ospedale Casa Sollievo della Sofferenza.

2.1. PAZIENTI

Nel periodo gennaio 2021 - settembre 2021 sono stati esaminati per questo studio 306 campioni di DNA di pazienti, afferenti presso il laboratorio HLA dell'ospedale Casa Sollievo della Sofferenza per una diagnosi di predisposizione genetica di celiachia. I soggetti in esame erano così suddivisi:

- 1) 63 soggetti con sintomi di celiachia e positività sierologica;
- 2) 126 soggetti con sintomi di celiachia e assenza di positività sierologica;
- 3) 104 soggetti con sintomi di celiachia senza aver effettuato il dosaggio sierologico degli anticorpi,
- 4) 13 soggetti con una storia familiare di celiachia;

I pazienti del primo gruppo presentavano un profilo anticorpale differenziato: alcuni di essi era negativo per tutti gli anticorpi (EMA, tTG, AGA) nonostante la sintomatologia caratteristica; altri erano positivi solo ad alcuni anticorpi; e in ultimo c'erano casi di positività a tutti gli anticorpi.

Il dosaggio anticorpale è stato effettuato in altri laboratori e non è stato oggetto di studio per questo lavoro, ma uno strumento di supporto.

Il campione di ciascun paziente è stato sottoposto al seguente iter diagnostico.

2.2. ISOLAMENTO ED ESTRAZIONE DEL DNA

Per la ricerca dell'aplotipo di interesse, il DNA di ciascun paziente è stato ottenuto da leucociti presenti nel sangue periferico prelevato e posto in provette contenenti l'anticoagulante EDTA. Tali provette venivano congelate alla temperatura di $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ per favorire la lisi delle membrane cellulari.

Per l'isolamento del DNA, si è utilizzato un estrattore automatico e un kit specifico (Blood DNA Extraction kit), che permettono la purificazione di DNA genomico da sangue intero e buffy coat. Tale kit si basa sulla tecnologia delle biglie magnetiche usate per catturare il DNA in soluzione. Eliminando il materiale extracellulare non legato si otteneva un campione di acido nucleico purificato.

La strumentazione disponibile permetteva di estrarre contemporaneamente il DNA di 12 campioni per volta con un volume di partenza di $200\text{ }\mu\text{l}$.

Il sistema di estrazione automatizzata che utilizza sfere magnetiche prevede, dopo la fase di lisi e la digestione con proteinasi K, il trasferimento della sospensione ottenuta in colonnine contenenti delle piccole sfere magnetiche rivestite con resina di silice. La silice permette il legame dell'acido nucleico alle sfere. Le biglie magnetiche, alle quali il DNA si lega, permettono di eliminare passaggi di centrifugazione e

filtrazione. Una piastra magnetica attira e trattiene le biglie caricate con il DNA sul fondo della colonna. Questo passaggio permette un'agevole aspirazione del surnatante contenente i contaminanti da scartare. Successivamente, le biglie vengono sottoposte a vari lavaggi rapidi per eliminare ulteriori contaminanti e sali. Infine, il magnete viene allontanato e l'acido nucleico viene eluito con acqua o soluzioni tamponate (tris-EDTA), per essere purificato e separato dalle sfere che restano all'interno della colonnina.

2.3. QUALITY CONTROL

Dopo l'estrazione, la concentrazione del dsDNA è stata calcolata mediante quantificazione con lo *spettrofotometro NanoDrop* (figura 3) che permette di rilevare l'intero spettro tra 220 e 750 nm.

Il DNA viene esposto alla luce ultravioletta a una lunghezza d'onda di 260 nm e un foto-rilevatore misura la luce che passa attraverso il campione. Una parte della luce ultravioletta passerà, l'altra sarà assorbita dal DNA. Più luce è assorbita dal campione, maggiore è la concentrazione di acido nucleico nel campione.



Figura 2: *Nanodrop*

Il sistema consente di leggere il campione sfruttando la tensione superficiale dei liquidi che mantiene il campione sotto forma di goccia in sede di lettura (figura 4.a). Una camera CCD rileva la luce dopo il passaggio attraverso il campione (figura 4.b). Col NanoDrop è possibile leggere campioni non diluiti consentendo così di ridurre gli errori che vengono commessi operando le diluizioni. Il volume di campione necessario per la lettura è piuttosto esiguo (1 μ l), pertanto è possibile determinare la concentrazione anche di campioni presenti in quantità ridotta.

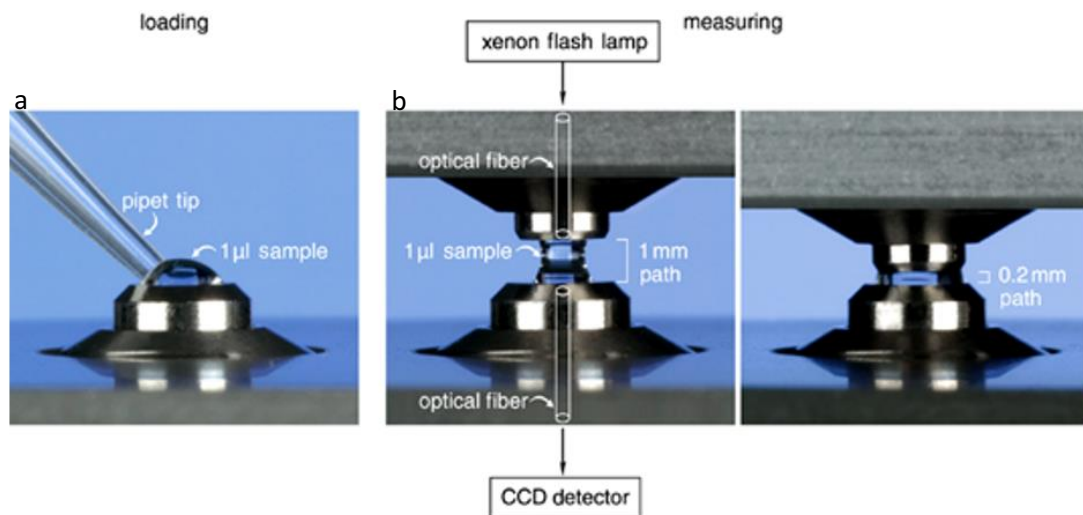


Figura 3: a. caricamento del campione; b. fase di lettura.

Per determinare la purezza dell'acido nucleico venivano utilizzati i seguenti rapporti:

- rapporto A260/A280 = indice della contaminazione da proteine (gli amminoacidi assorbono a 280 nm).

Per il DNA il rapporto deve essere compreso tra 1,6 e 1,8; mentre per l'RNA il rapporto deve essere compreso tra 1,8 e 2,0. Valori distanti da questi indicano una contaminazione da proteine.

- rapporto A260/A230= *indice della contaminazione da carboidrati e fenoli (solventi).*

Il valore ottimale di questo rapporto è di circa 2:2. Rapporti inferiori indicano contaminazione da solventi

2.4. PCR-SSO: SEQUENCE SPECIFIC OLIGONUCLEOTIDE

Il DNA estratto e quantificato è stato amplificato con la metodica *Sequence Specific Oligonucleotide (SSO)*. Tale tecnica si avvale di oligonucleotidi a sequenza specifica per individuare gli alleli HLA presenti in un campione amplificato mediante PCR. L'insieme di tali sequenze determina la capacità di discriminare i diversi alleli presenti nel campione amplificato.

