



A.D. MDLXII

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

**Scuola di Dottorato in Scienze Biomediche**

**Indirizzo in Fisiopatologia Medica**

(Ciclo XXXIV)

**Polimorfismi del network citochinico  
e microbiota in una popolazione ad elevata  
prevalenza di malattia celiaca**

Direttore

Prof.ssa Margherita Maioli

Tesi di Dottorato di:

Dr.ssa Alessandra Errigo

Tutore:

Prof. Roberto Manetti

**ANNO ACCADEMICO 2020/2021**

## INDICE

<b>Sommario</b>	pag.	4
<b>1. Introduzione</b>	pag.	5
1.1. Il ruolo del Sistema HLA	pag.	7
1.2. Il ruolo dei fattori genetici non-HLA	pag.	8
1.3. Il ruolo del fattore di necrosi tumorale $\alpha$	pag.	9
1.3.1. Il polimorfismo TNF- $\alpha$ -308G>A	pag.	10
1.4. Interleuchina 6 e celiachia	pag.	11
1.4.1. Il polimorfismo IL-6 -174G>C	pag.	11
1.5. Interleuchina 10 e celiachia	pag.	12
1.5.1. Il polimorfismo IL-10 -1082A>G	pag.	12
1.6. Il recettore 5 delle chemochine (CCR5)	pag.	13
1.6.1. La mutazione $\Delta$ 32 del recettore 5 delle chemochine (CCR5)	pag.	13
1.7. La glucosio-6-fosfato deidrogenasi	pag.	13
1.7.1. La mutazione 563 C→T (G6PD Med, S188F) della glucosio-6-fosfato deidrogenasi	pag.	14
1.8. Il ruolo del microbiota intestinale	pag.	14
<b>2. Scopo della tesi</b>	pag.	16
<b>3. Pazienti e metodi</b>	pag.	19
3.1. Reclutamento dei partecipanti allo studio	pag.	19
3.2. Raccolta dei dati clinici e dei campioni biologici	pag.	20
3.3. Estrazione del DNA genomico e analisi dei genotipi	pag.	21
3.4. Amplificazione del DNA mediante reazione a catena della polimerasi (PCR) e visualizzazione dei prodotti mediante elettroforesi	pag.	21
3.5. Analisi del microbiota intestinale	pag.	22
3.6. Analisi statistica	pag.	22
<b>4. Risultati</b>	pag.	23
4.1. Caratteristiche sociodemografiche dei partecipanti allo studio	pag.	23
4.1.1. Pazienti celiaci	pag.	23
4.1.2. Gruppi di controllo	pag.	24
4.1.3. Tipizzazione degli alleli HLA nei celiaci e nei controlli	pag.	25
4.1.4. Frequenza degli alleli/aplotipi di suscettibilità	pag.	25
4.1.5. Frequenza degli alleli HLA nei celiaci con e senza autoimmunità	pag.	27
4.1.6. Tipizzazione dei polimorfismi delle citochine	pag.	27
4.1.7. Il polimorfismo TNF- $\alpha$ -308G>A	pag.	31

4.1.8. Il polimorfismo IL-6 -174G>C .....	pag.	31
4.1.9. Il polimorfismo IL-10 -1082G>A .....	pag.	33
4.1.10. Ricerca della mutazione $\Delta$ 32 del CCR5 .....	pag.	33
4.1.11. Ricerca della variante 563 C→T del gene G6PD .....	pag.	34
4.1.12. Analisi del microbiota intestinale .....	pag.	36
<b>5. Discussione .....</b>	<b>pag.</b>	<b>37</b>
5.1. Analisi degli alleli HLA di suscettibilità .....	pag.	39
5.2. Analisi dei polimorfismi delle citochine .....	pag.	40
5.2.1. Polimorfismo IL-6 -174G>C .....	pag.	42
5.2.2. Polimorfismo IL-10 -1082G>A .....	pag.	42
5.2.3. Mutazione $\Delta$ 32 del recettore 5 delle chemochine (CCR5)	pag.	43
5.2.4. Screening della mutazione G6PD <i>Med</i> .....	pag.	44
5.2.5. Analisi del microbiota .....	pag.	44
<b>6. Conclusioni .....</b>	<b>pag.</b>	<b>46</b>
<b>7. Bibliografia .....</b>	<b>pag.</b>	<b>48</b>
<b>8. Appendice A .....</b>	<b>pag.</b>	<b>57</b>
<b>9. Appendice B .....</b>	<b>pag.</b>	<b>59</b>
<b>10. Appendice C .....</b>	<b>pag.</b>	<b>61</b>
<b>11. Appendice D .....</b>	<b>pag.</b>	<b>64</b>
<b>12. Appendice E .....</b>	<b>pag.</b>	<b>66</b>
<b>13. Appendice F .....</b>	<b>pag.</b>	<b>66</b>

## SOMMARIO

L'eziologia della malattia celiaca (MC), un'enteropatia cronica scatenata dall'ingestione del glutine, non è ancora del tutto chiara. La malattia è contrassegnata da una forte componente ereditaria, alla quale contribuiscono i polimorfismi dei geni HLA-DQ2 e HLA-DQ8, responsabili tuttavia solo del 40% della variabilità del tratto. Vari loci non-HLA, in particolare geni del network citochinico localizzati nelle vicinanze o al di fuori della regione HLA, sembrano in grado di modificare in parte il rischio di MC. La malattia, inoltre, può associarsi a comorbilità autoimmune, tuttavia i fattori responsabili di tale maggiore gravità clinica sono in larga misura sconosciuti. Il presente studio aveva quindi come obiettivo quello di indagare, in una popolazione ad elevata incidenza di MC, il ruolo di alcuni polimorfismi del network citochinico (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10) nel modificare la suscettibilità alla celiachia e la sua associazione con la poli-autoimmunità. Sono stati analizzati polimorfismi citochinici in 50 pazienti MC sardi di cui 20 con poli-autoimmunità, sottoposti a dieta gluten-free nonché in due gruppi di controllo costituiti da soggetti non celiaci. L'analisi ha messo in evidenza un aumento del rischio di MC nei portatori dell'allele TNF- $\alpha$  -308A (OR 2,23, IC95% 0,99-5,02) e nei portatori del genotipo IL-10 -1082AA (OR 5,27, IC95% 1,75-15,90), mentre il polimorfismo IL-6 -174G>C non presentava associazione significativa con la MC. Inoltre, l'allele A del TNF- $\alpha$  si associava specificamente ad aumento del rischio di poli-autoimmunità. L'analisi del microbiota (effettuata mediante sequenziamento del gene dell'RNA ribosomiale 16S batterico) ha messo in evidenza una significativa riduzione dei ceppi di Bacteroides e un aumento dei ceppi di Firmicutes soprattutto nei pazienti con MC con poli-autoimmunità rispetto a quelli senza. E' stata inoltre osservata una maggiore abbondanza di Euryarchaeota e Mongibacteriaceae nei pazienti con genotipo HLA-DQ8 rispetto a quelli con HLA-DQ2. Questi risultati costituiscono la base di partenza per futuri studi di convalida su casistiche più ampie, che potrebbero a loro volta portare a promettenti applicazioni diagnostiche.

**Parole chiave:** malattia celiaca, poli-autoimmunità, polimorfismi del network citochinico, microbiota

# 1. INTRODUZIONE

Secondo la definizione di Oslo, la celiachia (malattia celiaca, MC) è un'enteropatia cronica immuno-mediata caratterizzata da molteplici vie patogenetiche e innescata dall'ingestione di alimenti contenenti glutine in individui geneticamente predisposti (Ludvigsson et al., 2013). Un tempo considerata una condizione rara dell'età pediatrica, la MC ha visto negli ultimi decenni un marcato aumento di incidenza sia nei paesi avanzati che in quelli in via di sviluppo, per cui oggi la prevalenza della malattia si stima intorno all'1%, con differenze consistenti a seconda dell'area geografica (Pes et al., 2019; Caio et al., 2019). In Italia, la MC rappresenta una importante causa di morbilità, specie in età pediatrica e nel sesso femminile (Dubé et al., 2005) e comporta considerevoli costi sanitari (Catassi et al., 2014).

La patogenesi della MC è conosciuta solo in parte. I peptidi del glutine posseggono epitopi ad alto contenuto di prolina che sono resistenti all'azione delle proteasi gastrointestinali (Steinsbo et al., 2014): essi possono filtrare attraverso l'epitelio intestinale a causa di un aumento della permeabilità forse mediata dal legame diretto della gliadina col recettore delle chemochine CXCR3 situato nelle *tight junctions* degli enterociti (Lammers et al., 2008). I peptidi, resi immunogenici dalla deamidazione operata dalla transglutaminasi tissutale, si legano alle molecole DQ2/8 nelle cellule dendritiche presentanti l'antigene innescando una risposta immune adattativa che vede coinvolti i linfociti T CD4+ localizzati nella mucosa intestinale (Beitnes et al., 2012). I linfociti T CD4+ attivati producono alti livelli di IFN- $\gamma$ , che induce la citotossicità dei linfociti intraepiteliali (IEL), e di interleuchina 21, coinvolta nella risposta dei linfociti B dipendente dai linfociti T (Bodd et al.,

2010). Nei pazienti celiaci non trattati è stata descritta anche la presenza di linfociti T CD4+ produttori di IL-17 ma il loro ruolo preciso deve essere ancora chiarito (Monteleone et al., 2010; Fernandez et al., 2011). La distruzione degli enterociti nella mucosa infiammata avviene ad opera dei linfociti intraepiteliali: essi vengono attivati da segnali di stress provenienti dalle cellule epiteliali stesse quali, ad esempio, la proteina codificata dal MHC class I chain-related A (MICA) (Malamut et al., 2010), con il concorso dell'interleuchina 15 e del IFN- $\alpha$  (Monteleone et al., 2001). I linfociti migrano nella mucosa sub-epiteliale e rilasciano varie citochine pro-infiammatorie tra cui l'IFN- $\gamma$ , l'interleuchina 2, l'interleuchina 4, l'interleuchina 15 e il TNF- $\alpha$  (Beckett et al., 1999). I linfociti intraepiteliali dopo aver acquisito il fenotipo di cellule NK (mediante sovraespressione del recettore NKG2D) sono i principali responsabili dell'atrofia dei villi nella MC (Setty et al., 2015).

I dati della letteratura riportano che la MC si associa frequentemente ad una poli-autoimmunità (PAI): essa comprende malattie come la tiroidite autoimmune (tiroidite di Hashimoto, HT), il diabete di tipo 1, la psoriasi e la malattia di Behçet (Guariso et al., 2007; Demirezer Bolat et al., 2015; Canova et al., 2016; Assa et al., 2017). Uno studio effettuato su pazienti celiaci della Sardegna, regione dove la MC è particolarmente frequente (Fanciulli et al., 2005), ha dimostrato che circa il 35% dei pazienti celiaci sviluppa almeno un'altra malattia autoimmune, confermando così l'associazione statisticamente significativa della MC con la predisposizione alla morbilità autoimmune (Bibbò et al., 2017). In altre casistiche riportate in letteratura la percentuale risulta però inferiore (Canova et al., 2016). Per tale motivo la popolazione sarda rappresenta l'ambiente ideale per lo studio della MC a causa

del suo background genetico omogeneo e ben conservato (Sardu et al., 2012). La concomitanza di MC e altre malattie autoimmuni avvalorà il concetto che alcuni meccanismi genetici e immunitari che possono contribuire alla perdita dell'immunitolleranza, siano condivisi con altre malattie autoimmuni. È stato ipotizzato il rischio che i pazienti con MC non diagnosticata continuino ad introdurre il glutine andando così progressivamente incontro ad una alterazione della risposta immune col conseguente esordio di altre malattie autoimmuni. Al momento, tuttavia, non è chiaro se la diagnosi precoce e il trattamento della MC con la dieta gluten-free siano in grado di modificare tale rischio (Lundin et al., 2015).

### **1.1. Il ruolo del sistema HLA**

Il rischio genetico associato alla MC dipende principalmente da varianti che codificano per gli eterodimeri DQ2/DQ8 codificati dal sistema degli antigeni linfocitari (HLA) (Sollid et al., 1989). Questi eterodimeri sono proteine che legano i peptidi del glutine e li presentano ai linfociti T CD4+ determinando la loro attivazione e innescando una complessa risposta immunitaria, che coinvolge sia il sistema innato che quello adattativo (Bibbò et al., 2016). Questi eventi provocano le lesioni caratteristiche della MC nella mucosa intestinale e la conseguente comparsa del malassorbimento (Di Sabatino e Corazza, 2009).

La suscettibilità all'insorgenza della MC è strettamente legata agli aplotipi HLA. Oltre il 90% dei pazienti con MC risultano portatori dell'aplotipo HLA-DQ2.5cis (definito dagli alleli DQA1\*0501-DQB1\*0201 e DRB1\*03) o l'aplotipo HLA-

DQ2.5trans (definito dagli alleli DQA1\*0505–DQB1\*0301/DQA1\*0201–DQB1\*0202), mentre solo il 5% circa dei celiaci è portatore dell’aplotipo HLA-DQ8 (codificato dagli alleli DQA1\*0301–DQB1\*0302 e DRB1\*04). Una percentuale trascurabile di pazienti presenta infine il cosiddetto aplotipo HLA–DQ2.2 codificato dagli alleli DQA1\*0201– DQB1\*02 e DRB1\*07 (Karell et al., 2003). Fino al 20-30% degli individui Caucasicci senza MC presenta gli aplotipi HLA predisponenti, ma solo l’1% di essi sviluppa la malattia (Sollid et al., 2005). Ciò è una chiara indicazione dell’influenza di geni diversi da quelli HLA nella genesi della malattia; finora più di 40 geni non-HLA sono stati identificati in relazione al rischio di MC attraverso studi di scansione genomica (GWA) (Dubois et al., 2010; Kuja-Halkola et al., 2016) per cui la MC può essere considerata un tipico tratto poligenico.

## **1.2. Il ruolo dei fattori genetici non-HLA**

I circa 40 loci non HLA sono in parte condivisi col diabete di tipo 1 (T1D), l’artrite reumatoide e il lupus eritematoso sistemico, spiegando un ulteriore 5% di rischio di MC e indicando così l’esistenza di uno sfondo immunogenetico condiviso della MC con altre malattie autoimmuni.

La dissezione genetica della malattia e l’analisi del ruolo dei loci non-HLA responsabili risultano difficili in quanto, come per la maggior parte delle patologie complesse, nella MC i fattori che contribuiscono a modulare il fenotipo clinico interagiscono mutuamente in modo poco conosciuto. Dagli anni 1990 ad oggi sono stati condotti vari studi mirati a identificare e caratterizzare polimorfismi in geni

correlati alla risposta infiammatoria, in relazione alla predisposizione per l'insorgenza della MC o la sua progressione. Vari polimorfismi sono stati fino ad ora identificati ed analizzati, soprattutto all'interno del cosiddetto network citochinico, che codificano per l'interferon gamma (Rueda et al., 2004), l'interleuchina 2 (Guo et al., 2015), l'interleuchina 6 (de Albuquerque Maranhão et al., 2015), l'interleuchina 15 (Escudero-Hernández et al., 2017), l'interleuchina 17 (Akbulut et al., 2017), il CCR5 (Słomiński et al., 2017) e il TNF- $\alpha$  (Rossi et al., 2015). I risultati di questi studi sono molto spesso inconsistenti e indicano che in generale l'effetto di tali polimorfismi risente del particolare gruppo etnico indagato, e la significatività statistica della loro associazione con la MC risulta estremamente variabile. Pertanto numerosi aspetti rimangono ancora da chiarire per quanto riguarda il rischio di MC per alcuni dei sopramenzionati geni in popolazioni di diversa origine etnica (Cummins et al., 2009). Inoltre alcuni problemi di grande rilevanza non sono stati adeguatamente affrontati quali, ad esempio, le mutue interazioni tra varianti geniche di suscettibilità (epistasi) e le interazioni tra fattori genetici e fattori di rischio esogeni.

