



HLA-DQ e malattie autoimmuni multiple in età pediatrica

Chiara Gertosio, Maria Beatrice Ruozi, Alice Brambilla, Anna Chiara Malvezzi, Daniela Oliani, Valeria Paganelli, Benedetta Pietra, Rossana Toglia, Gloria Cantamessa

Clinica Pediatrica, Università degli Studi di Pavia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italia

HLA-DQ e malattie autoimmuni multiple in età pediatrica

Diabete mellito di tipo 1 (DMT1), malattia celiaca (CD), e tireopatie autoimmuni (ATD) sono patologie relativamente comuni in età pediatrica e spesso presenti in associazione nello stesso soggetto.

La condivisione di un comune background genetico è responsabile dello sviluppo di queste tre condizioni associate con un differente rischio a seconda del numero e del tipo di eterodimeri HLA-DQ specifici per DMT1 o CD. La tipizzazione delle molecole HLA in ciascun paziente migliora quindi la capacità di predire l'associazione di malattie autoimmuni multiple nell'infanzia.

HLA-DQ and multiple autoimmune diseases in children

Type 1 diabetes mellitus (DMT1), celiac disease (CD) and autoimmune thyroid diseases (ATD) are autoimmune conditions relatively common in pediatric age and frequently occur in association in the same subject.

The sharing of the immunogenetic background is responsible for the development of multiple autoimmune diseases although with a different risk according to the number and type of susceptible HLA-DQ heterodimers for DMT1 o CD. HLA-DQ genomic typing will improve the capability to predict associated autoimmune diseases in infancy.

Introduzione

Diabete mellito di tipo 1 (DMT1), malattia celiaca (CD) e tireopatie autoimmuni (ATD) sono malattie relativamente frequenti in età pediatrica e spesso associate tra di loro. Sebbene l'eziologia di queste patologie resti ancora in gran parte misconosciuta, è ampiamente accettato che l'origine dei disturbi sia multifattoriale, legata ad un'interazione fra predisposizione genetica da una parte e fattori ambientali dall'altra.

I geni maggiormente coinvolti nel determinare la suscettibilità nei confronti di queste tre patologie autoimmuni appartengono al sistema HLA e sono situati tra i loci DRB1 e DRQ1 [1-5].

Gli aplotipi HLA-DR3;DQ2 e DR4;DQ8 predispongono allo sviluppo del DMT1 e della CD mentre per le ATD è stata riconosciuta un'associazione con gli aplotipi HLA DR3;DQ2 e DR5;DQ7.

Caratteristica principale dell'intero sistema HLA è l'elevato grado di polimorfismo correlabile all'importante significato biologico che la regione stessa riveste. Le molecole HLA, infatti, determinando la composizione chimica della superficie della tasca di legame con l'antigene, giocano un ruolo fondamentale nel regolare le interazioni cellulari attraverso un meccanismo di riconoscimento di peptidi self e non self da parte dei linfociti T. Un comune substrato genetico è alla base dello sviluppo di malattie autoimmuni multiple, ed in particolare la presenza di determinate combinazioni alleliche predispone all'insorgenza di autoimmunità.

Il 15- 30% dei pazienti con DMT1 sviluppano tireopatie autoimmuni mentre la malattia celiaca si presenta nell'1-19% dei pazienti con diabete mellito tipo 1 e nel 2-5% dei pazienti con tireopatie autoimmuni.

Scopo del lavoro

Lo scopo del nostro studio è stato valutare le combinazioni alleliche HLA-DQA1 e DQB1 in soggetti pediatrici affetti da una o più malattie autoimmuni quali il diabete mellito di tipo 1, la celiachia e le tireopatie autoimmuni e definire l'influenza di ciascun genotipo sul rischio di sviluppare malattie autoimmuni multiple, al fine di elaborare un algoritmo predittivo per lo sviluppo di una singola o più patologie in associazione.

Materiali e metodi

Pazienti

Nello studio sono stati arruolati 334 pazienti con malattie autoimmuni seguiti presso la Sezione di Endocrinologia Pediatrica della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia.

I pazienti erano così ripartiti:

- 164 pazienti (85 femmine e 79 maschi) erano affetti da DMT1 (età media alla diagnosi 8.69 ± 4.47 anni);
- 118 pazienti (104 femmine e 14 maschi) erano affetti da tireopatie autoimmuni (età media alla diagnosi 11.11 ± 4.14 anni);
- 52 pazienti (34 femmine e 18 maschi) erano affetti da malattia celiaca (età media alla diagnosi 7.16 ± 4.50 anni).