I campioni di DNA che dovevano essere tipizzati erano dapprima amplificati con PCR utilizzando primer locus specifici biotinilati. Nella fase di post-amplificazione, il prodotto di reazione era denaturato e fatto reibridare a sonde di DNA complementari coniugato a R-ficoeritrina (SAPE) al fine di consentirne la rilevazione. Un analizzatore a flusso identificava l'intensità di fluorescenza della R-ficoeritrina su ciascuna microsfera; in base all'entità della fluorescenza si riusciva a quantificare il DNA ibridato presente, consentendo di stabilire la positività o negatività di un campione, nonché determinare il fenotipo HLA.

Per fare questo passaggio si impiega lo strumento *Luminex*. Esso è dotato di una piastra estraibile, all'interno della quale sono inseriti i campioni da analizzare. La lettura dei campioni è possibile grazie ai due laser (rosso e

verde) presenti al suo interno che quantificano il colore delle microsferi ibridate e ne calcolano la quantità in base alla fluorescenza emessa dal campione.

L'accuratezza dello strumento dipende dalla manutenzione dello stesso, infatti prima di iniziare l'analisi e a conclusione della stessa occorre lavare lo strumento rispettivamente con isopropanolo al 70% e ipoclorito di sodio al 10%, seguito da lavaggi con acqua distillata.

2.5. PCR-SSP: SEQUENCE SPECIFIC PRIMERS

Data la complessità della tipizzazione HLA, la tecnica di PCR-SSO, a volte, non è sufficiente per l'assegnazione allelica. Pertanto, si procede con la metodica "Sequence Specific Primers" (PCR-SSP) [Lavant et al.] per confermare le eventuali ambiguità alleliche e la presenza di omozigosi al fine di assegnare una tipizzazione completa ed esaustiva.

La PCR SSP utilizza la reazione di polimerizzazione associando primer a sequenza specifica che individuano i singoli alleli dei geni codificanti sia le proteine di classe I che quelle di classe II.

Il principio di tale metodica si basa sul fatto che solo i primer complementari alla sequenza del template si appaiano con esso e si ha la produzione dell'amplificato, mentre i primer non complementari vengono eliminati. Conclusa la PCR, l'amplificato è posto in gel d'agarosio concentrato al 4% dove formerà delle bande dovute ai frammenti di DNA separati grazie all'azione di un campo elettrico. La presenza o assenza delle bande e la relativa altezza in ciascun pozzetto sarà analizzata con il

supporto di un software specifico che indicherà l'allele presente nella sequenza del DNA di partenza.

2.6. ELETTROFORESI SU GEL D'AGAROSIO

Il prodotto di PCR è identificato attraverso la visualizzazione delle bande di DNA ai raggi UV mediante l'elettroforesi su gel di agarosio.

La distanza percorsa dal campione dipende dalla grandezza del frammento. Per conoscere la lunghezza in basi esatta si utilizza un marker, costituito da un insieme di frammenti di DNA a peso molecolare noto.

CAPITOLO 3

3. RISULTATI

In questo contesto sono stati analizzati 306 campioni, ciascuno dei quali venne sottoposto a tipizzazione HLA.

3.1. TIPIZZAZIONE HLA

La tipizzazione HLA ha permesso di identificare la presenza dell'aplotipo DQ2, DQ8, di entrambi o la loro assenza.

La tipizzazione HLA prevedeva un'analisi in bassa risoluzione con metodica SSO ed una successiva in alta risoluzione solo nei casi omozigoti e nel definire la specificità allelica HLA DQB1*03, ovvero nel discriminare l'allele HLA DQB1*03:01, non associato a celiachia, dall'allele HLA DQB1*03:02 responsabile della sintesi della catena beta dell'aplotipo DQ8.

I risultati della distribuzione della tipizzazione sono riportati nel grafico 1:

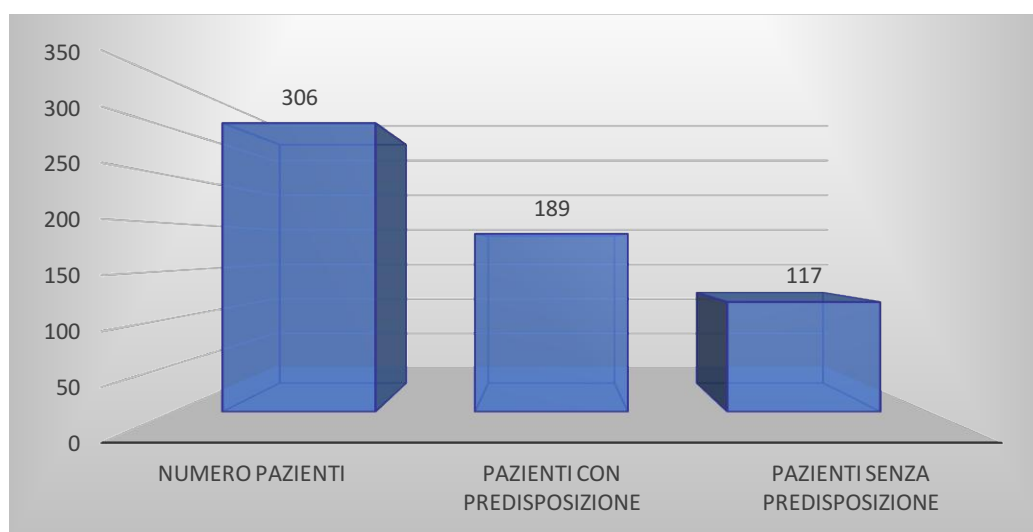


Grafico 1: Distribuzione della tipizzazione HLA

Dalla tipizzazione HLA dei 306 casi esaminati, è risultato che 189 presentavano gli eterodimeri DQ2 e/o DQ8; i restanti 117 pazienti non presentavano nessuno dei due aplotipi (grafico 1).

Nel grafico 2 sono riportate le diverse combinazioni alleliche codificanti per gli aplotipi DQ2 e DQ8. Nello specifico, sono stati identificati 39 pazienti con gli alleli DQA1*02:01/DQB1*02:02 che codificano per la molecola DQ2; 115, invece, hanno gli alleli DQA1*05/DQB1*02:02, codificanti anch'essi per DQ2; meno frequentemente sono stati riscontrati gli alleli DQA1*03/DQB1*03:02, codificanti per DQ8: questo aplotipo è stato attribuito a soli 22 pazienti; in ultimo, sono state riscontrate due combinazioni alleliche codificanti contemporaneamente per entrambi gli aplotipi DQ2 e DQ8. Per l'aplotipo DQ2, è stata riscontrata in 5 casi la combinazione allelica DQA1*05:01/DQB1*02:01 e in 8 la combinazione DQA1*02:01/DQB1*02:01, mentre per l'aplotipo DQ8, gli alleli riscontrati in tutti i 13 casi positivi a entrambi gli aplotipi sono DQA1*03/DQB1*03:02 (grafico 2).