### **1.3. Il ruolo del fattore di necrosi tumorale $\alpha$**

Alcune citochine svolgono un ruolo patogenetico nella MC dato che possono causare iperproliferazione linfocitaria e apoptosi (morte cellulare) degli enterociti, cui consegue l'atrofia dei villi intestinali. Come è noto il ruolo della citochina proinfiammatoria TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ) nella patogenesi della celiachia è stato ipotizzato oltre vent'anni fa (de la Concha et al., 2000; Rossi et al.,

2015). La sua importanza è dimostrata dal fatto che l'uso di anticorpi monoclonali contro il TNF- $\alpha$  (*infliximab*) è in grado di bloccare la cascata infiammatoria e migliorare notevolmente i sintomi della MC refrattaria agli steroidi (Rawal et al., 2015). Tale citochina è codificata da un gene che mappa sul cromosoma 6p21.3 (OMIM 191160) in linkage disequilibrium con il complesso HLA (de la Concha et al., 2000). Il gene del TNF- $\alpha$  codifica per una citochina pro-infiammatoria, prodotta principalmente dalle cellule della linea monocito/macrofagica e secreta in risposta a uno stimolo quale un'infezione batterica, virale o parassitaria. Questa citochina si lega a due recettori, TNFR1 e TNFR2, localizzati sulla membrana delle cellule bersaglio, attivando i fagociti in maniera tale che questi possano svolgere la loro funzione di rimozione di agenti infettivi e detriti cellulari, aumentando l'espressione di molecole di adesione dell'endotelio vascolare per consentire a macrofagi e neutrofilo di arrivare nel sito in cui è avvenuto il danno, e inducendo la produzione di altre citochine.

### **1.3.1. Il polimorfismo TNF- $\alpha$ -308G>A**

L'associazione di alcuni polimorfismi genetici localizzati nel promotore del gene TNF- $\alpha$  è stata indagata in relazione alla suscettibilità alla celiachia (Garrote et al., 2002; Cataldo et al., 2003) con risultati piuttosto contrastanti. L'allele più frequente del polimorfismo funzionale (*rs1800629*) corrispondente al codone -308 nel promotore del gene TNF- $\alpha$  è il nucleotide G mentre il nucleotide A è più raro e si associa a livelli più elevati di espressione della proteina pro-infiammatoria. Due metanalisi relativamente recenti hanno riesaminato l'associazione del polimorfismo TNF- $\alpha$  -308G>A col rischio di insorgenza della MC (Khan et al., 2016;

Aflatoonian et al., 2019) giungendo alla conclusione che l'associazione è positiva e statisticamente significativa. In particolare, la metanalisi di Aflatoonian et al. ha confermato l'esistenza di tale associazione in vari gruppi etnici, analisi che non era stata invece effettuata nel precedente lavoro di Khan et al.

## **1.4. Interleuchina 6 e celiachia**

L'interleuchina 6 è una citochina pleiotropica implicata nella regolazione di numerose funzioni cellulari, tra cui quelle del sistema immunitario e legate all'infiammazione. Mediante studi di linkage si è potuto stabilire che il gene dell'interleuchina 6 mappa sul cromosoma 7p21 (Bowcock et al., 1988) quindi non in linkage con la regione HLA.

### **1.4.1. Il polimorfismo IL-6 -174G>C**

Un polimorfismo della regione del promotore del gene, IL-6 -174G>C (*rs1800795*), ha significato funzionale in quanto l'allele G si associa ad una concentrazione plasmatica di IL-6 più elevata e ad una risposta infiammatoria più intensa. Benché i primi studi caso-controllo sulla relazione tra tale polimorfismo e insorgenza della MC abbiano suggerito un'associazione positiva (Dema et al., 2009; de Albuquerque Maranhão et al., 2015) analisi più recenti effettuate su casistiche più ampie hanno dato luogo a risultati controversi e inconclusivi (Barartabar et al., 2018). Una recente metanalisi di Aflatoonian et al. comprendente 5 studi caso-controllo, di cui 4 su casistiche italiane, sembra escludere un ruolo

importante del polimorfismo IL-6 -174G>C sulla suscettibilità a sviluppare la MC (Aflatoonian et al., 2019).

## **1.5. Interleuchina 10 e celiachia**

L'interleuchina 10 è una citochina dotata di importanti funzioni regolatorie nella mucosa intestinale. Essa è in grado di inibire la risposta linfocitaria Th1 per cui una riduzione del suo rilascio si associa ad una eccessiva stimolazione dei meccanismi infiammatori che sono in parte responsabili del danno alla mucosa intestinale dei pazienti celiaci (Sollid et al., 1989). Il ruolo cruciale della IL-10 nella celiachia è dimostrato dalla possibilità di sopprimere l'attivazione specifica dei linfociti T indotta dalla gliadina mediante l'uso della IL-10 umana ricombinante (rhIL-10) (Salvati et al., 2005).

### **1.5.1. Il polimorfismo IL-10 -1082 A>G**

Sono noti numerosi polimorfismi funzionali del promotore del gene codificante l'IL-10 sul cromosoma 1: il polimorfismo -1082 A>G (*rs1800896*) è stato studiato in varie casistiche di celiaci, incluse alcune italiane, ma con risultati contrastanti (Garrote et al., 2005; Lio et al., 2005; Cataldo et al., 2003).

## **1.6. Il recettore 5 delle chemochine (CCR5)**

Il recettore delle chemochine CCR5 svolge un ruolo importante nella risposta immune (Qidwai et al., 2016). La sua variante allelica più frequente, localizzata nell'esone 1, nota come  $\Delta 32$ , si associa ad un aumento dell'insorgenza di varie malattie caratterizzate da una componente infiammatoria e autoimmune quali la sclerosi multipla (Sellebjerg et al., 2000), il diabete di tipo 2 (Muntinghe et al., 2009) l'asma (Bisset et al., 2005) e la malattia di Behçet (Song et al., 2014), benché tale associazione sia stata posta in dubbio da alcuni autori (Ghorban et al., 2013).

### **1.6.1. La mutazione $\Delta 32$ del recettore 5 delle chemochine (CCR5)**

Per quanto riguarda la MC, Smyth et al. hanno riportato che la mutazione CCR5- $\Delta 32$  sarebbe associata ad una riduzione della suscettibilità (Smyth et al., 2008), risultato apparentemente in contrasto con quello riportato da Słomiński et al.; in realtà quest'ultimo studio suggerisce che l'allele CCR5- $\Delta 32$  è in grado di proteggere dallo sviluppo del diabete di tipo 1 ma aumenterebbe il rischio di celiachia nei pazienti che hanno già sviluppato il diabete (Slominski et al., 2017).

## **1.7. La glucosio-6-fosfato deidrogenasi**

La glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD) è un enzima che svolge un ruolo chiave nelle reazioni di ossidoriduzione che avvengono nel citoplasma cellulare. La proteina è codificata da un gene (OMIM 305900) che mappa sul cromosoma Xq28. Un'attività G6PD è stata dimostrata nella mucosa intestinale umana sin dagli anni 1960 e una sua riduzione è stata segnalata in pazienti con diarrea cronica e altre

malattie gastrointestinali soprattutto se accompagnate ad ispessimento della mucosa e dello strato ghiandolare (Burhol et al., 1966). Benché un'associazione specifica della MC con la carenza di G6PD geneticamente determinata sia stata riportata aneddoticamente (Hosnut et al., 2010), in letteratura non esistono studi sistematici su tale associazione. L'inserimento della G6PD tra i geni analizzati in questo lavoro è giustificato anche dal fatto che di recente la carenza dell'enzima sembra svolgere un ruolo proinfiammatorio ed è implicata nella patogenesi di varie malattie (Pes et al., 2019, Fois et al., 2021).

#### **1.7.1. La mutazione 563 C→T (G6PD Med, S188F) della glucosio-6-fosfato deidrogenasi**

Nella popolazione sarda è frequente una mutazione con perdita di funzione nota come variante *G6PD Med* (transizione 563 C→T che comporta la sostituzione aminoacidica S188F). In genere è asintomatica ma in seguito a stimoli stressogeni può dar luogo ad anemia emolitica o ittero neonatale. Dato che la mutazione è localizzata sul cromosoma X i maschi portatori della mutazione sono emizigoti ed esprimono in genere un fenotipo di carenza totale, mentre le donne portatrici della mutazione possono essere omozigoti, con fenotipo simile a quello dei maschi emizigoti, oppure eterozigoti con un fenotipo di carenza parziale (Pes et al., 2019).

### **1.8. Il ruolo del microbiota intestinale**

La predisposizione genetica è necessaria ma non sufficiente per lo sviluppo della MC. Come per altri disturbi immunitari, i dati epidemiologici suggeriscono che il rischio di MC è influenzato da ulteriori fattori ambientali, infezioni enteriche e/o

uso di antibiotici (Pes et al., 2019). Dato l'impatto di tali condizioni sulle comunità microbiche intestinali, si assiste ad una crescita di interesse per il ruolo del microbiota intestinale nella MC. Inoltre, è stato dimostrato che il microbiota intestinale è essenziale per lo sviluppo e la maturazione del tessuto linfoide associato all'intestino (Kamada et al., 2014). Pertanto, non sorprende che nelle malattie autoimmuni possano verificarsi alterazioni nella composizione tassonomica (McLean et al., 2015). Alterazioni del microbiota intestinale sono state riportate nella MC (Cenit et al., 2015; Pes et al., 2019). Il genotipo HLA-DQ2, di per sé, influenza la composizione del microbiota intestinale essendo associato ad una maggiore abbondanza relativa di *Firmicutes* e *Proteobacteria* e ad una riduzione di *Bifidobacterium* (Olivares et al., 2015). Questi dati suggeriscono che il genotipo dell'ospite, in concomitanza con fattori ambientali, potrebbe avere un effetto selettivo nei confronti dei colonizzatori intestinali. D'altra parte, il microbiota intestinale è un ecosistema altamente complesso, con numerose funzioni ridondanti, che potrebbe modulare i rapporti tra fattori immunogenetici (HLA e non-HLA) e ambientali (alimenti, infezioni e farmaci), influenzando così lo sviluppo della MC e di altre patologie immunologiche. Pertanto, lo studio dei rapporti tra fattori genetici dell'ospite e variazioni del microbiota intestinale negli individui MC presenta aspetti di vasto interesse anche in rapporto alla comorbilità autoimmune.

## 2. SCOPO DELLA TESI

Un quesito fondamentale che riguarda la comparsa del danno infiammatorio intestinale nella MC è come mai esso non si manifesti in tutti i soggetti che non hanno eliminato il glutine dalla dieta e sono portatori degli alplotipi HLA predisponenti. Esistono fattori genetici o esogeni protettivi che prevengono la comparsa della reazione immune glutine-dipendente? In effetti, data l'esistenza di ampie differenze di prevalenza della MC nelle varie popolazioni si può ipotizzare l'esistenza di fattori che agendo in senso protettivo o peggiorativo contribuiscono a determinare il rischio globale. Obiettivo principale del presente lavoro di tesi è stato quello di indagare il ruolo di alcuni polimorfismi genetici implicati nella risposta infiammatoria nel rischio di MC in una popolazione nella quale esso è particolarmente elevato. In particolare mi sono chiesta se l'effetto degli alplotipi HLA di suscettibilità della malattia possa essere modulato da fattori non-HLA, sia endogeni (alcuni polimorfismi di geni relati al network citochinico) che esogeni (microbiota intestinale). La casistica scelta per tale indagine era formata da soggetti sardi, provenienti cioè da una regione in cui la MC è piuttosto frequente (Fanciulli et al., 2005). A questo riguardo mi sono posta la domanda se l'elevata suscettibilità alla MC nella popolazione sarda, o all'interno di gruppi di tale popolazione, possa essere la conseguenza di una diversa distribuzione di tali fattori genetici (polimorfismi infiammatori) il cui effetto si sovrappone a quello degli agenti etiologici primari (HLA, glutine). Altra questione di un certo rilievo è quella relativa al ruolo dei polimorfismi infiammatori sulla comparsa di comorbilità

autoimmune nel soggetto già diagnosticato con la MC, un aspetto che non trova sufficiente riscontro in letteratura.

Occorre ricordare che la popolazione sarda era caratterizzata fino al 1950 da una forte prevalenza della malaria (Tognotti et al., 2009). Questa malattia infettiva ha probabilmente operato una selezione nei geni infiammatori: si può quindi ipotizzare che particolari assetti genetici che modificano la risposta infiammatoria si siano fissati nella popolazione e facciano sentire il loro effetto anche una volta che la malaria è stata eradicata.

Per tentare di rispondere ai suddetti quesiti mi sono avvalsa di una casistica di circa 50 soggetti con MC, e dei relativi controlli, che sono stati caratterizzati, oltre che per gli aplotipi HLA, per quanto riguarda i marcatori di geni correlati al network citochinico e per il profilo del microbiota intestinale. In particolare, lo studio ha comportato:

- 1) il reclutamento di un gruppo di pazienti con diagnosi di MC diagnosticata endoscopicamente, e loro caratterizzazione clinica, ivi incluso l'accertamento di eventuale poli-autoimmunità;
- 2) la genotipizzazione dei polimorfismi HLA associati alla specificità DQ2/8 per l'accertamento della presenza dei principali marcatori di suscettibilità;
- 3) la genotipizzazione di alcuni polimorfismi del network citochinico (TNF- $\alpha$ , interleuchina-6 e interleuchina-10) e chemochinico (CCR5- $\Delta$ 32);

- 4) la tipizzazione della variante G6PD *Med* di cui si è ipotizzato un ruolo proinfiammatorio;
- 5) una parziale caratterizzazione del microbiota intestinale (limitatamente al rapporto *Firmicutes/Bacteroidetes*).