I dati di tipizzazione HLA eseguiti, per gli stessi geni, su 224 soggetti adulti sani di età media 36.50 ± 17.50 anni (105 femmine e 119 maschi) sono stati utilizzati come controllo. I pazienti sono stati seguiti per un periodo medio di follow-up di 19 ± 8 anni, nel corso del quale è stata valutata l'insorgenza di altre malattie autoimmuni associate e la loro sequenzialità di comparsa.

Tutti i pazienti e/o i genitori hanno dato il proprio consenso alla partecipazione allo studio, dopo adeguata informazione.

Metodi

In tutti i soggetti selezionati è stata eseguita, presso il Laboratorio di Immunogenetica del Servizio Trasfusionale della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, la tipizzazione molecolare HLA-DQA1 e DQB1 ad alta risoluzione con valutazione degli eterodimeri di suscettibilità per diabete mellito di tipo 1 e celiachia. Il DNA è stato isolato da campioni di sangue usando kit specifici per la purificazione del DNA e gli alleli HLA-DQ sono stati definiti mediante reverse PCR-SSO.

Studi di amplificazione genica hanno dimostrato che conferiscono una maggiore suscettibilità al DMT1 la presenza di Arg in posizione 52 della catena α del DQ e l'assenza di Asp in posizione 57 della catena β del DQ [6].

Gli eterodimeri HLA-DQ, considerati a rischio per malattia celiaca, sono codificati dagli alleli HLA-DQA1*05 e DQA1*03 e dagli alleli HLA-DQB1 03:02 [7]. Tali alleli, in combinazioni differenti, pur essendo caratteristici di una determinata malattia, possono comunque predisporre ad un'altra o a più malattie autoimmuni associate. Infatti, la presenza di eterodimeri di suscettibilità per DMT1 non solo aumenta la probabilità di avere il DMT1 ma anche la CD e ATD e la stessa cosa accade per gli eterodimeri di suscettibilità per CD; infine gli stessi eterodimeri aumentano il rischio di malattie autoimmuni multiple.

In tutti i pazienti il numero degli eterodimeri di suscettibilità per DMT1 e per CD sono stati determinati attraverso la conta diretta e collegati allo stato della malattia; il loro numero varia da 0 a 1, 2 o 4 [8].

Risultati

Per ciascun soggetto facente parte delle quattro popolazioni in esame abbiamo definito il numero degli eterodimeri di suscettibilità per CD e DMT1, ed abbiamo così potuto elaborare i seguenti risultati: la maggior parte dei pazienti con DMT1 e CD possiede 1-4 eterodimeri di suscettibilità per DMT1 e/o CD mentre 0-1 eterodimeri si riscontrano nella maggioranza dei pazienti con ATD e nei controlli. Un solo marker di suscettibilità per CD predispone ad una delle tre patologie autoimmuni nel 47.4% dei casi (111/234) (Tabella 1), al contrario sono richiesti due eterodimeri di suscettibilità per DMT1 per ottenere lo stesso risultato 48.7% (114/234) (Tabella 2).

La molecola DQ ha quindi un valore predittivo di malattia superiore per la celiachia rispetto al diabete. Nel corso del follow-up, 51 pazienti hanno sviluppato malattie autoimmuni multiple:

- dei 164 pazienti con DMT1, 20 hanno sviluppato DMT1+ATD (12.19%), 7 DMT1+CD (4.26%) e 4 DMT1+CD+ATD (2.43%), in sequenza 2 DMT1+ATD+CD e 2 DMT1+CD+ATD;
- dei 118 pazienti con ATD, 8 hanno presentato ATD+CD (6.77%);
- dei 52 pazienti con CD, 11 hanno sviluppato CD+ATD (21.11%) e 1 CD+DMT1 (1.9%).

La probabilità di sviluppare malattie autoimmuni associate aumenta con l'aumentare del numero di eterodimeri di suscettibilità HLA-DQ per DMT1 ($p=0.003$) e per CD ($p=0.006$). Nello specifico il rischio di comorbidità incrementa significativamente in soggetti con 2-4 markers HLA-DQ specifici. Oltre un valore soglia $N=2$, non vi è però effetto dose in quanto il rischio di comorbidità autoimmune aumenta da 0 a 2 e non da 2 a 4 eterodimeri.

Il rischio di sviluppare patologie autoimmuni singole o in associazione in base alla presenza di specifici eterodimeri HLA-DQ è rappresentato nella tabella 3.