APLOTIPI PER LA PREDISPOSIZIONE

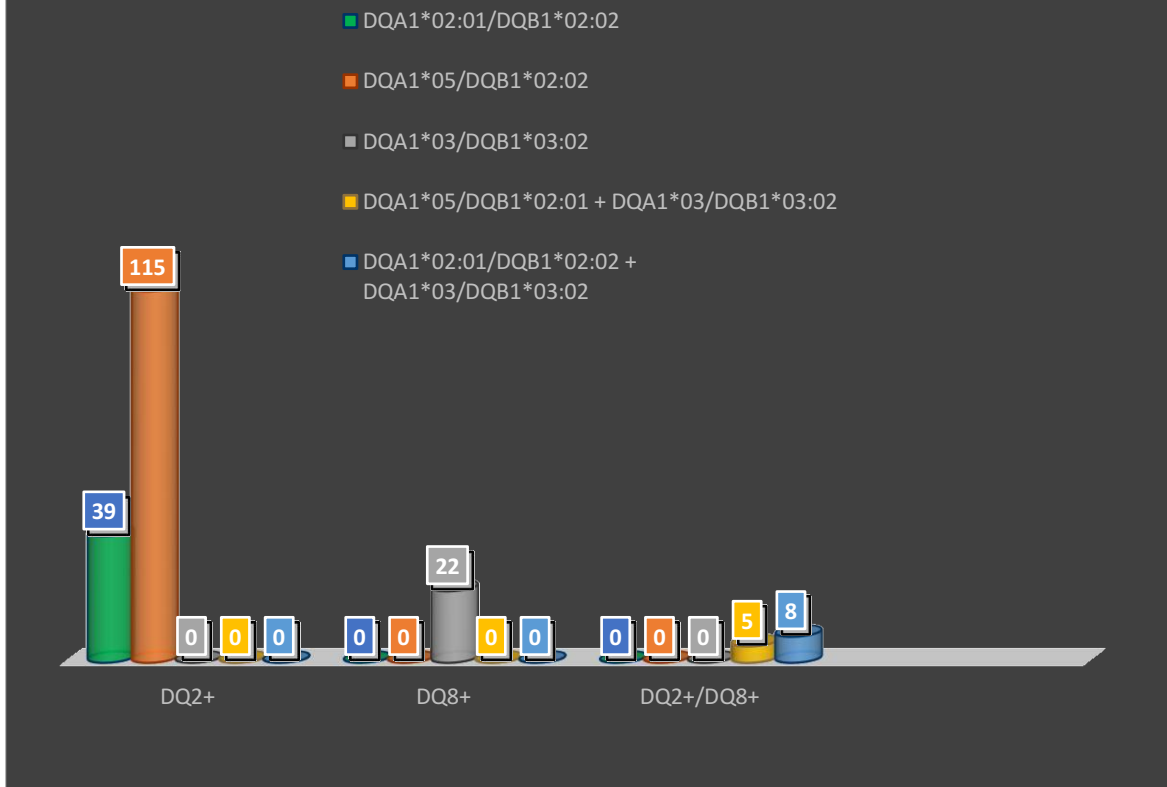


Grafico 2

In termini percentuali, gli alleli DQA1*02:01/DQB1*02:02 sono stati riscontrati nel 12.74 % sul totale di 306 pazienti; gli alleli DQA1*05/DQB1*02:02 sono presenti nel 37.58 % dei pazienti; mentre il 7.18 % dei pazienti presenta gli alleli DQA1*03/DQB1*03:02; l'1.63 % aveva gli alleli DQA1*05:01/DQB1*02:01 in combinazione con DQA*03/DQB1*03:02; e nel 2.61 % si osservavano gli alleli DQA1*02:01/DQB1*02:02 in combinazione con DQA1*03/DQB1*03:02 (figura 5).

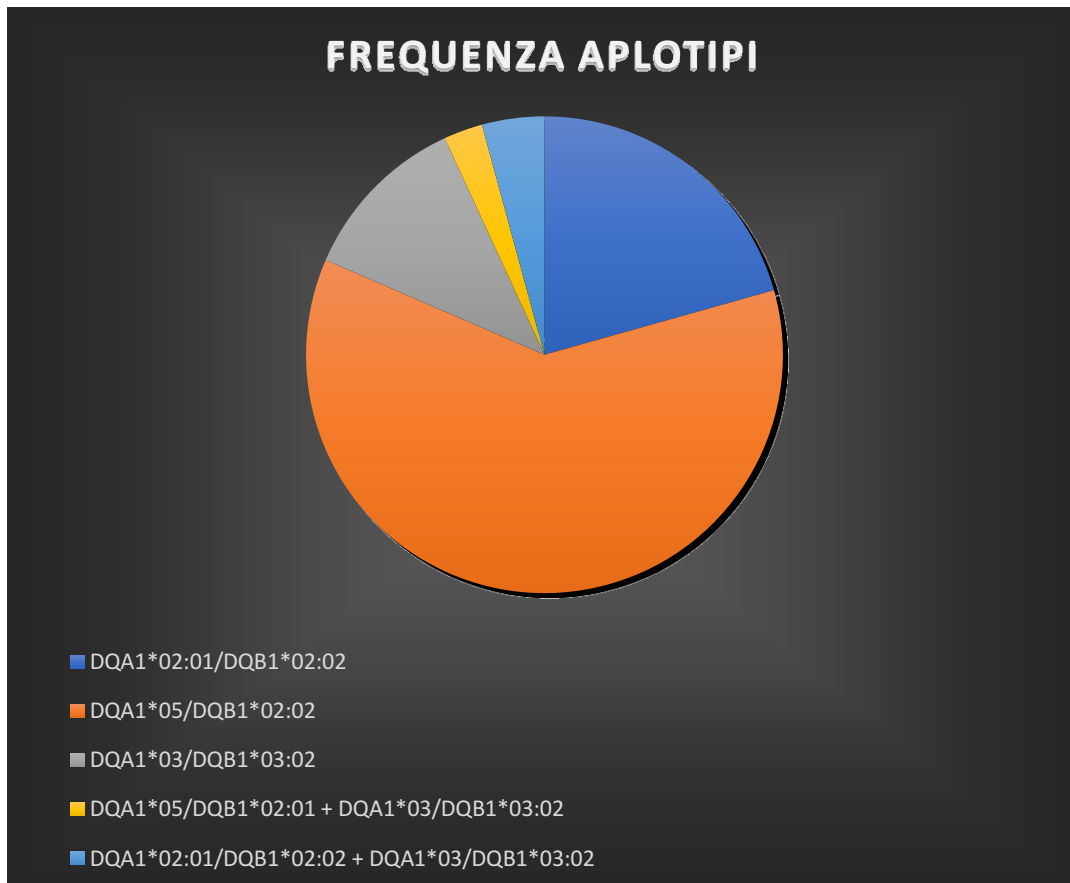


Figura 5

3.2. VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DOSE

Tra i 190 pazienti con predisposizione, ci sono 58 che risultano essere celiaci. Tra questi, 47 sono DQ2+; invece, 7 sono DQ8+; e, in ultimo, ce ne sono 4 DQ2+/DQ8+ (grafico 3):

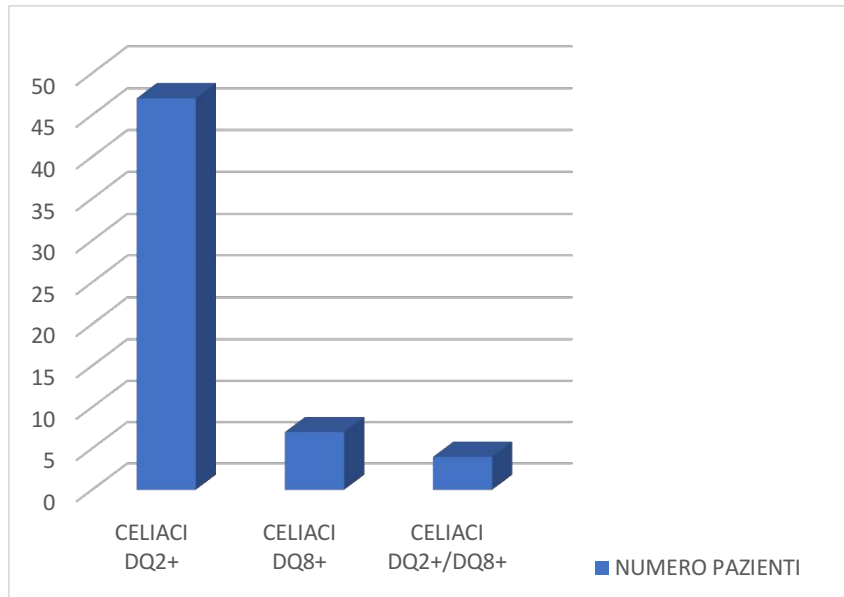


Grafico 3. Distribuzione dei pazienti celiaci

Dei celiaci DQ2+, 39 hanno gli alleli DQA1*05/DQB1*02:01 e 8 hanno gli alleli DQA1*02:01/DQB1*02:02 (o 02:01). I celiaci DQ8+ hanno tutti gli alleli DQA1*03/DQB1*03:02. In ultimo, si distinguono tra i celiaci DQ2+/DQ8+, 3 con gli alleli DQA1*02:01/DQB1*02:02 + DQA1*03/DQB1*03:02 e solo 1 con gli alleli DQA1*05/DQB1*02:02 + DQA1*03/DQB1*03:02 (grafico 4).