## 3. PAZIENTI E METODI

### 3.1. Reclutamento dei partecipanti allo studio

Ai fini di questo studio sono stati selezionati 50 pazienti con MC tra quelli seguiti regolarmente presso un ospedale universitario (Clinica Medica, Università di Sassari, Italia). La numerosità campionaria è stata calcolata per una potenza statistica dell'80% e un 25% di differenza nell'endpoint primario, considerando un errore  $\alpha$  pari a 0,05 (<https://clincalc.com/stats/samplesize.aspx>). Nei pazienti celiaci la malattia era stata diagnosticata endoscopicamente secondo le linee guida internazionali (Ludvigsson et al., 2014). I criteri di inclusione comprendevano (i) un indice di massa corporea (BMI) compreso tra 18 e 25 kg/m<sup>2</sup>, (ii) una durata della dieta priva di glutine (GFD) maggiore o uguale a 1 anno, ed (iii) un'età compresa tra 18 e 60 anni. I criteri di esclusione erano: (i) assunzione di antibiotici, probiotici o prebiotici nei 3 mesi precedenti il reclutamento; (ii) una dieta vegetariana o vegana; (iii) un'anamnesi patologica di tumori maligni, gravidanza, abuso di alcool o tossicodipendenza. I pazienti sono stati quindi classificati in base alla presenza o meno di altre patologie autoimmuni: (i) pazienti con PAI e (ii) pazienti senza PAI. Per lo studio sono state prese in considerazione solo le malattie autoimmuni confermate da certificazione specialistica. Dopo la valutazione clinica, ogni paziente ha fornito campioni di sangue e di feci. Sono stati inoltre somministrati tre questionari riguardanti dati anamnestici e antropometrici, sintomi gastrointestinali, abitudini alimentari e stile di vita. Tutti i pazienti reclutati hanno firmato il consenso informato allo studio. Lo studio è stato condotto in accordo con la Dichiarazione di

Helsinki e il protocollo è stato approvato dal Comitato Etico Locale “Comitato Etico Indipendente, AOU di Cagliari” (Prot. n. PG/2019/4511).

### **3.2. Raccolta dei dati clinici e dei campioni biologici**

Un primo questionario ha raccolto i parametri antropometrici (altezza, peso, circonferenza addominale), l'anamnesi di MC e altre malattie autoimmuni, farmaci e storia familiare. Il secondo questionario, la Gastrointestinal Sintomi Rating Scale (GSRS), mirava a valutare i sintomi gastrointestinali in modo standardizzato (Svedlund et al., 1988). Nel terzo questionario, basato su un protocollo precedentemente utilizzato per valutare il tipo di dieta nei pazienti italiani (Buscemi et al., 2015), sono state registrate le abitudini alimentari. Questo questionario sulla frequenza alimentare ha indagato la frequenza settimanale e la quantità giornaliera dei carboidrati complessi, fibre e proteine animali assunte, e il consumo di bevande alcoliche, caffè e bibite analcoliche. L'aderenza alla GFD è stata valutata di routine mediante valutazione clinica, revisione dietetica e anticorpi sierici (transglutaminasi IgA/IgG e/o gliadina peptide IgA/IgG deamidata), secondo le attuali linee guida (Ludvigsson et al., 2014). Nella stessa giornata è stata effettuata l'acquisizione dei dati e dei campioni biologici e la valutazione dei marker sierologici a conferma della GFD. I campioni di sangue sono stati raccolti al mattino, con il paziente a digiuno da almeno 8 ore. Il campione fecale è stato mantenuto a temperatura ambiente entro un massimo di 6 ore dall'evacuazione ed è stato conservato a  $-80^{\circ}\text{C}$  fino al momento dell'analisi.

### **3.3. Estrazione del DNA genomico e analisi dei genotipi**

L'estrazione del DNA genomico dai leucociti del sangue periferico è stata effettuata seguendo una metodica salting-out rapida con Proteinasi K (Miller et al., 1988) riportata nell'Appendice A a pag. 57.

### **3.4. Amplificazione del DNA mediante reazione a catena della polimerasi (PCR) e visualizzazione dei prodotti mediante elettroforesi su gel di agarosio**

La genotipizzazione degli alleli HLA nonché dei polimorfismi del network citochinico, chemochinico e della G6PD è stata effettuata mediante metodiche PCR sulla base dei protocolli riportati in letteratura. In particolare, l'amplificazione dei geni HLA è stata effettuata con la metodica rapida descritta da Sacchetti et al. (Sacchetti et al, 2001) e riportata nell'Appendice C a pag. 61; per l'amplificazione del polimorfismo del gene TNF- $\alpha$  è stata applicata la metodica di Wilson et al. (Wilson et al., 1997); per l'amplificazione del polimorfismo IL-6 -174G>C e del polimorfismo IL-10 -1082G>A la metodica di Pes et al. (Pes et al., 2004) entrambe riportate nell'appendice D a pag. 64; la genotipizzazione della mutazione  $\Delta$ 32 del gene CCR5 è stata effettuata mediante la metodica riportata da Bakshi et al. (Bakshi et al., 1998) e riportata nell'Appendice E a pag. 66. Infine la tipizzazione della mutazione G6PD Med è stata effettuata con metodica PCR-RFLP come riportato nella Appendice F a pag. 66. I frammenti di DNA amplificati sono stati visualizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio.

### **3.5. Analisi del microbiota intestinale**

L'analisi è stata condotta in collaborazione col parco tecnologico Porto Conte Ricerche di Tramariglio (SS) (Prof. S. Uzzau). Dopo amplificazione e sequenziamento della regione V4 del gene 16S rRNA è stata ricostruita la composizione del microbiota intestinale dei soli pazienti celiaci mediante l'aggregazione dei dati tassonomici. Per gli scopi del presente studio sono stati analizzati esclusivamente i *phyla* più rappresentati quali Firmicutes, Bacteroidetes attraverso il calcolo del rapporto tra i due tipi.

### **3.6. Analisi statistica**

L'analisi statistica dei dati raccolti è stata effettuata con il pacchetto statistico SPSS 22.0 (ver. per Windows) con una soglia di significatività statistica di  $P < 0.05$ . Le variabili continue sono state espresse come medie e deviazioni standard. I conteggi, incluse i dati aplotipici/allelici, sono stati espressi come frequenze assolute e percentuali. L'indipendenza/associazione tra le variabili categoriche è stata valutata mediante test del chi-quadrato o test esatto di Fisher. Il calcolo dell'odds ratio (OR) per la stima del rischio di MC, o del rischio di poli-autoimmunità, è stato effettuato mediante analisi della regressione logistica dopo correzione per le variabili età e sesso.

## 4. RISULTATI

### 4.1. Caratteristiche sociodemografiche dei partecipanti allo studio

#### 4.1.1. Pazienti celiaci

L'analisi genetica è stata effettuata su un totale di 50 soggetti con diagnosi clinica ed endoscopica di malattia celiaca reclutati presso la sezione di Gastroenterologia dell'Istituto di Clinica Medica dell'Università di Sassari, nonché in due gruppi di controllo, paragonabili per età e sesso, il primo (n=52) reclutato in una regione della Sardegna ad alta incidenza di celiachia (Ogliastra) e un altro (n=80) rappresentativo della popolazione generale.

**Tabella 1.** Caratteristiche sociodemografiche dei partecipanti allo studio.

<b>Partecipanti</b>	<b>Celiaci con e senza poli–autoimmunità</b>	<b>Gruppo di controllo proveniente dall'area ad alta incidenza di celiachia</b>	<b>Gruppo di controllo rappresentativo della popolazione generale della Sardegna</b>
Numero	50	52	80
Età (anni)	39.2 ± 10.7	40.1 ± 9.5	42.5 ± 11.6
Rapporto M/F	6/44	10/42	20/60
% fumatori	26%	15%	13%
Statura (cm)	162,0 ± 6,8	158,1 ± 13,2	160,5 ± 9,8
Peso (kg)	53,8 ± 8,9	60,1 ± 10,8	62,0 ± 11,8
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	20,4 ± 2,5	25,2 ± 14.5	25,2 ± 10,7
Circonferenza addominale (cm)	69,5 ± 7,4	98,8 ± 12,3	89,7 ± 8,8

Le caratteristiche dei 50 pazienti celiaci sono illustrate nella Tabella 1. L'età media era di 39,2 anni compresa tra 18 e 52 anni, in prevalenza femmine (88%). Il 26% era fumatore e tutti seguivano strettamente una dieta gluten-free.

Dei 50 pazienti celiaci inclusi nello studio, 20 presentavano un'associazione con altre malattie autoimmuni (4 maschi e 16 femmine): 14 con tiroidite autoimmune di Hashimoto, 3 con diabete di tipo 1, 2 con la sindrome di Sjögren, 2 con la psoriasi, 2 con la fibromialgia e 1 con l'asma. Otto pazienti presentavano almeno 2 malattie autoimmuni a parte la celiachia. Diciannove pazienti su 50 (38%) presentavano familiarità per malattie autoimmuni. Non erano presenti differenze tra i gruppi per quanto riguarda la frequenza di consumo di singoli alimenti sulla base del questionario GSRS.

#### **4.1.2. Gruppi di controllo**

Per questo studio sono stati previsti due gruppi di controllo: il primo era formato da 52 individui sani paragonabili per età e sesso al gruppo di celiaci ma originari di un'area interna della Sardegna ad elevata incidenza di MC. Il secondo gruppo era formato da 80 soggetti sani con età media 42 anni e provenienti dalle quattro province dell'isola: il DNA estratto da tali soggetti è stato ritenuto rappresentativo della struttura genetica della popolazione generale sarda.

### 4.1.3. Tipizzazione degli alleli HLA nei celiaci e nei controlli

### 4.1.4. Frequenze degli aplotipi/alleli HLA di suscettibilità

La distribuzione degli alleli HLA associati alla celiachia (alleli DQA1\*0501-DQB1\*0201 responsabili della specificità DQ2), e dell'allele DRB1\*04 (in linkage con gli alleli DQA1\*03-DQB1\*0302) responsabile della specificità DQ8 nei pazienti celiaci e nei due gruppi di controllo è riportata nella Tabella 2.

**Tabella 2.** Frequenze degli alleli HLA nei tre gruppi analizzati.

<b>Aplotipi/alleli</b>	<b>Celiaci</b>	<b>Controlli provenienti dall'area ad alta incidenza di CD</b>	<b>Controlli di popolazione</b>
HLA-DQ2.5	46/50 (92.0%) **	23/52 (44.2%)	32/80 (40%)
Solo DQA1*0501	50/50 (100%) **	37/52 (71.2%)	20/80 (25%)
Solo DQB1*0201	46/50 (92.0%) **	28/52 (53.8%)	5/80 (6%)
Solo DRB1*4	27/50 (54.0%)	25/52 (48.1%)	23/80 (29%)

\* P<0.05; \*\* p<0.01

È stato possibile accertare la presenza della specificità DQ2 (aplotipo DQA1\*0501-DQB1\*0201) nel 92% del totale dei pazienti celiaci genotipizzati (46/50) mentre il restante 8% dei pazienti privi della specificità DQ2 (4/50), come era da attendersi, risultava positivo per la presenza dell'allele DRB1\*04. Tale allele era presente nel

54% dei pazienti celiaci (27/50). Tra i 52 soggetti sani di controllo provenienti dalla popolazione ad alta incidenza di celiachia, l'aplotipo HLA-DQ2.5 (DQA1\*0501-DQB1\*0201) era presente nel 44,2% dei casi (23/52) e quella del solo allele DRB1\*04 nel 48.1% dei casi (25/52). Infine, tra i controlli sani rappresentativi della popolazione generale, il 25,0% (20/80) era portatore dell'allele DQA1\*0501, il 6,2% (5/80) era portatore dell'allele DQB1\*0201 e il 40,0% (32/80) era portatore dell'aplotipo DQA1\*0501-DQB1\*0201. Solo il 28.7% (23/80) non presentava nessuno degli alleli HLA precedenti ed era portatore dell'allele DRB1\*04. Le frequenze alleliche erano in equilibrio di Hardy-Weinberg.

Come atteso, la frequenza dell'aplotipo HLA-DQ2.5 era significativamente aumentata nei celiaci rispetto ai due gruppi di controllo ( $p < 0.0001$ ) così come per gli alleli DQA1\*0501 ( $p < 0.0001$ ) e DQB1\*0201 ( $p < 0.0001$ ). Invece la frequenza dell'allele DRB1\*04 non era significativamente aumentata nei celiaci rispetto ai controlli di area ad alta incidenza di celiachia ( $p = 0,549$ ) mentre lo era rispetto ai controlli rappresentativi della popolazione generale ( $p = 0.004$ ).

La distribuzione degli alleli HLA nei due sottogruppi di celiaci con o senza poli-autoimmunità è riportata nella Tabella 3. Dato che tutti i pazienti celiaci erano portatori dell'allele DQA1\*0501 non vi erano differenze tra i due sottogruppi riguardo a tale allele. Invece la frequenza dell'allele DQB1\*0201 presentava una differenza significativa (100% vs 80% rispettivamente tra quelli con e senza poli-autoimmunità), quindi tale marcatore sembra avere un lieve effetto protettivo nei confronti della comorbilità autoimmune. L'allele DRB1\*04 era più frequente nei celiaci con poli-autoimmunità rispetto a quelli senza autoimmunità benché la

differenza non fosse statisticamente significativa (70% vs 43%,  $p=0,086$ ). Tuttavia calcolando il l'OR dopo correzione per età il rischio risultava significativo (OR: 4,279, IC95% 1,083-16,90).

#### 4.1.5. Frequenze degli alleli HLA nei celiaci con e senza poli-autoimmunità

**Tabella 3.** Frequenze degli alleli HLA nei tre gruppi analizzati

<b>Aplotipi/alleli</b>	<b>Celiaci senza poli-autoimmunità</b>	<b>Celiaci con poli-autoimmunità</b>
HLA-DQ2.5	30/30 (100.0%) *	16/20 (80.0%)
Solo DQA1*0501	30/30 (100%)	20/20 (100.0%)
Solo DQB1*0201	30/30 (100.0%) *	16/20 (80.0%)
Solo DRB1*04	13/30 (43.3%)	14/20 (70.0%)

\*  $P<0.05$ ; \*\*  $p<0.01$

#### 4.1.6. Tipizzazione dei polimorfismi delle citochine

Le frequenze genotipiche e alleliche di tre polimorfismi del network citochinico (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10) sono riportati nella Tabella 4.