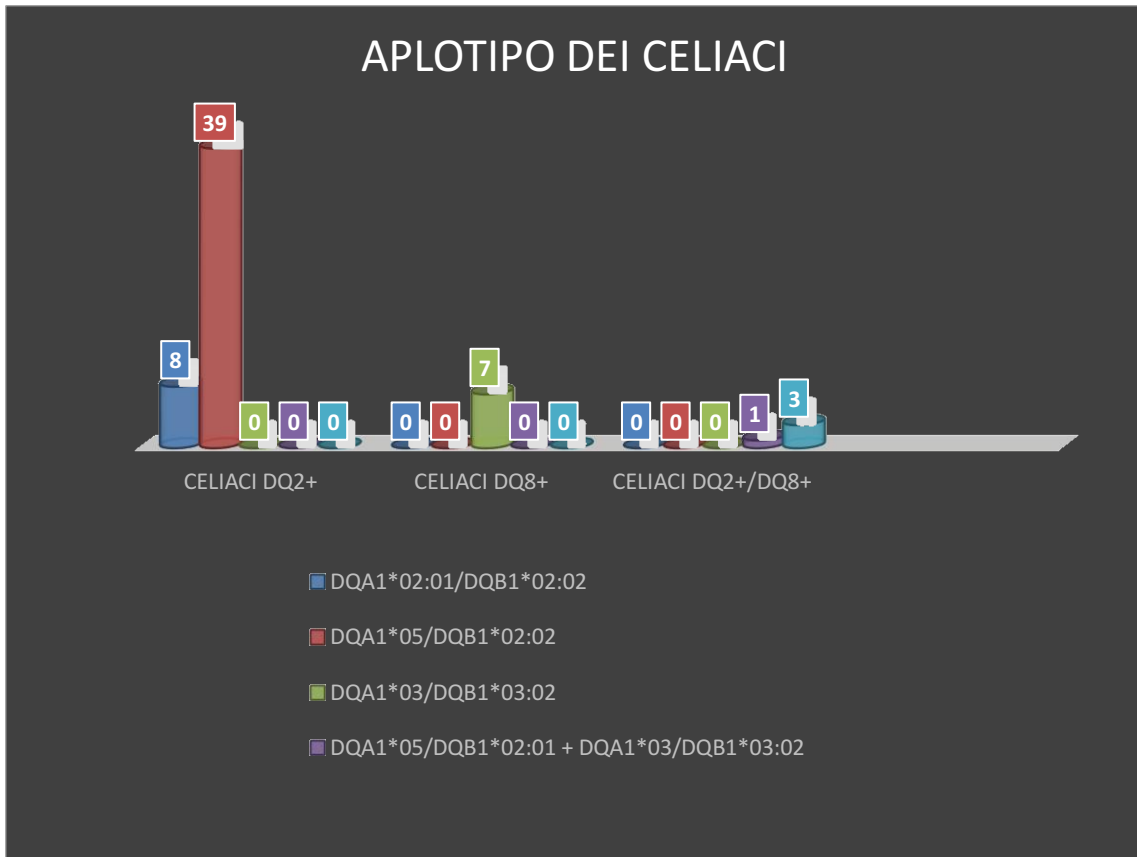


Grafico 4

Tra i celiaci DQ2+ si osserva una netta prevalenza degli eterozigoti rispetto agli omozigoti. Si contano, infatti, 33 eterozigoti DQ2+ contro 14 omozigoti (grafico 5). L'omozigote non per forza presenterà gli alleli DQA1 tra loro uguali e/o gli alleli DQB1 tra loro uguali. Si dice omozigote quando entrambi gli alleli DQA1 codificano per la catena alpha della stessa proteina (DQ2 in questo caso) ed entrambi gli alleli DQB1 codificano per la catena beta della stessa proteina (DQ2).

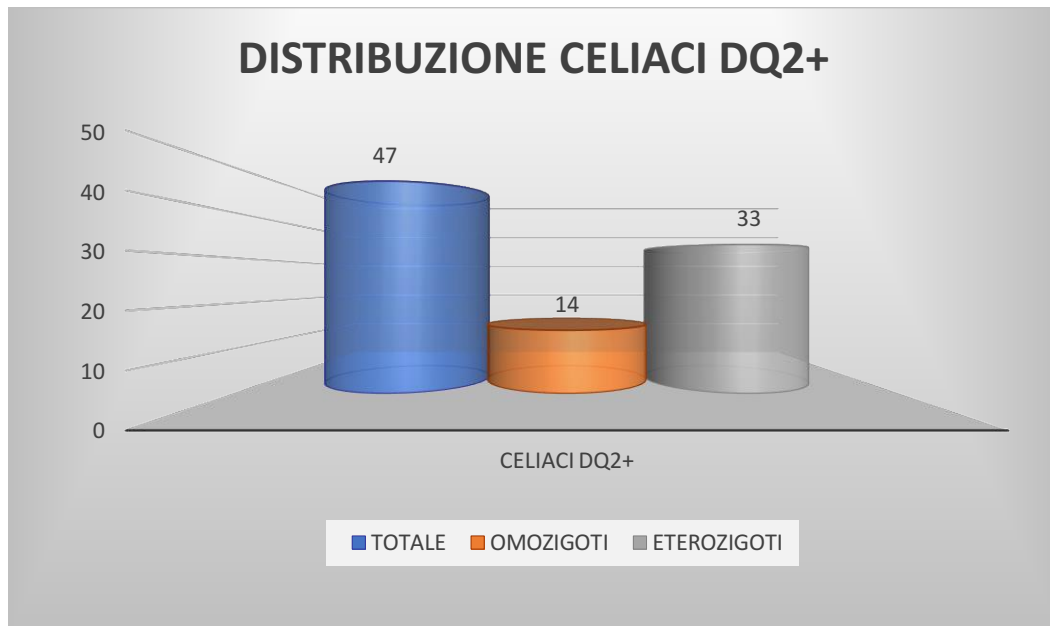


Grafico 5

Si osserva, inoltre, che tra gli eterozigoti se ne contano 20 che presentano due alleli DQA1 (DQA1*05 e/o DQA1*02:01) codificanti per la catena alpha di DQ2 e un solo allele DQB1 codificante per la catena beta di DQ2; invece, ci sono 13 eterozigoti che hanno un solo allele DQA1 (DQA1*05 o DQA1*02:01) codificante per la catena alpha e un solo allele DQB1 codificante per la catena beta di DQ2 (grafico 6).

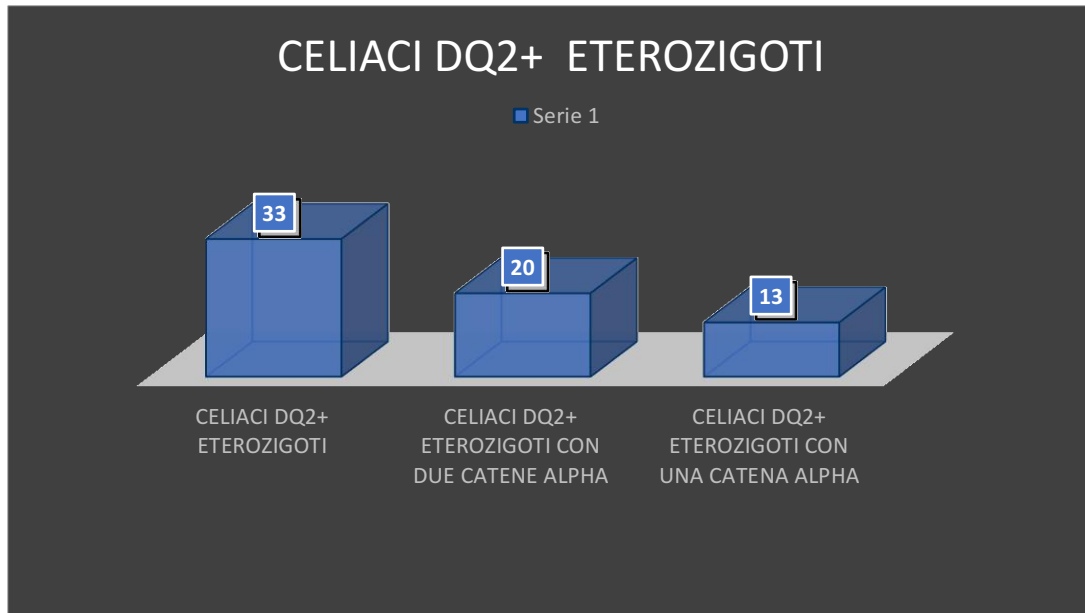


Grafico 6

Anche tra i celiaci DQ8+ si osserva una netta prevalenza degli eterozigoti: in questo caso specifico tutti i 7 DQ8+ celiaci sono eterozigoti. Scendendo nel dettaglio si contano 3 celiaci DQ8+ che hanno una sola catena alpha e una sola catena beta di DQ8 (codificate rispettivamente da DQA1*03 e DQB1*03:02); mentre se ne contano 4 che hanno le due catene di DQ8, ma presentano anche un allele aggiuntivo, codificante per la catena alpha di DQ2 (grafico 7).

In tutti i 5 pazienti con più alleli è stato riscontrato come allele aggiuntivo il DQA1*05:05.

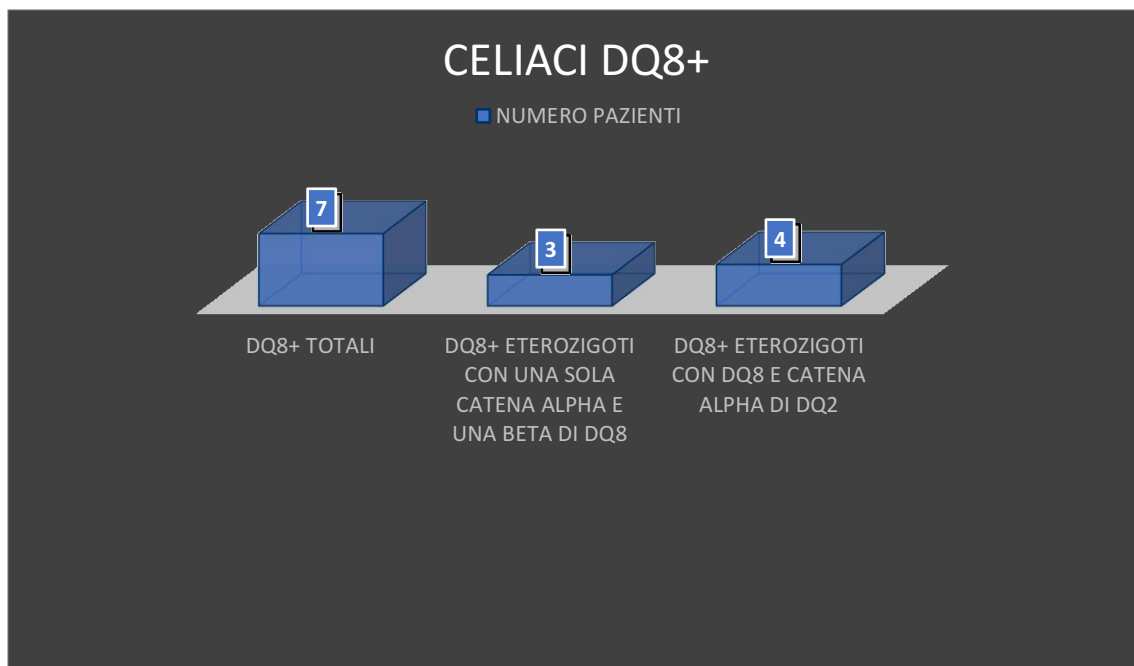


Grafico 7

Classificazione analoga a quella fatta per i DQ2+ celiaci e per i DQ8+ celiaci, venne effettuata anche per i DQ2+ NON celiaci e per i DQ8+ NON celiaci.

Si sono contati quindi 17 DQ2+ NON celiaci ma omozigoti; 91 DQ2 + NON celiaci eterozigoti, di cui 38 con un solo allele per la catena alpha e uno per la catena beta; e 53 DQ2+ NON celiaci con due alleli per la catena alpha e un allele per la catena beta (grafico 8).

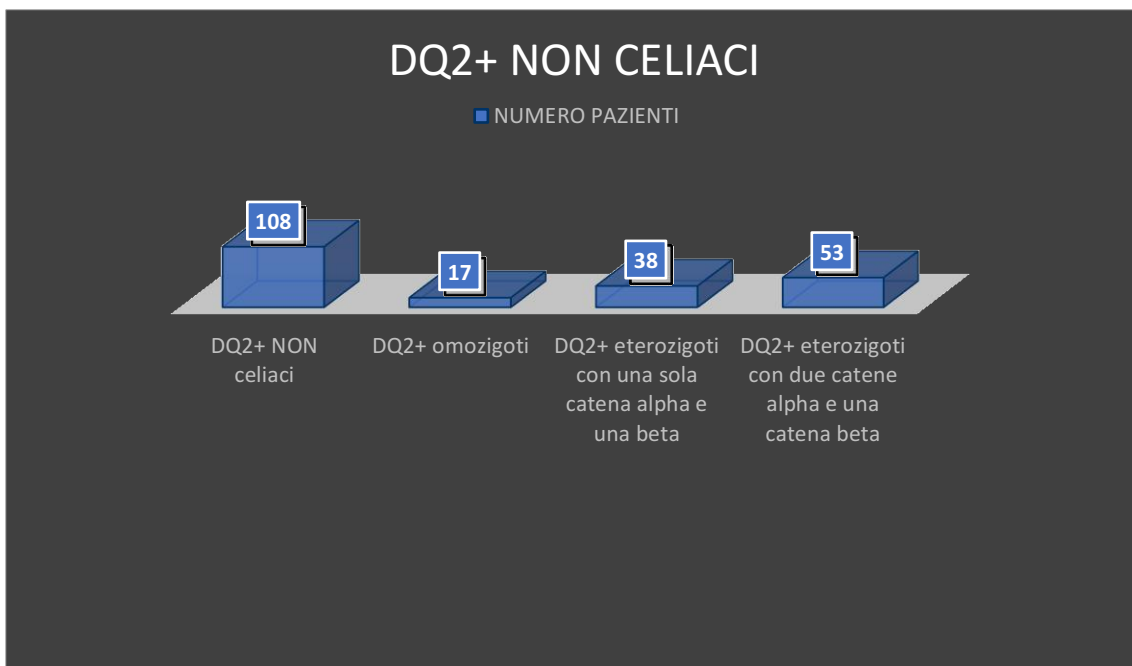


Grafico 8

Tra i DQ8+ non celiaci, invece, si contano 10 che hanno una sola catena alpha e una beta di DQ8 contro 7 che, oltre alle due catene di DQ8, hanno anche l'allele codificante per la catena alpha di DQ2 (grafico 9).