**Tabella 4.** Polimorfismi dei geni TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 del network citochinico nei pazienti celiaci e nei controlli

Polimorfismo TNF- $\alpha$  -308G>A (*rs1800629*)

Genotipi/alleli	Pazienti celiaci	Controlli provenienti dall'area ad alta incidenza di MC	Modello dominante (AA + AG vs GG)		Modello recessivo (AA vs AG + GG)	
			OR (95% IC)*#	valore P	OR (95% IC)*#	valore P
G/G	33 (66,0%)	29 (55,8%)	0,56 (0,23-1,37)	0,207	0,76 (0,13-4,40)	0,766
A/G	14 (28,0%)	20 (38,5%)				
A/A	3 (6,0%)	3 (5,8%)				
G	80 (80,0%)	78 (75,0%)	0,75 (0,39-1,45)	0,393		
A	20 (20,0%)	26 (25,0%)				
		<b>Controlli rappresentativi della popolazione generale della Sardegna</b>				
G/G	33 (66,0%)	66 (81,2%)	2,23 (0,99-5,02)	0,049	2,52 (0,41-15,64)	0,305
A/G	14 (28,0%)	13 (16,2%)				
A/A	3 (6,0%)	2 (2,5%)				
G	80 (80,0%)	143 (89,3%)	1,79 (0,91-3,52)	0,090		
A	20 (20,0%)	20 (10,6%)				

Polimorfismo IL-6 -174G>C (*rs1800795*)

Genotipi/alleli	Pazienti celiaci	Controlli provenienti dall'area ad alta incidenza di MC	Modello dominante (CC + GC vs GG)		Modello recessivo (CC vs GC + GG)	
			OR (95% IC)*	valore P	OR (95% IC)*	valore P
G/G	31 (62,0%)	39 (75,0%)	1,84 (0,79-4,30)	0,157	2,66 (0,65-10,93)	0,162
G/C	12 (24,0%)	10 (19,2%)				
C/C	7 (14,0%)	3 (5,8%)				
G	74 (74,0%)	88 (84,6%)	1,93 (0,96-3,87)	0,061		
C	26 (26,0%)	16 (15,4%)				

Genotipi/alleli	Pazienti celiaci	Controlli rappresentativi della popolazione generale della Sardegna	Modello dominante (CC + GC vs GG)		Modello recessivo (CC vs GC + GG)	
			OR (95% IC)*	valore P	OR (95% IC)*	valore P
G/G	31 (62,0%)	45 (56,2%)	0,79 (0,38-1,62)	0,517	2,01 (0,63-6,36)	0,229
G/C	12 (24,0%)	29 (36,2%)				
C/C	7 (14,0%)	6 (7,5%)				
G	74 (74,0%)	119 (74,3%)	1,02 (0,58-1,80)	0,946		
C	26 (26,0%)	41 (25,7%)				

\* È stato testato il rischio del genotipo/allele meno frequente

Polimorfismo IL-10 -1082A>G (*rs1800896*)

<b>Genotipi/alleli</b>	<b>Pazienti celiaci</b>	<b>Controlli provenienti dall'area ad alta incidenza di MC</b>
G/G	16 (32,0%)	17 (32,7%)
A/G	21 (42,0%)	27 (51,9%)
A/A	13 (26,0%)	8 (15,4%)
G	53 (53,0%)	61 (58,6%)
A	47 (47,0%)	43 (43,4%)

<b>Modello dominante (AA + AG vs GG)</b>	<b>Modello recessivo (AA vs AG + GG)</b>
OR (95% IC)	valore P
1,03 (0,45-2,37)	0,940
1,26 (0,72-2,19)	0,416

<b>Modello dominante (AA + AG vs GG)</b>	<b>Modello recessivo (AA vs AG + GG)</b>
OR (95% IC)	valore P
1,93 (0,72-5,17)	0,185

<b>Genotipi/alleli</b>	<b>Pazienti celiaci</b>	<b>Controlli rappresentativi della popolazione generale della Sardegna</b>
G/G	16 (32,0%)	17 (21,2%)
A/G	21 (42,0%)	58 (72,5%)
A/A	13 (26,0%)	5 (6,2%)
G	53 (53,0%)	92 (57,5%)
A	47 (47,0%)	68 (42,5%)

<b>Modello dominante (AA + AG vs GG)</b>	<b>Modello recessivo (AA vs AG + GG)</b>
OR (95% IC)	valore P
0,57 (0,26-1,28)	0,171
1,20 (0,73-1,98)	0,477

<b>Modello dominante (AA + AG vs GG)</b>	<b>Modello recessivo (AA vs AG + GG)</b>
OR (95% IC)	valore P
5,27 (1,75-15,90)	0,001

#### **4.1.7. Il polimorfismo TNF- $\alpha$ -308G>A**

L'analisi del polimorfismo al nucleotide -308G>A del promotore del gene TNF- $\alpha$  (*rs1800629*), così come quelli degli altri polimorfismi citochinici, è stato effettuato testando un modello dominante e un modello recessivo. L'analisi ha messo in evidenza una lieve riduzione non significativa della frequenza dei genotipi che contengono l'allele A nel gruppo dei celiaci rispetto al gruppo di controllo proveniente dall'area ad alta incidenza di celiachia, e questo nel caso di entrambi i tipi di modello (dominante: OR 0,56; recessivo: OR 0,76). Il confronto con il secondo gruppo di controllo, rappresentativo della genetica della popolazione sarda, ha permesso di mettere in evidenza un aumento della frequenza del genotipo AA, al limite della significatività statistica. L'allele A è associato ad un livello trascrizionale più elevato del gene e, in ultima analisi, ad un processo infiammatorio più intenso.

L'analisi del polimorfismo -308G>A nei sottogruppi di celiaci con o senza autoimmunità non ha messo in evidenza alcuna differenza significativa, anche dopo correzione per età e sesso.

#### **4.1.8. Il polimorfismo IL-6 -174G>C**

L'analisi del polimorfismo -174G>C del promotore dell'interleuchina 6 (*rs1800795*) ha messo in evidenza un forte aumento, peraltro non significativo, della frequenza del genotipo CC, e di conseguenza della frequenza dell'allele C nel gruppo dei celiaci rispetto al gruppo di controllo ad alta incidenza di malattia. Il

confronto tramite il modello recessivo (CC vs GC + GG) mostrava un OR di 2,66 (0,65-10,93). Viceversa, non si è rilevata alcuna differenza statisticamente significativa nel confronto tra il gruppo dei celiaci ed il gruppo di controllo della popolazione generale.

Ponendo a confronto i due sottogruppi di celiaci con e senza autoimmunità (Tabella 5) si può notare un lieve aumento dell'allele C senza che venga tuttavia superata la soglia della significatività statistica.

**Tabella 5.** Polimorfismi dei geni TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 del network citochinico nei pazienti celiaci con e senza poli-autoimmunità

<b>Polimorfismo</b>	<b>Genotipi/ alleli</b>	<b>N</b>	<b>Celiaci senza poli- autoimmunità</b>	<b>N</b>	<b>Celiaci con poli- autoimmunità</b>
TNF- $\alpha$ ( <i>rs1800629</i> )	G/G A/G A/A	30	22 (73,3%) 7 (23,3%) 1 (3,3%)	20	11 (55,0%) 7 (35,0%) 2 (10,0%)
alleli	G A	60	51 (85,0%) 9 (15,0%)	40	29 (72,5%) 11 (27,5%)
IL-6 ( <i>rs1800795</i> )	G/G G/C C/C	30	20 (66,6%) 7 (23,3%) 3 (10,0%)	20	11 (55,0%) 5 (25,0%) 4 (20,0%)
alleli	G C	60	47 (78,3%) 13 (21,6%)	40	27 (67,5%) 13 (32,5%)
IL-10 ( <i>rs1800896</i> )	G/G A/G A/A	30	9 (30,0%) 14 (46,7%) 7 (23,3%)	20	7 (35,0%) 7 (35,0%) 6 (30,0%)
alleli	G A	60	32 (53,3%) 47 (46,6%)	40	21 (52,5%) 19 (47,5%)

\* P<0.05; \*\* p<0.01

#### 4.1.9. Il polimorfismo IL-10 -1082A>G

Nel caso del polimorfismo del promotore dell'interleuchina 10 si notava un aumento della frequenza dell'allele A, che determina livelli più bassi della citochina, nei celiaci rispetto ai controlli. Il modello recessivo ha rivelato un forte aumento del rischio di MC nel confronto tra celiaci e controlli di popolazione, con OR pari a 5,27 (1,75-15,90); il confronto con i controlli dell'area ad alta incidenza di MC, mediante il modello recessivo non corretto ha invece messo in evidenza solo un aumento non significativo dell'OR (1,93, IC95% 0,72-5,17). Tuttavia, dopo correzione per sesso, età e positività per aplotipo HLA-DQ2.5 anche in questo confronto si osservava un aumento significativo dell'OR: 8,20 (IC95% 1,43-47,07), rivelando così una significativa interazione HLA/polimorfismo IL-10.

#### 4.1.10. Ricerca della mutazione $\Delta 32$ del gene CCR5

Le frequenze alleliche della mutazione  $\Delta 32$  del gene CCR5 sono riportati nella Tabella 6.

**Tabella 6.** Frequenza della mutazione  $\Delta 32$  del gene CCR5

<b>Mutazione</b>	<b>Pazienti celiaci</b>	<b>Controlli provenienti dall'area ad alta incidenza di MC</b>	<b>Controlli rappresentativi della popolazione generale della Sardegna</b>
CCR5 $\Delta 32$	2/50 (4,0%)	0/52 (0,0%)	2/80 (2,5%)

La presenza della mutazione  $\Delta 32$  del gene *CCR5* è stata riscontrata esclusivamente in due pazienti celiaci e in due campioni del gruppo di controllo proveniente da tutta la Sardegna mentre era assente nei controlli provenienti dall'area ad elevata incidenza di celiachia. Da segnalare che entrambi i pazienti celiaci con la mutazione facevano parte del gruppo di pazienti con poli-autoimmunità (Tabella 7).

**Tabella 7.** Frequenza della mutazione  $\Delta 32$  del gene *CCR5* nei celiaci con o senza poli-autoimmunità

Allele	Celiaci con poli-autoimmunità	Celiaci senza poli-autoimmunità
<i>CCR5</i> $\Delta 32$	2/20 (10,0%)	0/30 (0,0%)

#### 4.1.11. Ricerca della variante 563 C→T del gene *G6PD*

La mutazione *G6PD Med* (transizione al 563 C→T, S188F) frequente in Sardegna e nell'area Mediterranea è stata tipizzata nei celiaci e nei controlli, separatamente nei maschi e nelle femmine, come riportato nella Tabella 8.

**Tabella 8.** Frequenza della mutazione G6PD *Med*

<b>Mutazione G6PD <i>Med</i></b>	<b>Pazienti celiaci</b>	<b>Controlli provenienti dall'area ad alta incidenza di MC</b>	<b>Controlli rappresentativi della popolazione generale della Sardegna</b>
maschi	2/6 (33,3%)	2/26 (7,6%)	5/40 (12,5%)
femmine	4/44 (9,1%)	5/26 (19,2%)	9/40 (22,5%)
totale	6/50 (12,0%)	7/52 (13,4%)	14/80 (17,5%)

Le frequenze non differivano in modo significativo tra i gruppi, benché nei maschi celiaci la frequenza fosse di 2 su 6, pari al 33% mentre nelle femmine con MC di 4 su 44 pari al 9,1%: per quanto si tratti di numeri abbastanza piccoli si può notare un trend verso le frequenze più elevate nei celiaci rispetto ai gruppi di controllo.

**Tabella 9.** Frequenza della mutazione G6PD *Med* nei celiaci con o senza poli-autoimmunità

<b>Mutazione</b>	<b>Pazienti celiaci senza poli-autoimmunità</b>	<b>Pazienti celiaci con poli-autoimmunità</b>
G6PD <i>Med</i>	2/30 (6,7%)	4/20 (20,0%)

La frequenza era più elevata, benché non significativamente, nei celiaci con poli-autoimmunità, anche se l'esiguità del campione non consente alcuna conclusione definitiva.

#### 4.1.12. Analisi del microbiota intestinale

La composizione del microbiota intestinale è stata effettuata esclusivamente nei pazienti celiaci e il confronto riguardava soltanto i due sottogruppi con o senza poli-autoimmunità. A titolo di risultati preliminari, la Tabella 10 riporta la percentuale dei phyla Firmicutes e Bacteroidetes nei vari sottogruppi:

**Tabella 10.** Media delle percentuali dei principali *phyla* nei celiaci con o senza poli-autoimmunità.

<b>Phylum</b>	<b>Media totale</b>	<b>Pazienti celiaci senza poli- autoimmunità</b>	<b>Pazienti celiaci con poli- autoimmunità</b>
Firmicutes	0,52427871	0,51663993	0,53573688
Bacteroidetes	0,33528499	0,35093036	0,31181693
Rapporto Firmicutes/Bacteroidetes	2,06909876	1,97747569	2,20653335

Sono state osservate variazioni a diversi livelli tassonomici, in particolare un aumento del rapporto Firmicutes/Bacteroidetes nel sottogruppo dei pazienti celiaci con poliautoimmunità. Un'ulteriore analisi ha mostrato una maggiore abbondanza di Euryarchaeota e Mogibacteriaceae in pazienti con genotipo HLA-DQ8 rispetto a quelli con un HLA-DQ2. Al contrario, non sono state riscontrate differenze significative riguardo alle percentuali di Firmicutes e Bacteroidetes stratificando per i genotipi dei tre polimorfismi TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10.

## 5. DISCUSSIONE

La malattia celiaca è una patologia cronica autoimmune caratterizzata da una infiltrazione linfocitaria della mucosa intestinale associata ad atrofia dei villi e conseguente alterazione dell'assorbimento dei nutrienti alimentari (Ludvigsson et al., 2013). Il più importante fattore etiopatogenetico è l'esposizione alle proteine del glutine, presenti in alcuni cereali (Aziz et al., 2015) per cui l'unica terapia attualmente disponibile per la MC è l'eliminazione del glutine dalla dieta (Guandalini et al., 2014). L'osservazione di una predisposizione alla MC da parte di alcuni gruppi etnici rispetto ad altri (Cummins et al., 2009), nonché la maggiore frequenza di questa patologia nell'ambito di uno stesso gruppo familiare e nei gemelli (Dubois et al., 2010) ha suggerito da tempo il ruolo cruciale della componente genetica (75% circa della varianza del tratto). Il principale fattore di suscettibilità è rappresentato da alcuni aplotipi del sistema HLA. Tuttavia, solo l'1% dei portatori degli aplotipi HLA-DQ2/8 sviluppa la malattia per cui è stata postulata l'esistenza di altri fattori di rischio esogeni ed endogeni che agiscono in senso patogeno sugli individui geneticamente predisposti. Tra questi fattori genetici, alcune varianti dei geni del network citochinico dotate di attività pro-infiammatoria, sono ritenute in grado di modulare la suscettibilità alla malattia sullo sfondo della ereditarietà HLA; nella letteratura, però, gli studi sulle varianti non-HLA sono ancora poco numerosi e per giunta hanno dato risultati variabili a seconda del gruppo etnico indagato. È opportuno quindi allargare l'indagine a popolazioni geneticamente omogenee e caratterizzate da un'incidenza particolarmente elevata di MC, quale la popolazione sarda, nella quale queste

relazioni si sono probabilmente conservate. Infine, l'indagine dovrebbe essere estesa ad interessare anche il microbiota intestinale, fattore esogeno che può giocare un ruolo rilevante nella comparsa e nella progressione della MC (Collado et al., 2008; Olivares et al., 2018). Vari fattori tra cui la diminuzione della motilità intestinale, la sovracrescita batterica, lo stress psicosociale, la malnutrizione e i disturbi del tessuto linfoide dell'intestino possono modificare il microbiota intestinale inducendo uno stato di infiammazione cronica e quindi una maggiore fragilità e suscettibilità alle malattie autoimmuni. Sulla scorta di questi elementi, è stato ipotizzato che i batteri dotati di proprietà antiinfiammatorie, come alcuni ceppi di *Bifidobacterium*, possano mantenere l'equilibrio tra produzione di citochine pro e anti-infiammatorie (Lindfors et al., 2008). Questa ipotesi è in linea con la correlazione negativa riscontrata tra quantità di specie *Bifidobacterium* nel microbiota intestinale e i livelli di TNF- $\alpha$  (Klemenak et al., 2015), indicando in tal modo che la modulazione della popolazione bifidobatterica fecale può costituire una potenziale strategia terapeutica per attenuare la risposta infiammatoria che caratterizza la malattia. Un ulteriore aspetto meritevole di approfondimento è quello del ruolo svolto dai fattori genetici, sia HLA che non-HLA, e dai fattori microbiologici sulla comorbilità autoimmune che si osserva spesso nella celiachia.