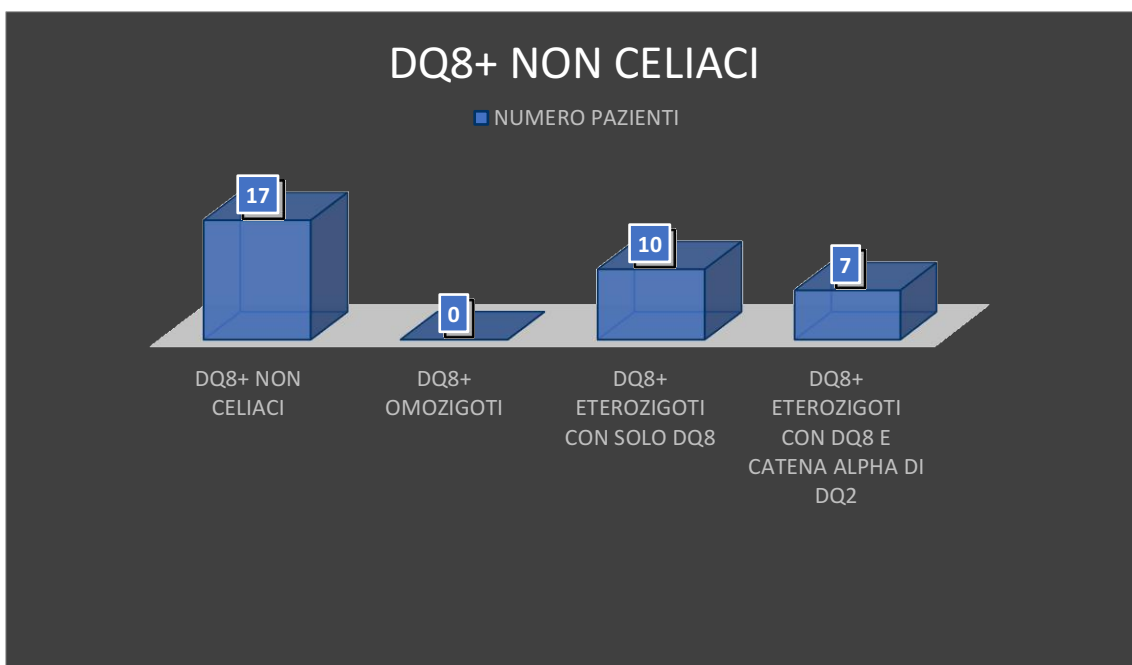


Grafico 9

3.3. CORRELAZIONE TRA CELIACHIA E ASSENZA DI ALLELI

Durante l'analisi dei dati, si è posta l'attenzione ad un gruppo di 6 pazienti, in età pediatrica, certificati come celiaci sulla base della positività degli esami sierologici e della biopsia intestinale, ma senza predisposizione genetica per la celiachia rivelata dall'assenza degli alplotipi DQ2 e DQ8.

Pur trattandosi di una casistica esigua, la frequenza di questo gruppo di pazienti (l'1.96 %) con assenza di alplotipi DQ2 e DQ8 risultava essere, in questo studio, superiore rispetto ai dati di letteratura (0.16 %).

Pertanto, si è posta l'attenzione ai genotipi HLA dei 6 pazienti (Tab. 1).

| ID | DQA1* | DQA1* | DQB1* | DQB1* | DQ2 | DQ8 | DQ2 | | DQ8 | |
|-----|--------|--------|--------|--------|---------|---------|-------|------|-------|------|
| | | | | | | | ALPHA | BETA | ALPHA | BETA |
| 59 | *01:01 | *01:01 | *05:01 | *05:01 | Assente | Assente | NO | NO | NO | NO |
| 72 | *05 | *05 | *03:01 | *03:01 | Assente | Assente | SI | NO | NO | NO |
| 79 | *01 | *01 | *05:01 | *05:01 | Assente | Assente | NO | NO | NO | NO |
| 95 | *01 | *05 | *03:01 | *05:02 | Assente | Assente | SI | NO | NO | NO |
| 247 | *05 | *05:05 | *05 | *05 | Assente | Assente | SI | NO | NO | NO |
| 252 | *05 | *05:05 | *03:01 | *05 | Assente | Assente | SI | NO | NO | NO |

Tabella 1. Alplotipi DQ2/DQ8 per ciascuno dei 6 pazienti.

Dalla tabella 1 si evince che in 4 dei 6 genotipi sono presenti i geni per la catena alpha della molecola DQ2, in 3 di essi (ID72, ID 247 e ID 252) allo stato omozigote ed in 1 solo caso (ID 95) in eterozigosi. Si potrebbe ipotizzare di attribuire alla suddetta catena la causa di una risposta anticorpale positiva o causa di disturbi riconducibili a quelli del morbo

celiaco. Tuttavia, questo non può essere dato sufficiente per certificare gli stessi come celiaci.

Nel frattempo, consultando il reparto di pediatria, si viene a conoscenza di notizie importanti sull'anamnesi di 3 dei 6 pazienti in oggetto, riportate in tabella 2.

| ID | Diagnosi |
|----|------------------------|
| 59 | Sindrome di Turner |
| 72 | Sensibilità al vaccino |
| 79 | Dermatite atopica |

Tabella 2. Anamnesi dei pazienti in età pediatrica

CAPITOLO 4

4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Gli studi sulla celiachia degli ultimi vent'anni hanno focalizzato l'attenzione della comunità scientifica sulla genetica e sul ruolo della risposta immunitaria adattativa indotta nell'organismo in seguito all'assunzione del glutine nei pazienti celiaci. Il modello attuale della celiachia, derivato da questi studi, è in grado di spiegare molti aspetti della celiachia ma non è completo, non è infatti ancora in grado di chiarire perché molte persone geneticamente predisposte non sviluppino mai la malattia.

Ed è a tal riguardo che va ad inserirsi questo lavoro di tesi. Dallo studio dei 306 casi esaminati, si è potuto evidenziare che la predisposizione genetica non sempre è il solo fattore determinante per l'insorgenza del morbo celiaco.

Infatti, nella nostra coorte solo alcuni pazienti che presentano il DQ2 o il DQ8 o entrambi sono celiaci (grafico 10).