In questo lavoro di tesi, avvalendomi della collaborazione con la Clinica Medica dell'Università di Sassari, ho avuto modo di analizzare una casistica di soggetti di origine sarda con diagnosi di MC formulata sulla base delle linee guida internazionali (Ludvigsson et al., 2014) e sottoposti a dieta gluten-free, e due gruppi di controllo, il primo proveniente da un'area della Sardegna ad alta incidenza di

celiachia e il secondo rappresentativo della popolazione generale. Dopo aver ottenuto il consenso informato da tutti i partecipanti e dopo aver provveduto ad estrarre il DNA genomico dal sangue periferico sono state effettuate le tipizzazioni genetico-molecolari mediante tecniche di biologia molecolare basate sull'amplificazione in vitro del DNA. I pazienti celiaci sono stati suddivisi in due gruppi sulla base della presenza di poli-autoimmunità in modo da poter effettuare confronti tra questi due sottogruppi sulla base dell'assetto genetico. Ai partecipanti celiaci, ma non ai controlli, è stato chiesto di fornire un campione di feci per l'analisi del microbiota, effettuata presso i laboratori del Porto Conte Ricerche di Tramariglio (resp. Prof. S. Uzzau).

### **5.1. Analisi degli alleli HLA di suscettibilità**

Sia nei pazienti celiaci che nei controlli sono stati determinati gli alleli e gli aplotipi di suscettibilità della malattia, vale a dire gli alleli DQA1\*0501 e DQB1\*0201, i quali codificano per la molecola DQ2, e l'allele DRB1\*04 che codifica per la molecola DR4 associata alla positività DQ8 (Sacchetti et al., 2001).

Come atteso, nonostante il numero di soggetti tipizzato non fosse molto elevato, ho potuto confermare un'associazione positiva significativa tra l'aplotipo HLA-DQ2.5 e la malattia, nonché un'associazione dello stesso aplotipo con la comorbilità autoimmune, più evidente nel sesso femminile ( $p < 0,0001$ ). Quest'ultima associazione risultava significativa anche considerando il solo allele HLA-DQB1\*0201 dal momento che tutti i celiaci con poli-autoimmunità erano portatori

dell'allele HLA-DQA1\*0501. Non è stato invece possibile testare tale associazione nei pazienti di sesso maschile in quanto nessuno di essi era negativo per HLA-DQ2.5, come riportato in letteratura (Bodis et al., 2018). L'allele DRB1\*4 era significativamente associato alla presenza di poli-autoimmunità dopo correzione per età e sesso ( $p < 0.0001$ ). Sulla base di questi risultati si può ritenere che lo screening sistematico degli alplotipi HLA in caso di sospetta celiachia, certamente non auspicabile né conveniente routinariamente a scopo diagnostico (Paul et al., 2017), sia tuttavia utile per stimare il rischio di poli-autoimmunità.

## **5.2. Analisi dei polimorfismi delle citochine**

In questo studio ho esaminato alcuni polimorfismi dei geni TNF- $\alpha$ , interleuchina-6 e interleuchina-10 che hanno un ruolo importante nella patogenesi della malattia. In particolare è stata testata l'associazione del polimorfismo -308G>A con la celiachia utilizzando i due tipi di controlli sopra menzionati. La frequenza dell'allele A e dei genotipi che contenevano tale allele è risultata aumentata nei pazienti celiaci rispetto al gruppo di controllo rappresentativo della popolazione generale. Questo risultato è coerente col concetto che, rispetto all'allele G, l'allele A comporta una più elevata attività trascrizionale del gene e probabilmente il rilascio di una maggiore quantità di citochina (Kahn et al., 2016). Il risultato è ulteriormente avvalorato dal riscontro di un aumento, sia pure non significativo, dell'allele A nei celiaci con poli-autoimmunità rispetto a quelli senza. Occorre però osservare che quando il confronto è stato effettuato utilizzando i controlli dell'area

ad elevata incidenza di MC, l'impatto dell'allele A sul rischio di celiachia risultava assente. A tale proposito ho potuto notare come la frequenza dell'allele A in questo gruppo di controllo fosse superiore a quello rappresentativo della popolazione sarda (25% vs 10,6%) e superiore anche a quello riportato in una casistica italiana (Rossi et al., 2015). Posso escludere con certezza che tale discrepanza sia dovuta ad errori intervenuti durante la genotipizzazione, in quanto la presenza del genotipo TNF- $\alpha$  -308AA nei campioni di DNA è stato confermato mediante sequenziamento. Si potrebbe pensare ad una fluttuazione casuale delle frequenze alleliche dovuta al piccolo campione da me analizzato oppure si potrebbe postulare una diversa distribuzione allelica della citochina proinfiammatoria nella popolazione scelta come controllo. Una parte del territorio sardo era caratterizzato, fino al 1950, da una forte prevalenza di malaria endemica (Tognotti et al., 2009). Tale malattia infettiva ha probabilmente operato una selezione nei geni infiammatori e in particolare avrebbe indotto l'aumento della frequenza dell'allele A nella posizione -308 nel promotore del gene TNF- $\alpha$ ; per tale motivo è stato suggerito che in queste aree della Sardegna i portatori dell'allele A sarebbero più frequenti in quanto protetti in passato dalla malaria: è logico quindi supporre che assetti genetici che modificano la risposta infiammatoria si siano fissati in tale popolazione e facciano sentire il loro effetto anche una volta eradicata la malaria. Tuttavia un'analisi della distribuzione dei genotipi TNF- $\alpha$  -308G>A nella popolazione sarda sembrerebbe escludere tale congettura (Wirz et al., 2004). In ogni caso il riscontro di questa particolarità genetica riguardante una citochina con ruolo sicuramente importante

nella patogenesi della malattia celiaca ci è sembrato interessante e meritevole di approfondimenti ulteriori.

I risultati da noi ottenuti riguardo al polimorfismo  $\text{TNF-}\alpha$   $-308\text{G}>\text{A}$  sembrano quindi paragonabili a quelli ottenuti da Kekik et al. in una casistica di celiaci turchi (Kekik et al., 2011) e dal gruppo del prof. Plebani in una casistica italiana (Rossi et al. 2015) ed escludono al momento un ruolo rilevante di tale polimorfismo sulla MC.

### **5.2.1. Polimorfismo IL-6 $-174\text{G}>\text{C}$**

In questo studio l'associazione tra polimorfismo dell'interleuchina 6 con la celiachia non risultava essere statisticamente significativa, sia nel modello dominante che in quello recessivo, anche dopo stratificazione per sesso, aplotipi HLA e presenza/assenza di poli-autoimmunità. Questo risultato conferma quindi sostanzialmente i dati negativi riportati nella metanalisi di Aflatoonian et al. su vari gruppi etnici compresi quelli italiani (Aflatoonian et al., 2019).

### **5.2.2. Polimorfismo IL-10 $-1082\text{A}>\text{G}$**

In questo studio il dato più saliente riguardante questo polimorfismo è il forte aumento della frequenza del genotipo  $-1082\text{AA}$  osservato nei celiaci rispetto ai controlli di popolazione; nel modello recessivo, infatti, l'OR non corretto era pari a 5,27 ( $P=0,001$ ) e addirittura 8,20 ( $P<0,0001$ ) dopo correzione per sesso e aplotipo HLA-DQ2.5. Per spiegare tale risultato si potrebbero invocare le stesse

considerazioni fatte nel caso del polimorfismo TNF- $\alpha$ , vale a dire una diversità genetica della popolazione di controllo. Al contrario non sono state riscontrate differenze significative nel confronto tra sottogruppi di celiaci con o senza poli-autoimmunità. Zupin et al., hanno segnalato un'interazione del polimorfismo -1082 A>G con l'aplotipo HLA-DQ8 nella suscettibilità alla celiachia (Zupin et al., 2014) che in questo studio non è stata confermata. Una possibile interazione con il sesso, anch'essa segnalata nel suddetto articolo non è stata valutata in questo studio a causa dell'assenza del genotipo -1082 AA nei controlli. Anche se Hahn-Zoric et al., hanno riportato una associazione del polimorfismo IL-10 -1082A>G con la celiachia nella popolazione svedese (Hahn-Zoric et al., 2003), recentemente Aflatoonian et al., hanno pubblicato una metanalisi sul ruolo di tale polimorfismo nella celiachia in vari gruppi etnici con risultati negativi (Aflatoonian et al., 2019)

### **5.2.3. Mutazione $\Delta 32$ del recettore 5 delle chemochine (CCR5)**

Il recettore delle chemochine CCR5 svolge un ruolo importante nella risposta immune (Qidwai et al., 2016). Nello studio effettuato la frequenza dell'allele CCR5- $\Delta 32$  riscontrata nei celiaci era piuttosto piccola per cui non si può trarre nessuna conclusione consistente; tuttavia è interessante notare come i due unici pazienti celiaci portatori dell'allele  $\Delta 32$ , ovviamente in eterozigosi, presentassero entrambi comorbilità autoimmune (nella fattispecie, tiroidite di Hashimoto); non si può quindi escludere che il paziente celiaco che abbia anche ereditato un CCR5

disfunzionale possa in qualche modo manifestare uno spettro più ampio di autoimmunità (Slominski et al., 2017).

#### **5.2.4. Screening della mutazione G6PD *Med***

Nella nostra casistica di pazienti celiaci sono stati riscontrati, in totale, 6 casi di G6PD carenza dovuta alla mutazione G6PD *Med*, con una frequenza che non si discostava significativamente da quella riportata nella popolazione sarda (Fiorelli et al., 1990). Inoltre, tutti e 6 i celiaci G6PD carenti erano anche portatori dell'allele DRB1\*04 ( $p=0.025$  per l'associazione) e ben quattro di essi presentavano poli-autoimmunità. Nonostante la scarsa potenza statistica dell'analisi si potrebbe comunque avanzare l'ipotesi che la carenza di G6PD, la quale si comporta in molti casi alla stregua di un fattore pro-infiammatorio (Dore et al., 2021), possa agire sinergicamente con certi aplotipi HLA di suscettibilità per MC causando un aumento del rischio d'insorgenza di altre malattie autoimmuni. Naturalmente tale ipotesi necessita di conferme su una casistica più ampia.

#### **5.2.5. Analisi del microbiota**

L'analisi del microbiota in relazione ai polimorfismi indagati è tuttora in corso per cui i dati presentati sono necessariamente preliminari. Il primo dato ad essere emerso è una variazione del rapporto di alcuni phyla, in particolare Firmicutes e Bacteroidetes in relazione alla presenza o meno di comorbilità autoimmune; ciò è dovuto principalmente all'aumento della percentuale di Firmicutes e alla concomitante diminuzione di Bacteroidetes nel sottogruppo di celiaci che

manifestavano altre condizioni autoimmuni oltre alla malattia di base, confermando in sostanza i dati della letteratura (Pietz et al., 2017; Kahaly et al., 2018; Suzuki et al., 2019; Andeweg et al., 2021; Voisine et al., 2021), anche per l'età pediatrica (Sellitto et al., 2012). Questo risultato deve essere interpretato alla luce dei dati della letteratura che suggeriscono un ruolo di *Bacteroides fragilis* nel facilitare la maturazione dei linfociti T regolatori Foxp3+ coinvolti nel mantenimento della immunotolleranza della mucosa enterica (Round and Mazmanian, 2010). Inoltre il polisaccaride A derivato da *B. fragilis*, favorisce la secrezione di IL-10 consentendo il ripristino di una risposta immunitaria equilibrata (Telesford et al., 2015). Un secondo risultato del presente studio, che necessita tuttavia di ulteriore conferma, è la dipendenza della percentuale di alcuni phyla dalla distribuzione degli alleli HLA, in particolare una maggiore abbondanza di Euryarchaeota e Mogibacteriaceae in pazienti con genotipo HLA-DQ8 rispetto a quelli con un HLA-DQ2. Ad una prima analisi i risultati ottenuti nel presente lavoro riguardo al microbiota intestinale sembrerebbero rafforzare l'idea che l'insorgenza e la gravità della MC sono influenzati in maniera rilevante dalla composizione del microbiota intestinale e delle sue modificazioni patologiche, per cui i rapporti tra fattori genetici convenzionali (HLA), fattori pro-infiammatori emergenti e microbiota intestinale nella celiachia sono certamente meritevoli di approfondimento.

## 6. CONCLUSIONI

In conclusione, i risultati della mia indagine, al momento preliminari e in corso di completamento, appaiono incoraggianti per almeno tre ragioni: (i) è stato possibile documentare un certa associazione dei polimorfismi del network citochinico sia con la suscettibilità alla malattia celiaca in sé, sia con la coesistenza con altre patologie autoimmuni; verosimilmente a causa della limitata potenza statistica dell'analisi a volte la forza di tale associazione non appariva statisticamente significativa ma rappresentava indubbiamente un'indicazione utile per analisi future; (ii) la constatazione che certe combinazioni di alleli HLA/non-HLA sarebbero in grado di predire in modo significativo il rischio di malattia celiaca, e di concomitante poli-autoimmunità, potrebbe dare nuovo vigore alla pratica della tipizzazione sistematica degli alleli di rischio in caso di diagnosi di celiachia, tipizzazione al momento sconsigliata dalle linee guida internazionali a causa del basso valore predittivo positivo (Paul et al., 2017); (iii) l'esistenza di una interazione tra alleli di suscettibilità alla celiachia e la composizione del microbiota intestinale aprirebbe la possibilità di una migliore stima del rischio nei soggetti geneticamente predisposti (ad esempio i familiari di primo grado, non affetti, dei pazienti celiaci) e instaurare tempestivamente misure efficaci di sorveglianza clinica. E' evidente che la letteratura in proposito, cui la presente indagine ha voluto dare un contributo, è tuttora scarsa (Bibbò et al., 2020).

Nonostante l'impegno profuso nel condurre il presente studio è necessario fare un cenno ad alcuni suoi limiti. Negli ultimi due anni il progetto ha purtroppo coinciso

con la diffusione della pandemia COVID-19 la quale ha limitato parzialmente, come è facile comprendere, sia il reclutamento dei pazienti celiaci e dei controlli che le attività di laboratorio. Ciò non ha permesso, durante la fase di reclutamento, di raggiungere la numerosità campionaria inizialmente prevista e di conseguenza assicurare alle successive analisi un grado soddisfacente di potenza statistica. Ciononostante, i risultati finora ottenuti, specie quelli genetico-molecolari, sono affidabili e costituiscono una base eccellente per la pianificazione della futura attività di ricerca in questo campo.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A, Green PH, et al. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut* 2013;62:43–52.
2. Pes GM, Bibbò S, Dore MP. Coeliac disease: beyond genetic susceptibility and gluten. A narrative review. *Ann Med*. 2019;51(1):1-16.
3. Caio G, Volta U, Sapone A, Leffler DA, De Giorgio R, Catassi C, Fasano A. Celiac disease: a comprehensive current review. *BMC Med*. 2019;17(1):142.
4. Dubé C, Rostom A, Sy R, Cranney A, Saloojee N, Garritty C, Sampson M, Zhang L, Yazdi F, Mamaladze V, Pan I, Macneil J, Mack D, Patel D, Moher D. The prevalence of celiac disease in average-risk and at-risk Western European populations: a systematic review. *Gastroenterology*. 2005;128(4 Suppl 1):S57-67.
5. Catassi C, Gatti S, Fasano A. The new epidemiology of celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2014;59 Suppl 1:S7-9.
6. Steinsbø Ø, Henry Dunand CJ, Huang M, Mesin L, Salgado-Ferrer M, Lundin KE, Jahnsen J, Wilson PC, Sollid LM. Restricted VH/VL usage and limited mutations in gluten-specific IgA of coeliac disease lesion plasma cells. *Nat Commun*. 2014;5:4041.
7. Lammers KM, Lu R, Brownley J, Lu B, Gerard C, Thomas K, Rallabhandi P, Shea-Donohue T, Tamiz A, Alkan S, Netzel-Arnett S, Antalis T, Vogel SN, Fasano A. Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3. *Gastroenterology*. 2008;135(1):194-204.e3.
8. Beitnes AC, Ráki M, Brottveit M, Lundin KE, Jahnsen FL, Sollid LM. Rapid accumulation of CD14+CD11c+ dendritic cells in gut mucosa of celiac disease after in vivo gluten challenge. *PLoS One*. 2012;7(3):e33556.
9. Bodd M, Ráki M, Tollefsen S, Fallang LE, Bergseng E, Lundin KE, Sollid LM. HLA-DQ2-restricted gluten-reactive T cells produce IL-21 but not IL-17 or IL-22. *Mucosal Immunol*. 2010;3(6):594-601.
10. Monteleone I, Sarra M, Del Vecchio Blanco G, Paoluzi OA, Franzè E, Fina D, Fabrizi A, MacDonald TT, Pallone F, Monteleone G. Characterization of IL-17A-producing cells in celiac disease mucosa. *J Immunol*. 2010;184(4):2211-8.
11. Fernández S, Molina IJ, Romero P, González R, Peña J, Sánchez F, Reynoso FR, Pérez-Navero JL, Estevez O, Ortega C, Santamaría M. Characterization of gliadin-specific Th17 cells from the mucosa of celiac disease patients. *Am J Gastroenterol*. 2011;106(3):528-38.
12. Malamut G, El Machhour R, Montcuquet N, Martin-Lannerée S, Dusanter-Fourt I, Verkarre V, Mention JJ, Rahmi G, Kiyono H, Butz EA, Brousse N, Cellier C, Cerf-Bensussan N, Meresse B. IL-15 triggers an antiapoptotic pathway in human

intraepithelial lymphocytes that is a potential new target in celiac disease-associated inflammation and lymphomagenesis. *J Clin Invest*. 2010;120(6):2131-43.

13. Monteleone G, Pender SL, Alstead E, Hauer AC, Lionetti P, McKenzie C, MacDonald TT. Role of interferon alpha in promoting T helper cell type 1 responses in the small intestine in coeliac disease. *Gut*. 2001;48(3):425-9.
14. Beckett CG, Dell'Olio D, Shidrawi RG, Rosen-Bronson S, Ciclitira PJ. Gluten-induced nitric oxide and pro-inflammatory cytokine release by cultured coeliac small intestinal biopsies. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1999;11(5):529-35.
15. Setty M, Discepolo V, Abadie V, Kamhawi S, Mayassi T, Kent A, Ciszewski C, Maglio M, Kistner E, Bhagat G, Semrad C, Kupfer SS, Green PH, Guandalini S, Troncone R, Murray JA, Turner JR, Jabri B. Distinct and Synergistic Contributions of Epithelial Stress and Adaptive Immunity to Functions of Intraepithelial Killer Cells and Active Celiac Disease. *Gastroenterology*. 2015;149(3):681-91.e10.
16. Guariso G, Conte S, Presotto F, Basso D, Brotto F, Visonà Dalla Pozza L, Pedini B, Betterle C. Clinical, subclinical and potential autoimmune diseases in an Italian population of children with coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007;26(10):1409-17.
17. Demirezer Bolat A, Akın FE, Tahtacı M, Tayfur Yürekli Ö, Köseoğlu H, Erten Ş, Başaran M, Selvi E, Büyükaşık Ş, Ersoy O. Risk Factors for Polyautoimmunity among Patients with Celiac Disease: A Cross-Sectional Survey. *Digestion*. 2015;92(4):185-91.
18. Canova C, Pitter G, Ludvigsson JF, Romor P, Zanier L, Zanotti R, Simonato L. Celiac Disease and Risk of Autoimmune Disorders: A Population-Based Matched Birth Cohort Study. *J Pediatr*. 2016;174:146-152.e1.
19. Assa A, Frenkel-Nir Y, Tzur D, Katz LH, Shamir R. Large population study shows that adolescents with celiac disease have an increased risk of multiple autoimmune and nonautoimmune comorbidities. *Acta Paediatr*. 2017;106(6):967-972.
20. Fanciulli G, Tomasi PA, Caucci F, Lai E, Sanciu F, Delitala G. Screening for celiac disease in patients with autoimmune thyroid disease: from research studies to daily clinical practice. *Ann Ital Med Int*. 2005;20(1):39-44.
21. Bibbò S, Pes GM, Usai-Satta P, Salis R, Soro S, Quarta Colosso BM, Dore MP. Chronic autoimmune disorders are increased in coeliac disease: A case-control study. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(47):e8562.
22. Sardu C, Cocco E, Mereu A, Massa R, Cuccu A, Marrosu MG, Contu P. Population based study of 12 autoimmune diseases in Sardinia, Italy: prevalence and comorbidity. *PLoS One*. 2012;7(3):e32487.
23. Lundin KE, Wijmenga C. Coeliac disease and autoimmune disease-genetic overlap and screening. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;12(9):507-15.

24. Sollid LM, Markussen G, Ek J, Gjerde H, Vartdal F, Thorsby E. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer. *J Exp Med*. 1989;169(1):345-50.
25. Di Sabatino A, Corazza GR. Coeliac disease. *Lancet*. 2009;373(9673):1480-93.
26. Karell K, Louka AS, Moodie SJ, Ascher H, Clot F, Greco L, Ciclitira PJ, Sollid LM, Partanen J; European Genetics Cluster on Celiac Disease. HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1\*05-DQB1\*02 (DQ2) heterodimer: results from the European Genetics Cluster on Celiac Disease. *Hum Immunol*. 2003;64:469–477.
27. Sollid LM, Lie BA. Celiac disease genetics: current concepts and practical applications. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2005;3:843–851.
28. Dubois PC, Trynka G, Franke L, Hunt KA, Romanos J, Curtotti A, Zhernakova A, Heap GA, Adány R, Aromaa A, Bardella MT, van den Berg LH, Bockett NA, de la Concha EG, Dema B, Fehrmann RS, Fernández-Arquero M, Fiatal S, Grandone E, Green PM, Groen HJ, Gwilliam R, Houwen RH, Hunt SE, Kaukinen K, Kelleher D, Korponay-Szabo I, Kurppa K, MacMathuna P, Mäki M, Mazzilli MC, McCann OT, Mearin ML, Mein CA, Mirza MM, Mistry V, Mora B, Morley KI, Mulder CJ, Murray JA, Núñez C, Oosterom E, Ophoff RA, Polanco I, Peltonen L, Platteel M, Rybak A, Salomaa V, Schweizer JJ, Sperandeo MP, Tack GJ, Turner G, Veldink JH, Verbeek WH, Weersma RK, Wolters VM, Urcelay E, Cukrowska B, Greco L, Neuhausen SL, McManus R, Barisani D, Deloukas P, Barrett JC, Saavalainen P, Wijmenga C, van Heel DA. Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nat Genet*. 2010;42(4):295-302.
29. Kuja-Halkola R, Lebowitz B, Halfvarson J, Wijmenga C, Magnusson PK, Ludvigsson JF. Heritability of non-HLA genetics in coeliac disease: a population-based study in 107 000 twins. *Gut*. 2016;65(11):1793-1798.
30. Rueda B, Martínez A, López-Nevot MA, Mas-Fontao A, Paco L, Ortega E, Fernández-Arquero M, Urcelay E, Gomez de la Concha E, Martín J. A functional variant of IFN $\gamma$  gene is associated with coeliac disease. *Genes Immun* 2004;5, 517–519.
31. Guo CC, Huang WH, Zhang N, Dong F, Jing LP, Liu Y, Ye XG, Xiao D, Ou ML, Zhang BH, Wang M, Liang WK, Yang G, Jing CX. Association between IL2/IL21 and SH2B3 polymorphisms and risk of celiac disease: a meta-analysis. *Genet Mol Res*. 2015;14(4):13221-35.
32. de Albuquerque Maranhão RM, Martins Esteves FA, Crovella S, Segat L, Eleutério Souza PR. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-6 gene polymorphism association with susceptibility to celiac disease in Italian patients. *Genet Mol Res*. 2015;14(4):16343-52.
33. Escudero-Hernández C, Plaza-Izurieta L, Garrote JA, Bilbao JR; CEGEC, Arranz E. Association of the IL-15 and IL-15R $\alpha$  genes with celiac disease. *Cytokine*. 2017;99:73-79.

34. Akbulut UE, Çebi AH, Sağ E, İkbal M, Çakır M. Interleukin-6 and interleukin-17 gene polymorphism association with celiac disease in children. *Turk J Gastroenterol.* 2017;28(6):471-475.
35. Słomiński B, Ławrynowicz U, Myśliwska J, Ryba-Stanisławowska M, Skrzypkowska M, Myśliwiec M, Brandt A. CCR5-delta32 gene polymorphism is related to celiac disease and autoimmune thyroiditis coincidence in patients with type 1 diabetes. *J Diabetes Complications.* 2017;31(3):615-618.
36. Rossi E, Basso D, Zambon CF, Navaglia F, Greco E, Pelloso M, Artuso S, Padoan A, Pescarin M, Aita A, Bozzato D, Moz S, Cananzi M, Guariso G, Plebani M. TNFA Haplotype Genetic Testing Improves HLA in Estimating the Risk of Celiac Disease in Children. *PLoS One.* 2015;10(4):e0123244.
37. Cummins AG, Roberts-Thomson IC. Prevalence of celiac disease in the Asia-Pacific region. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009;24(8):1347-51.
38. de la Concha EG, Fernández-Arquero M, Vigil P, Rubio A, Maluenda C, Polanco I, Fernandez C, Figueredo MA. Celiac disease and TNF promoter polymorphisms. *Hum Immunol.* 2000;61(5):513-7.
39. Rawal N, Twaddell W, Fasano A, Blanchard S, Safta A. Remission of Refractory Celiac Disease With Infliximab in a Pediatric Patient. *ACG Case Rep J.* 2015;2(2):121-3.
40. Garrote JA, Arranz E, Tellería JJ, Castro J, Calvo C, Blanco-Quirós A. TNF alpha and LT alpha gene polymorphisms as additional markers of celiac disease susceptibility in a DQ2-positive population. *Immunogenetics.* 2002;54(8):551-5.
41. Cataldo F, Lio D, Marino V, Scola L, Crivello A, Mulè AM, Corazza GR; Groups of the SIGEP and "Club del Tenue". Cytokine genotyping (TNF and IL-10) in patients with celiac disease and selective IgA deficiency. *Am J Gastroenterol.* 2003;98(4):850-6.
42. Khan S, Mandal RK, Jawed A, Dar SA, Wahid M, Panda AK, Areeshi MY, Ahmed Khan ME, Haque S. TNF-alpha -308 G > A (rs1800629) Polymorphism is Associated with Celiac Disease: A Meta-analysis of 11 Case-Control Studies. *Sci Rep.* 2016;6:32677.
43. Aflatoonian M, Moghimi M, Akbarian-Bafghi MJ, Morovati-Sharifabad M, Jarahzadeh MH, Neamatzadeh H. Association of TNF- $\alpha$  -308G>A polymorphism with susceptibility to celiac disease: A systematic review and meta-analysis. *Arq Gastroenterol.* 2019;56(1):88-94.
44. Bowcock, A. M., Kidd, J. R., Lathrop, G. M., Daneshvar, L., May, L. T., Ray, A., Sehgal, P. B., Kidd, K. K., Cavalli-Sforza, L. L. The human 'interferon-beta-2/hepatocyte stimulating factor/interleukin-6' gene: DNA polymorphism studies and localization to chromosome 7p21. *Genomics* 3: 8-16, 1988.

45. Dema B, Martínez A, Fernández-Arquero M, Maluenda C, Polanco I, Figueredo MA, de la Concha EG, Urcelay E, Núñez C. The IL6-174G/C polymorphism is associated with celiac disease susceptibility in girls. *Hum Immunol.* 2009;70(3):191-4.
46. Barartabar Z, Nikzamir A, Sirati-Sabet M, Aghamohammadi E, Chaleshi V, Rostami Nejad M, Asadzadeh-Aghdai H, Reza Zali M. The relationship between 174 G/C and -572 G/C of IL-6 gene polymorphisms and susceptibility of celiac disease in the Iranian population. *Prz Gastroenterol.* 2018;13(4):293-298.
47. Aflatoonian M, Sivandzadeh G, Morovati-Sharifabad M, Mirjalili SR, Akbarian-Bafghi MJ, Neamatzadeh H. Association of IL-6 -174G>C AND IL-10 -1082A>G polymorphisms with susceptibility to celiac disease: evidence from a meta-analysis and literature review. *Arq Gastroenterol.* 2019;56(3):323-328.
48. Salvati VM, Mazzarella G, Gianfrani C, Levings MK, Stefanile R, De Giulio B, Iaquinto G, Giardullo N, Auricchio S, Roncarolo MG, Troncone R. Recombinant human interleukin 10 suppresses gliadin dependent T cell activation in ex vivo cultured coeliac intestinal mucosa. *Gut.* 2005;54(1):46-53.
49. Garrote JA, Arranz E, Gómez-González E, León AJ, Farré C, Calvo C, Bernardo D, Fernández-Salazar L, Blanco-Quirós A. IL6, IL10 and TGFB1 gene polymorphisms in coeliac disease: differences between DQ2 positive and negative patients. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2005;33(5):245-9.
50. Lio D, Scola L, Forte GI, Accomando S, Giacalone A, Crivello A, Cataldo F. TNFalpha, IFNgamma and IL-10 gene polymorphisms in a sample of Sicilian patients with coeliac disease. *Dig Liver Dis.* 2005;37(10):756-60.
51. Qidwai T. Chemokine genetic polymorphism in human health and disease. *Immunol Lett.* 2016;176:128-38.
52. Sellebjerg F, Madsen HO, Jensen CV, Jensen J, Garred P. CCR5 delta32, matrix metalloproteinase-9 and disease activity in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2000;102(1):98-106.
53. Muntinghe FL, Gross S, Bakker SJ, Landman GW, van der Harst P, Bilo HJ, Navis G, Zuurman MW. CCR5Delta32 genotype is associated with outcome in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 2009;86(2):140-5.
54. Bisset LR, Schmid-Grendelmeier P. Chemokines and their receptors in the pathogenesis of allergic asthma: progress and perspective. *Curr Opin Pulm Med.* 2005;11(1):35-42.
55. Song GG, Kim JH, Lee YH. The chemokine receptor 5 delta32 polymorphism and type 1 diabetes, Behcet's disease, and asthma: a meta-analysis. *Immunol Invest.* 2014;43(2):123-36.