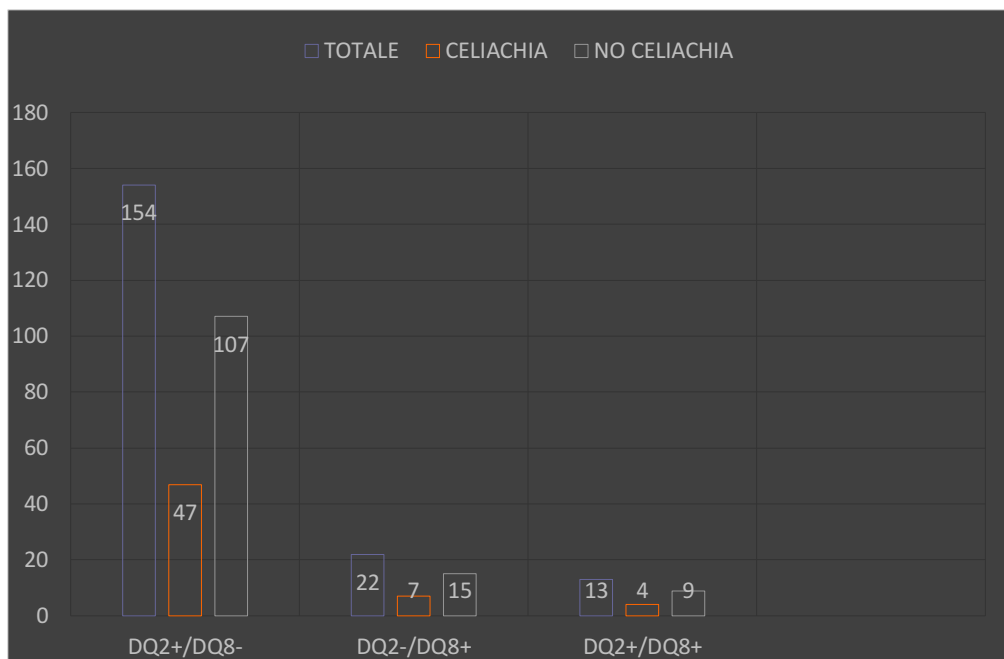


Grafico 10

Nello specifico, dei 154 pazienti DQ2+ solo 47 sono celiaci, contro 107 che non presentano malattia; dei 22 pazienti DQ8+ solo 7 sono celiaci, contro 15 che non lo sono; in ultimo, dei 13 pazienti DQ2+/DQ8+ solo 4 sono affetti da morbo celiaco, contro 9 che, invece, sono sani (grafico 10).

In linea generale, quindi, dei 190 pazienti che presentano predisposizione, solo 59 sono celiaci (31.0 %); 131 (69.0 %) non presentano la malattia celiaca (figura 6). Questa elevata frequenza di soggetti con predisposizione genetica (69%), in assenza di malattia celiaca, osservata nel lavoro presente, è dovuta al reclutamento non casuale dei campioni, in quanto, nella casistica sono stati inclusi anche i familiari di primo grado di pazienti celiaci giunti per fare indagini relative alla loro suscettibilità genetica per la celiachia.



Figura 6

Tra i 59 pazienti celiaci, gli alleli riscontrati più frequentemente sono gli alleli DQA1*05/DQB1*02:02, codificante per l'aplotipo DQ2.

I dati di questo studio hanno confermato i dati esistenti a sostegno di una forte predisposizione genetica per la malattia celiaca associata agli alleli di classe II, DQB1*02 e DQA1*05. [Krini M. et al, 2012]

I risultati di questo studio hanno confermato la forte associazione della presenza di alleli che contribuiscono al genotipo *HLA-DQ2* con lo sviluppo della celiachia.

L'influenza dell'HLA sulla suscettibilità della malattia celiaca mostra un effetto dose. Il rischio di sviluppare la celiachia può essere classificato in base al numero di alleli DQA1*05 e DQB1*02 portati dall'individuo. L'omozigosi per DQ2.5 *cis* e l'eterozigosi per DQ2.5 *cis* con un cromosoma che possiede un secondo allele DQB1*02 (DQ2.2) conferisce il più alto rischio di sviluppare la celiachia. L'eterozigosi per

DQ2.5 *cis* in soggetti con una singola copia di DQB1*02 (non DQ2.2) o la presenza di DQ2.5 *trans* conferisce un rischio intermedio. La negatività DQ2 suggerisce una probabilità estremamente bassa di sviluppare il morbo celiaco. [Sciurto M. et al, 2018]

Con questo lavoro si vuole dimostrare l'effetto dose descritto: infatti sono stati identificati 14 DQ2+ celiaci omozigoti (che hanno quindi due alleli DQA1 codificanti per la catena alpha di DQ2 e due alleli DQB1 codificanti per la catena beta di DQ2); 21 DQ2+ celiaci eterozigoti che presentano due alleli DQA1 entrambi codificanti per la catena alpha di DQ2 e un allele DQB1 codificante per la catena beta; e si evidenziano solo 13 celiaci DQ2+ eterozigoti con un solo allele DQA1 codificante per alpha e un solo allele DQB1 codificante per beta. Anche tra i DQ8+ celiaci si evidenzia un maggior numero di casi in cui si osservano, oltre agli alleli codificanti per le due catene di DQ8, anche un allele aggiuntivo codificante per la catena alpha di DQ2. Questo dato potrebbe sostenere l'ipotesi che ad un maggior numero di alleli codificanti per la catena alpha e/o beta di DQ2 e/o di DQ8 corrisponde maggior rischio di sviluppo del morbo celiaco. Al tempo stesso, però, ho valutato come si distribuiscono gli alleli tra i NON celiaci, evidenziando anche in questo caso, soprattutto in relazione ai DQ2+ NON celiaci, una netta prevalenza di individui eterozigoti che hanno due alleli per la catena alpha di DQ2 e un allele per la catena beta di DQ2, contro un minor numero di pazienti NON celiaci dotati di un solo allele per la catena alpha e un solo allele per la catena beta. Questo secondo dato, quindi, sembrerebbe non sostenere in modo fermo l'effetto dose soppiantando l'ipotesi secondo cui a maggior numero di alleli corrisponde maggior rischio di sviluppo della malattia.

Inoltre, dai dati esistenti si evince che è poco probabile che si manifesti celiachia in assenza di predisposizione: più del 95.0 % dei pazienti con malattia presenta HLA-DQ2 e/o HLA-DQ8, e quindi l'assenza di queste molecole riduce significativamente la probabilità di celiachia. [Krini M. et al, 2012]

Infatti, è bene dire che i bambini soffrono maggiormente di malattie gastrointestinali e altre patologie correlate, ma tra questi pazienti pediatrici si evidenzia anche un'altra comune malattia autoimmune che è la celiachia, che è più frequentemente diagnosticata erroneamente dai medici. Il test sierologico per l'anti-tTG è il modo più comune per la diagnosi di celiachia ed è ulteriormente confermato dalla biopsia intestinale; ma secondo le nuove linee guida, come la North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (NASPGHAN), la European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) e la British Society of Gastroenterology (BSG), è molto utile includere nella diagnosi la tipizzazione HLA per evitare, soprattutto nei bambini, la tipizzazione HLA. Se il bambino è negativo per entrambi gli aplotipi HLA-DQ2 e HLA-DQ8, è molto improbabile che abbia la celiachia. [Siddiqui K. et al, 2021]

In questa tesi sono stati evidenziati pazienti pediatrici (1.96 %) con sintomi e positività sierologica che riconducevano al morbo celiaco, ma con assenza degli aplotipi DQ2 e/o DQ8. Tale frequenza di celiaci (1.96 %) con assenza di predisposizione genetica, nella nostra casistica, era superiore rispetto alla letteratura (0.16 %), giustificata dalla presenza, in alcuni casi, di altre patologie, quali sindrome di Turner o dermatite atopica.

Tuttavia, in alcuni di essi, come dimostrato con i pazienti ID 72, ID 95, ID 247 e ID 252, la diagnosi di celiachia potrebbe essere giustificata dalla

presenza della sola catena alpha di DQ2. Quindi laddove potrebbe sembrare non esserci predisposizione, potrebbe bastare anche la sola presenza della catena alpha, cioè una parte di DQ2, anche in assenza della catena beta, per innescare la celiachia o una situazione riconducibile ad essa.