56. Ghorban K, Dadmanesh M, Hassanshahi G, Momeni M, Zare-Bidaki M, Arababadi MK, Kennedy D. Is the CCR5  $\Delta$  32 mutation associated with immune system-related diseases? *Inflammation*. 2013;36(3):633-42.
57. Smyth DJ, Plagnol V, Walker NM, Cooper JD, Downes K, Yang JH, Howson JM, Stevens H, McManus R, Wijmenga C, Heap GA, Dubois PC, Clayton DG, Hunt KA, van Heel DA, Todd JA. Shared and distinct genetic variants in type 1 diabetes and celiac disease. *N Engl J Med*. 2008;359(26):2767-77.
58. Słomiński B, Ławrynowicz U, Myśliwska J, Ryba-Stanisławowska M, Skrzypkowska M, Myśliwiec M, Brandt A. CCR5-delta32 gene polymorphism is related to celiac disease and autoimmune thyroiditis coincidence in patients with type 1 diabetes. *J Diabetes Complications*. 2017;31(3):615-618.
59. Burhol PG, Myren MDJ. Dehydrogenase Activity and Mucosal Measurements in Jejunal Biopsies from Patients with Gastrointestinal Diseases. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1966(1);142-148.
60. Hosnut FO, Canan O, Özçay F, Özbek N. Awareness of glucose-6 phosphate-dehydrogenase deficiency in celiac disease. *Acta Paediatr*. 2010;99(5):786-788.
61. Pes GM, Parodi G, Dore MP. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and risk of cardiovascular disease: A propensity score-matched study. *Atherosclerosis*. 2019;282:148-153.
62. Fois A, Dore MP, Manca A, Scano V, Pirina P, Pes GM. Association between Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency and Asthma. *J Clin Med*. 2021;10(23):5639.
63. Pes GM, Bibbò S, Dore MP. Coeliac disease: beyond genetic susceptibility and gluten. A narrative review. *Ann Med*. 2019;51(1):1-16.
64. Kamada N, Seo SU, Chen GY, Núñez G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(5):321-35.
65. McLean MH, Dieguez D Jr, Miller LM, Young HA. Does the microbiota play a role in the pathogenesis of autoimmune diseases? *Gut*. 2015;64(2):332-41.
66. Cenit MC, Olivares M, Codoñer-Franch P, Sanz Y. Intestinal Microbiota and Celiac Disease: Cause, Consequence or Co-Evolution? *Nutrients*. 2015;7(8):6900-23.
67. Olivares M, Neef A, Castillejo G, Palma GD, Varea V, Capilla A, Palau F, Nova E, Marcos A, Polanco I, Ribes-Koninckx C, Ortigosa L, Izquierdo L, Sanz Y. The HLA-DQ2 genotype selects for early intestinal microbiota composition in infants at high risk of developing coeliac disease. *Gut*. 2015;64(3):406-17.
68. Tognotti E. Program to eradicate malaria in Sardinia, 1946-1950. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(9):1460-6.

69. Ludvigsson, J. F., Bai, J. C., Biagi, F., Card, T. R., Ciacci, C., Ciclitira, P. J., et al. (2014). Diagnosis and management of adult coeliac disease: guidelines from the British Society of Gastroenterology. *Gut* 63, 1210–1228.
70. Svedlund J, Sjödin I, Dotevall G. GSRS--a clinical rating scale for gastrointestinal symptoms in patients with irritable bowel syndrome and peptic ulcer disease. *Dig Dis Sci.* 1988;33(2):129-34.
71. Buscemi S, Rosafio G, Vasto S, Massenti FM, Grosso G, Galvano F, Rini N, Barile AM, Maniaci V, Cosentino L, Verga S. Validation of a food frequency questionnaire for use in Italian adults living in Sicily. *Int J Food Sci Nutr.* 2015;66(4):426-38.
72. Miller S, Dykes D, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
73. Sacchetti L, Tinto N, Calcagno G, Improta P, Salvatore F. Multiplex PCR typing of the three most frequent HLA alleles in celiac disease. *Clin Chim Acta.* 2001;310(2):205-7.
74. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(7):3195-9.
75. Pes GM, Lio D, Carru C, Deiana L, Baggio G, Franceschi C, Ferrucci L, Oliveri F, Scola L, Crivello A, Candore G, Colonna-Romano G, Caruso C. Association between longevity and cytokine gene polymorphisms. A study in Sardinian centenarians. *Aging Clin Exp Res.* 2004;16(3):244-8.
76. Bakshi SS, Zhang L, Ho D, Than S, Pahwa SG. Distribution of CCR5Δ32 in human immunodeficiency virus-infected children and its relationship to disease course. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1998;5(1):38-40.
77. Aziz I, Branchi F, Sanders DS. The rise and fall of gluten! *Proc Nutr Soc.* 2015;74(3):221-6.
78. Guandalini S, Assiri A. Celiac disease: a review. *JAMA Pediatr.* 2014 Mar;168(3):272-8.
79. Collado MC, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Imbalances in faecal and duodenal Bifidobacterium species composition in active and non-active coeliac disease. *BMC Microbiol.* 2008;8:232.
80. Olivares M, Benítez-Páez A, de Palma G, Capilla A, Nova E, Castillejo G, Varea V, Marcos A, Garrote JA, Polanco I, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calvo C, Ortigosa L, Palau F, Sanz Y. Increased prevalence of pathogenic bacteria in the gut microbiota of infants at risk of developing celiac disease: The PROFICEL study. *Gut Microbes.* 2018;9(6):551-558.

81. Lindfors K, Blomqvist T, Juuti-Uusitalo K, Stenman S, Venäläinen J, Mäki M, Kaukinen K. Live probiotic *Bifidobacterium lactis* bacteria inhibit the toxic effects induced by wheat gliadin in epithelial cell culture. *Clin Exp Immunol.* 2008;152(3):552-8.
82. Klemenak M, Dolinšek J, Langerholc T, Di Gioia D, Mičetić-Turk D. Administration of *Bifidobacterium breve* Decreases the Production of TNF- $\alpha$  in Children with Celiac Disease. *Dig Dis Sci.* 2015;60(11):3386-92.
83. Bodis G, Toth V, Schwarting A. Role of Human Leukocyte Antigens (HLA) in Autoimmune Diseases. *Methods Mol Biol.* 2018;1802:11-29.
84. Paul SP, Hoghton M, Sandhu B. Limited role of HLA DQ2/8 genotyping in diagnosing coeliac disease. *Scott Med J.* 2017;62(1):25-27.
85. Wirz SA, Morale MC, Marchetti B, Barr AM, Sotgiu S, Rosati G, Pugliatti M, Sanna MV, Giliberto O, Bartfai T, Conti B. High frequency of TNF alleles -238A and -376A in individuals from northern Sardinia. *Cytokine.* 2004 21;26(4):149-54.
86. Kekik C, Oguz FS, Karahn G, Seyhun YAE. IL-10 and TNF-alpha Gene Polymorphisms in Patients with Celiac Disease. *Turkish J Immunol.* 2011;16:11-6.
87. Zupin L, Polesello V, Catamo E, Crovella S, Segat L. Interleukin-10 gene promoter polymorphisms in celiac patients from north-eastern Italy. *Hum Immunol.* 2014;75(7):656-61.
88. Hahn-Zoric M, Hytönen AM, Hanson LA, Nilsson LA, Padyukov L. Association of -1087 IL10 and -308 TNFA gene polymorphisms with serological markers of coeliac disease. *J Clin Immunol.* 2003;23:291-6.
89. Słomiński B, Ławrynowicz U, Myśliwska J, Ryba-Stanisławowska M, Skrzypkowska M, Myśliwiec M, Brandt A. CCR5-delta32 gene polymorphism is related to celiac disease and autoimmune thyroiditis coincidence in patients with type 1 diabetes. *J Diabetes Complications.* 2017;31(3):615-618.
90. Fiorelli G, Meloni T, Palomba V, Manoussakis C, Villa S, Cappellini MD. Gene frequency of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) polymorphic variants in Sardinia. *Gene Geogr.* 1990;4(3):139-42.
91. Dore MP, Parodi G, Portoghese M, Pes GM. The Controversial Role of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency on Cardiovascular Disease: A Narrative Review. *Oxid Med Cell Longev.* 2021;2021:5529256.

92. Pietz G, De R, Hedberg M, Sjöberg V, Sandström O, Hernell O, Hammarström S, Hammarström ML. Immunopathology of childhood celiac disease-Key role of intestinal epithelial cells. *PLoS One*. 2017;12(9):e0185025.
93. Kahaly GJ, Frommer L, Schuppan D. Celiac disease and endocrine autoimmunity - the genetic link. *Autoimmun Rev*. 2018;17(12):1169-1175.
94. Suzuki TA, Phifer-Rixey M, Mack KL, Sheehan MJ, Lin D, Bi K, Nachman MW. Host genetic determinants of the gut microbiota of wild mice. *Mol Ecol*. 2019;28(13):3197-3207.
95. Andeweg SP, Keşmir C, Dutilh BE. Quantifying the Impact of Human Leukocyte Antigen on the Human Gut Microbiota. *mSphere*. 2021;6(4):e0047621.
96. Voisine J, Abadie V. Interplay Between Gluten, HLA, Innate and Adaptive Immunity Orchestrates the Development of Coeliac Disease. *Front Immunol*. 2021;12:674313.
97. Sellitto M, Bai G, Serena G, Fricke WF, Sturgeon C, Gajer P, White JR, Koenig SS, Sakamoto J, Boothe D, Gicquelais R, Kryszak D, Puppa E, Catassi C, Ravel J, Fasano A. Proof of concept of microbiome-metabolome analysis and delayed gluten exposure on celiac disease autoimmunity in genetically at-risk infants. *PLoS One*. 2012;7(3):e33387.
98. Round JL, Mazmanian SK. Inducible Foxp3<sup>+</sup> regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(27):12204-9.
99. Telesford KM, Yan W, Ochoa-Reparaz J, Pant A, Kircher C, Christy MA, Begum-Haque S, Kasper DL, Kasper LH. A commensal symbiotic factor derived from *Bacteroides fragilis* promotes human CD39(+)Foxp3(+) T cells and Treg function. *Gut Microbes*. 2015;6(4):234-42.
100. Bibbò S, Abbondio M, Sau R, Tanca A, Pira G, Errigo A, Manetti R, Pes GM, Dore MP, Uzzau S. Fecal Microbiota Signatures in Celiac Disease Patients With Poly-Autoimmunity. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:349.

## 8. APPENDICE A

### Metodica di estrazione del DNA genomico

Una quantità pari a 1.5 ml di sangue venoso periferico è stata introdotta in una provetta Falcon<sup>®</sup> sterile e portato a volume di 10 ml con la soluzione 1 (Tabella 11).

**Tabella 11.** Soluzioni 1 e 2 per l'estrazione del DNA dal sangue intero

<b>Soluzione Stock</b>		<b>Soluzione 1 (1L)</b>	<b>Soluzione 2 (100ml)</b>
TRIS pH 7.6	1M	10ml (10 mM)	1ml (10 mM)
KCl	1M	10ml (10 mM)	1ml (10 mM)
MgCl <sub>2</sub>	1M	10ml (10 mM)	1ml (10 mM)
NP		7ml	-
NaCl	3M	-	10ml (0.3 M)
SDS	20%	-	2.5ml (0.5%)
EDTA pH 8	0.5M	-	400µl (2 mM)

La soluzione è stata risospesa al fine di renderla omogenea e centrifugata per 10 min a 2000 rpm per favorire la lisi cellulare. È stato prelevato il surnatante facendo in modo che il pellet restasse adeso sul fondo. Successivamente sono stati aggiunti delicatamente al pellet della Falcon 800µl/ml di soluzione 2, mediante una pipetta Pasteur sterile. In seguito, la soluzione è stata trasferita in microprovette coniche da 2 ml, quindi aggiunta la Proteinasi K, l'enzima proteolitico usato per la digestione delle proteine contaminanti. Le provette sono state quindi incubate overnight a 37°C. Al termine dell'incubazione sono stati aggiunti, per singolo campione, 400 µl di fenolo ultrapuro saturato con Tris pH 8.0 e successivamente centrifugati 2 min a 12000 rpm. La fase acquosa, dov'è presente il DNA, è stata trasferita a un'altra provetta da 2ml sterile nella quale sono stati aggiunti 200µl di fenolo/cloroformio e si procede a una seconda centrifugazione. Una volta trasferito il surnatante nelle

nuove provette sono stati aggiunti 600µl di cloroformio/alcool isoamilico, si agita la provetta manualmente con delicatezza e si ricentrifuga. Successivamente al surnatante sono stati aggiunti 200µl di etanolo; la precipitazione del DNA è stata verificata visivamente. Il DNA è stato risospeso in tampone Tris/EDTA e conservato in frigorifero a 4° C o in freezer a -80°C per conservazione di lunga durata.

## 9. APPENDICE B

### La reazione a catena della polimerasi (PCR)

La reazione a catena della polimerasi, o PCR, è una tecnica che consente l'amplificazione esponenziale di frammenti degli acidi nucleici sfruttando la capacità di sintesi del DNA da parte dell'enzima DNA polimerasi che effettua una duplicazione di tipo semiconservativo. L'enzima è infatti in grado di sintetizzare copie multiple di una sequenza specifica di DNA racchiusa tra due brevi tratti di sequenza nota, su cui sono stati disegnati degli inneschi (primers) specifici.

La mix standard di una reazione di PCR era composta da:

- **Buffer di reazione:** serve per mantenere il pH ideale per il funzionamento della Taq polimerasi.
- **MgCl<sub>2</sub> o MgSO<sub>4</sub>:** lo ione Mg<sup>2+</sup> è un cofattore necessario per il corretto funzionamento della polimerasi, inoltre influenza la specificità dei primers e favorisce l'inserimento dei dNTPs.
- **dNTPs:** sono i mattoni da costruzione per la sintesi del filamento di DNA.
- **Primers senso e antisenso.**
- **Taq DNA polimerasi.**
- **Additivi per PCR:** sono sostanze eterogenee per natura con la comune capacità di destabilizzare i filamenti del DNA rendendo più facile la denaturazione di regioni ricche in GC che tendono a formare strutture secondarie molto stabili o rendendo più specifico l'attacco dei primers.

**Tabella 12.** Mix PCR

<b>Mix PCR</b>	<b>Singolo campione</b>
DNA (20ng/ $\mu$ l)	5 $\mu$ l
Pfu buffer 10X	2.5 $\mu$ l
dNTPs (2 $\mu$ M)	1.25 $\mu$ l
Oligo forward (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l
Oligo reverse (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l
Taq DNA Polymerase (2.5 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O mQ	13 $\mu$ l

### **Allestimento della reazione PCR**

La reazione di PCR, effettuata sul DNA estratto dal campione di sangue intero, è stata allestita come segue:

Esempio di condizioni di amplificazione utilizzate:

1. Prima denaturazione a 95°C per 5 min;
2. Denaturazione a 95°C per 1 min;
3. Annealing da 55° a 62°C per 45 sec;
4. Estensione a 72°C per 1 min;
5. Estensione finale a 72°C per 5 min;
6. 4°C all'infinito

I passaggi n° 2, 3, 4 sono stati ripetuti per 30 cicli.

## 10. APPENDICE C

### Genotipizzazione degli alleli HLA

In tutti i soggetti reclutati nello studio si è proceduto alla analisi genetica dei tre polimorfismi DQA1\*0501, DQB1\*0201, DRB1\*04 per valutarne la diversa frequenza alplotipica. Le tre regioni polimorfiche sono state amplificate mediante PCR usando coppie di primers allele-specifici fiancheggiando le sequenze da analizzare e successivamente sottoposte ad elettroforesi su gel di agarosio al 2,5% e visualizzazione dei frammenti di lunghezza differente: DQA1 149 bp, DQB1 108 bp, DRB1 217 bp. La tipizzazione dell'aplotipo HLA-DQ2/DQ8 è stata eseguita con un metodo standardizzato. Il DNA estratto è stato sciolto in 1 mM Tris-EDTA, pH 8,0, quantificato mediante spettrofotometria UV a 260/280 nm, e diluito con acqua distillata alla concentrazione di 20 ng/μL per PCR.

**Tabella 13.** Primers oligonucleotidici utilizzati per la tipizzazione HLA

Nome	Sequenza	Strand
DQA1F	5'-ATGGTGTAACCTTGTACCAG-3'	Senso
DQA1R	5'-TTGGTAGCAGCGGTAGAGTTG-3'	Antisenso
DQA1*0501F	5'-AGCAGTTCTACGTGGACCTGGGG-3'	Senso
DQA1*0501R	5'-GGTAGAGTTGGAGCGTTTAATCAGA-3'	Antisenso
DQB1*0201F	5'-CGCGTGCGTCTTGTGAGCAGAAG-3'	Senso
DQB1*0201R	5'-GGCGGCAGGCAGCCCCAGCA-3'	Antisenso
DQB1F	5'-CATGTGCTACTTCACCAACGG-3'	Senso
DQB1R	5'-CTGGTAGTTGTGTCTGCACAC-3'	Antisenso
DRB1*04F	5'-GGTTAAACATGAGTGTCAATTTCTTAAAC-3'	Senso
DRB1*04R	5'-GTTGTGTCTGCAGTAGGTGTC-3'	Antisenso
M21	5'-GCAGGACAATGCCGTCTTCTGTCTC-3'	Senso
M22	5'-CCACTAGCTTCAGGCCCTCGCTGAG-3'	Antisenso

L'amplificazione degli alleli HLA-DQ2/DQ8 è stata eseguita utilizzando una metodica PCR allele specifica (ARMS), come precedentemente specificato (Sacchetti et al., 2001), con una sensibilità e specificità rispettivamente del 98% e del 95%. I primers oligonucleotidici impiegati nelle reazioni PCR sono riportati

nella Tabella 13. Sono state allestite due distinte miscele di reazione, la prima per l'amplificazione degli alleli DQA1\*0501 e DQB1\*0201 e la seconda per l'identificazione dell'allele DRB1\*04, con i primers allele-specifici riportati nella tabella 13. In entrambi i casi si è dovuto ricorrere ad una PCR allele-specifica (ARMS). In accordo con quanto suggerito dalla letteratura, la PCR veniva sempre effettuata con due primers specifici, uno complementare alla sequenza normale e l'altro alla sequenza mutata; è stato introdotto un *mismatch* in vicinanza dell'estremità 3' del primer mutato (nella penultima base) in modo da sfavorire l'annealing aspecifico; è stato fatto costante uso di un controllo interno per verificare l'efficienza della PCR, facendo attenzione a co-amplificare accanto alla sequenza bersaglio contenente l'allele in questione anche un altro segmento più lungo. Parte dell'esone 2 dei geni DQA1 e DQB1 è stata amplificata con un primer antisenso nel quale all'estremità 3' è stato introdotto un mismatch G/T con l'allele normale per aumentarne la specificità. La reazione PCR, dà luogo così alla formazione di un segmento di 144 bp, esclusivamente in presenza dell'allele DQA1\*0501, e di 110 bp esclusivamente in presenza dell'allele DQB1\*0201. Come controllo interno è stata co-amplificata una regione di 462 bp del gene dell'alfa-1-antitripsina con la coppia di primer M21/M22 (Tabella 13). Questi due primers non sono complementari alle sequenze alleliche HLA e pertanto il prodotto di PCR rappresenta semplicemente la conferma positiva dell'avvenuta amplificazione. La figura seguente riporta il segmento amplificato con i due primers DQA1\*0501 senso e antisenso:

```

AGCAGTTCTACGTGGACCTGGGGAGGAAGGAGACTGTCTGGTGTGGCCTGTTCTCAGAC
TCGTCAAGATGCACCTGGACCCCTCCTTCCTCTGACAGACCACAAACGGACAAGAGTCTG

AATTTAGATTTGACCCGCAATTTGCACTGACAAACATCGCTGTCCTAAAACATAACTTGA
TTAAATCTAAACTGGGCGTTAAACGTGACTGTTTGTAGCGACAGGATTTTGTATTGAACT

ACAGTCTGATTAAACGCTCCAACCTCTACC
TGTCAGACTAATTTGCGAGGTTGAGATGG

```

La Figura seguente riporta il segmento amplificato con i due primers DQB1\*0201 senso e antisenso:

```
CGCTGCTCTTGTGAGCAGAAGCATCTATAACCGAGAGGAAATCGTGCGCTTCGACAGC  
GCGCACGCAGAACACTCGTCTTCGTAGATATTGGCTCTCCTTTAGCACGCGAAGCTGTCC  
  
GACGTGGGGGAGTTCCGGGCGGTGACGCTGCTGGGGCTGCCTGCCGCC  
CTGCACCCCTCAAGGCCGCCACTGCGACGACCCCGACGGACGGCGG
```

La seconda miscela di reazione, relativa all'allele DRB1\*04, conteneva una coppia di primer fiancheggianti l'esone 2 del gene DRB1 e la coppia di primer M21/M22 del controllo interno.

```
GGTTAACATGAGTGTCATTTCTTAACGGGACGGAGCGGGTGCGGTTCCTGGACAGATA  
CCAATTTGTA
```

## 11. APPENDICE D

La genotipizzazione dei polimorfismi citochinici TNF- $\alpha$  -308 G/A (*rs1800629*), IL-6 -174G>C (*rs1800795*) e IL-10 -1082G>A (*rs*) è stata effettuata con metodiche riportate in letteratura. Più specificamente, la regione polimorfica del TNF- $\alpha$  è stata amplificata con i primer riportati da Wilson et al. (Tabella 14) Nel caso del TNF- $\alpha$  alla PCR è seguita la digestione overnight con enzima *NcoI* che riconosce la sequenza bersaglio 5'-c/catgg-3', quindi i prodotti della digestione sono stati visualizzati mediante corsa elettroforetica della durata di un'ora in un gel di agarosio ultrapuro al 2,5%; le bande visualizzate risultavano essere della lunghezza rispettivamente di 107 bp e 87 bp. Per il gene IL-6, dopo la PCR ottenuta con i primer fiancheggiati il polimorfismo -174G/C del promotore si è proceduto alla digestione con l'enzima *HinIII* che riconosce la sequenza bersaglio 5'-/catg-3' la quale non esiste nell'allele wild type contenente un nucleotide G per cui non viene digerito, mentre la presenza del nucleotide C crea un sito di restrizione consentendo il taglio da parte dell'enzima.

Anche in questo caso i prodotti della digestione sono stati visualizzati su un gel di agarosio ultrapuro al 2,5%, il risultato ha messo in evidenza la presenza di tre frammenti di lunghezza differente: il frammento wild type aveva la lunghezza di 198bp (g/g), l'eterozigote (g/c) due frammenti 198bp+140bp, infine l'omozigote mutato un solo frammento di 140bp (c/c).

Per la genotipizzazione del polimorfismo IL-10 -1082G>A è stata utilizzata una metodica allele-specifica (ARMS) con i primer riportati da Pes et al. e elencati nella Tabella 14. L'amplificazione dei frammenti è stata verificata mediante elettroforesi su gel di agarosio.

**Tabella 14.** Primer PCR per la tipizzazione dei polimorfismi del network citochinico.

TNF- $\alpha$ -308 G/A ( <i>rs1800629</i> )	Strand
SENSO	5'-AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3'
ANTISENSO	5'-TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3'
IL-6 -174G/C ( <i>rs1800795</i> )	
SENSO	5'-TGACTTCAGCTTTACTCTTTGT-3'
ANTISENSO	5'-CTGATTGGAAACCTTATTAAG-3'
IL-10 -1082G>A ( <i>rs1800896</i> )	
SENSO (ALLELE G)	5'-CTACTAAGGCTTCTTTGGGAG-3'
SENSO (ALLELE A)	5'-ACTACTAAGGCTTCTTTGGGAA-3'
ANTISENSO COMUNE	5'-CAGTGCCAACTGAGAATTTGG-3'

## 12. APPENDICE E

La presenza della mutazione CCR5-Δ32 nei campioni di DNA è stata accertata mediante PCR utilizzando i primers seguenti riportati da Bakshi et al. (1998).

Tabella 15. Primer PCR per la tipizzazione della mutazione CCR5-Δ32

CCR5-Δ32 ( <i>rs62625034</i> )	Strand
SENSO	5'-CAAAAAGAAGGTCTTCATTACACC-3'
ANTISENSO	5'- CCTGTGCCTCTTCTTCTCATTTCG-3'

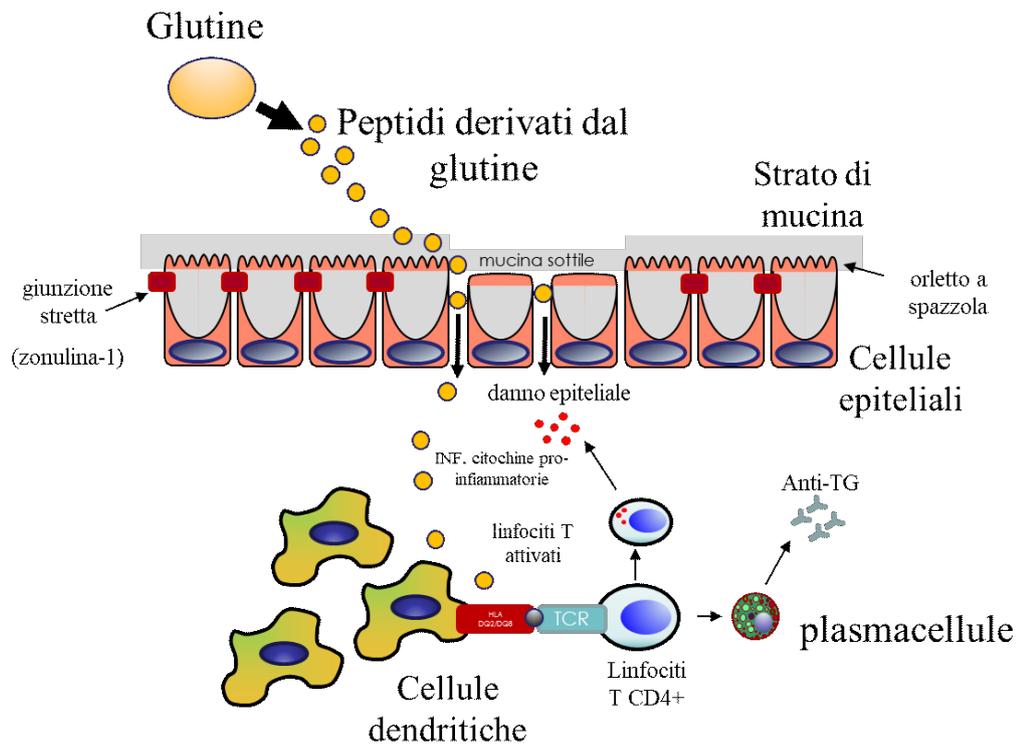
## 13. APPENDICE F

La genotipizzazione della variante G6PD 563C→T è stata effettuata mediante metodica PCR/RFLP. Dato che l'allele G6PD 563T introduce un sito di restrizione *Mbo*II è stato amplificato l'esone 6 del gene G6PD utilizzando i primer riportati nella tabella seguente seguiti da una digestione overnight con *Mbo*II.

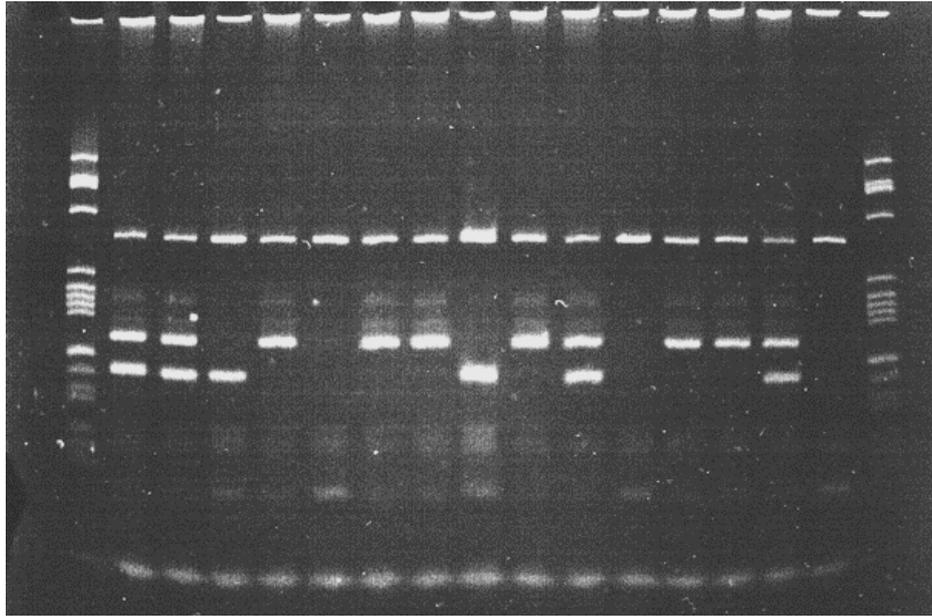
Tabella 16. Primer per l'amplificazione PCR della variante G6PD *Med*

G6PD <i>Med</i>	Strand
SENSO	5'-AGGAGGTTCTGGCCTCTACT-3'
ANTISENSO	5'-TGAGGCTCCTGAGTACCACC-3'

## 14. APPENDICE ICONOGRAFICA



**Figura 1.** Patogenesi della celiachia (da Pes et al., 2020).



**Figura 2.** Tipizzazione degli alleli HLA DQA1 e DQB1. La presenza del DQA1 è rivelata dalla banda di DNA di 149 bp, la presenza di DQB1 da una banda di 108 bp. I campioni negativi per DQA1 e DQB1 presentano solo il controllo interno di 462 bp.