Quanto detto coincide con uno studio multicentrico condotto in Europa nel 2002, in cui 61 dei 1.008 pazienti con malattia celiaca mancavano dell'eterodimero DQ2 o DQ8, e 57 di loro codificavano metà dell'eterodimero DQ2. Questi risultati dimostrano che solo uno degli alleli *DQA1* *05 o *DQB1* *02, che codifica per metà della molecola dell'eterodimero DQ2, conferirebbe una predisposizione all'attivazione della celiachia.

I risultati riportati in questa tesi sono simili a quelli riportati dagli altri studi e lasciano lo spazio per la ricerca di componenti molecolari, ad oggi sconosciute, che possano giustificare il diverso ruolo dei genotipi HLA nel conferire la predisposizione genetica per la celiachia.

Quest'ultima osservazione e l'effetto dose, riportato alla luce in precedenza, secondo cui la maggior parte dei celiaci diagnosticati, oltre a possedere il DQ2 e /o il DQ8, presentano in aggiunta la catena alpha di DQ2, conferiscono a questa catena una notevole importanza. Quindi si conclude questo lavoro proponendo la catena alpha di DQ2 come elemento chiave, ma non sufficiente, nell'ambito diagnostico del morbo celiaco.

5. RIFERIMENTI

Anderson C., French J., Sammons H., Frazer A., Gerrard J., Smellie J. "Coeliac disease: gastro-intestinal studies and the effect of dietary wheat flour." (1952) *The Lancet*; 1.6713:836-842.

Ciclitira P., King A., Fraser J. "AGA technical review on Celiac Sprue". (2001) *American Gastroenterological Association*; 120.6:1526-1540.

Dieterich W., Ehnis T., Bauer M., Donner P., Volta U., Riecken E., Schuppan D. "Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease." (1997) *Nature medicine* 3.7:797-801.

Doolan A., Donaghue K, Fairchild J. "Use of HLA typing in diagnosing celiac disease in patients with type 1 diabetes". (2005) *Diabetes Care*; 28.4:806-809

Fasano A., and Catassi C. "Coeliac disease in children." (2005) *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 19.3: 467-478.

Hadithi M.,Blomberg M., Crusius B., Bloemena E., Kostense P., Meijer J., Mulder C., Stehouwer C., Peña A. "Accuracy of Serologic Tests and HLA-DQ Typing for Diagnosing Celiac Disease". (2007) *Annals of Internal Medicine* 147.5:294-302

Husby S., Koletzko S., Korponay-Szabó I., Kurppa k., Mearin M.L., RibesKoninckx C., Troncone R., Auricchio R., Castillejo G., Christensen R., Dolinsek J., Gillett P., Hróbjartsson A., Koltai T., MakiM., MaiNielsen S., Popp A., Størdal K., Werkstetter K., Wessels M. "European Society of Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Guidelines for the Diagnosis

of Coeliac Disease”. (2012) *Journal of Pediatric and Gastroenterology and Nutrition*; 70.1:141-156.

Janaína Luz Narciso-Schiavon and Leonardo Lucca Schiavon. “To screen or not to screen? Celiac antibodies in liver diseases”. (2017) *World Journal of Gastroenterology*; 23.5:776-791.

Korponay-Szabó I., Vecsei Z., Király R., Dahlbom I., Chirido F., Nemes E., Fésüs L., Mäki M. "Deamidated gliadin peptides form epitopes that transglutaminase antibodies recognize." (2008) *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 46.3: 253-261.

Krini M., Chouliaras G., Kanariou M., Varela I., Spanou K., Panayiotou J., Roma E. N.Constantinidou . “HLA class II high-resolution genotyping in Greek children with celiac disease and impact on disease susceptibility”. (2012) *Pediatric Research*; 72.6:625-630

Lerner A. “More novel diagnostic antibodies for celiac disease”. (2016) *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology*; 10.7:767-768.

Lundin KE, Wijmenga C. “Coeliac disease and autoimmune disease—genetic overlap and screening”. (2015) *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*; 12.9:507-515.

Mubarak A., Spierings E., Wolters V., Hoogstraten I., Kneepkens F., Houwen R. “Human leukocyte antigen DQ2.2 and celiac disease”. (2013) *Journal of Pediatric gastroenterology and nutrition*; 56.4:428-430

Nadhem O., Azeez G., Smalligan R., Urban S. "Revisione e linee guida pratiche per la malattia celiaca nel 2014". (2015) *Postgraduate Medical Journal*; 127:259-265.

Perez-Bravo F., Araya M., Mondragon A. "Genetic differences in HLA-DQA1* and DQB1* allelic distributions between celiac and control children in Santiago, Chile". (1999) *Human Immunology*; 60.3:262-267.

Poddighe D., Rebuffi C., De Silvestri A. "Carrier frequency of HLA-DQB1*02 allele in patients affected with celiac disease: a systematic review assessing the potential rationale of a targeted allelic genotyping as a first-line screening". (2020) *World Journal of Gastroenterology*; 26.12:1365-1381.

Pozio-Rubio T., Tapia A., Kyle R., Kaplan E., Johnson D., Page W., Erdtmann F., Brantner T., Kim W.R., Phelps T., Lahr B., Zinsmeister A., Melton J. 3rd, Murray J. "Increased prevalence and mortality in undiagnosed celiac disease." (2009) *Gastroenterology* 137.1:88-93.

Rivera A., Assiri A., Guandalini S. "Celiac disease". (2013) *Oral Diseases* 19.7:635-641.

Rubio-Tapia A., Hill I., Kelly C., Calderwood A., Murray JA. "ACG clinical guidelines: diagnosis and management of celiac disease". (2013) *Official Journal of the American College of Gastroenterology*; 108.5:656-676.

Sciurto M., Fornaroli F., Gaiani F., Bonaguri C., Leandro G., Di Mario F., de' Angelis GL. "Genetic susceptibility and celiac disease: what role do

HLA haplotypes play?" (2018) *Acta Biomedica Atenei Parmensis-Mattioli Journals*; 89:17-21.

Siddiqui K., Uqaili AA., Rafiq M., Bhutto MA. "Human leukocyte antigen (HLA)-DQ2 and -DQ8 haplotypes in celiac, celiac with type 1 diabetic, and celiac suspected pediatric cases". (2021) *SafetyLit Journal Details - Medicine (Baltimore)*; 100.11:24-95

Stanković B., Radlović N., Leković Z., Ristić D., Radlović V., Nikčević G., Kotur N., Vučićević K., Kostić T., Pavlović S., Zukić B. "HLA genotyping in pediatric celiac disease patients" (2014); *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*; 14.3 1-3.

Tampoia M., Bizzaro N., Villalta D., Platzgummer S., Liguori M., Tozzoli R., Tonutti E. "Low specificity of anti-tissue transglutaminase antibodies in patients with primary biliary cirrhosis". (2006) *Journal of Clinical Laboratory Analysis*; 20.5:184-189.

Tommasini A., Tarcisio Not, Ventura A. "Ages of celiac disease: from changing environment to improved diagnostics." (2011) *World Journal of Gastroenterology*; 17.32: 3665.

Venhoff N., Emmerich F., Neagu M., Salzer U., Koehn C., Driever S., Kreisel W., Rizzi M., Effelsberg N., Kollert F., Goldacker S., Reinhard E Voll, Klaus Warnatz, Thiel J. "The role of HLA DQ2 and DQ8 in dissecting celiac-like disease in common variable immunodeficiency". (2013) *Journal of Clinical Immunology*; 33.5:909-916.