Intersecando il numero degli eterodimeri HLA-DQ specifici per DMT1 e CD, è possibile definire le differenti condizioni di malattie autoimmuni multiple con un ordine decrescente del valore dell'OR (odds ratio). Si può notare come la presenza di un solo marker di suscettibilità per entrambe le patologie (1×1) aumenta il rischio di sviluppare CD e ATD (OR= 4.0).

Un marker di suscettibilità per CD e due per DMT1 (1×2) predispongono all'associazione delle tre malattie autoimmuni con un OR inferiore a quanto previsto dai 4 eterodimeri specifici per entrambe le patologie, mentre nel riquadro (2×2) si denota un aumentato rischio di malattia celiaca. Quattro markers di suscettibilità per ambedue le malattie (4×4) aumentano la probabilità di associazione tra DMT1 e CD di 36 volte.

Discussione

Tra i numerosi geni coinvolti nel determinismo delle malattie autoimmuni molta attenzione è stata prestata alle molecole codificate dai geni del sistema maggiore di istocompatibilità che nell'uomo si definisce con l'acronimo HLA (Human Leukocyte Antigen o Human Leukocyte system A) ed è localizzato sul braccio corto del cromosoma 6 (banda 6p21.1-6p21.3) [9-11].

I singoli soggetti di una popolazione sono forniti di una ampia varietà di alleli HLA che consente di aumentare la probabilità di riconoscere antigeni estranei e di reagire contro di essi ma alcuni di questi possono favorire anche una risposta contro auto-antigeni, secondo un meccanismo di somiglianza molecolare [12].

Nei pazienti diabetici, la subregione HLA di classe II contribuisce per circa il 50% al rischio genetico di sviluppare la malattia [13]. Il 90-95% dei soggetti di etnia caucasica con il diabete possiede gli antigeni HLA-DR3 o DR4, o entrambi, rispetto ad una frequenza nei soggetti normali di circa il 40%, inoltre il 40-50% dei soggetti con la malattia è eterozigote DR3/DR4, a fronte del 5% della popolazione normale. La suscettibilità al DMT1 è associata all'antigene HLA-DQ8 spesso in linkage disequilibrium con il DR4.

Nei soggetti caucasici affetti da tiroidite autoimmune ricorrono più frequentemente gli antigeni HLA-DR3 (forma atrofica), DR4 e DR5 (forma con gozzo). La presenza del DQ7 è stata riscontrata nel 56% dei pazienti. Nei soggetti celiaci, nella mucosa intestinale la gliadina va incontro a modificazioni ad opera dall'enzima transglutaminasi tessutale, che porta alla generazione di peptidi deaminati con altissima affinità di legame per le molecole HLA-DQ2 e DQ8. Queste specifiche strutture HLA sono un fattore necessario nella risposta infiammatoria contro il glutine e di fatto la malattia celiaca risulta associata con questi marcatori HLA in più del 90% dei casi.

È tuttavia da tener presente che, nonostante l'elevato rischio relativo di malattia nei soggetti con particolari alleli di classe II, la maggior parte degli individui portatori di questo assetto genetico non sviluppa la malattia, è quindi necessario prendere in considerazione anche la componente ambientale (stress, alimentazione) e l'interazione con altri geni non HLA [14-18].

Nella pratica clinica la probabilità di avere malattie autoimmuni multiple è inferiore rispetto alle aspettative infatti nella nostra esperienza, soltanto 51/334 bambini hanno sviluppato disordini multipli mentre la maggior parte dei pazienti è rimasta stabile con la malattia primaria.

Per cercare di capire l'evoluzione di una singola patologia autoimmune ad inizio nell'infanzia in malattie multiple, abbiamo considerato la relazione dose-effetto degli eterodimeri di suscettibilità HLA-DQ $\alpha\beta$ in 334 pazienti seguiti per un lungo periodo di tempo (media 19 ± 8 anni) ed abbiamo principalmente focalizzato il nostro interesse su 51 bambini che hanno sviluppato patologie autoimmuni multiple. Come gruppo di controllo sono stati reclutati 224 soggetti sani etnicamente correlati ai pazienti.

I nostri dati dimostrano che la presenza di alleli specifici HLA-DQA1 e DQB1 aumentano il rischio di avere DMT1, CD e ATD. Pur non essendo ancora stati trovati al momento eterodimeri di suscettibilità specifici per le tireopatie autoimmuni, la frequente co-presenza di tali patologie in casi di DMT1 e CD può far supporre un'immunogenesi comune.

La tabella 3, i cui parametri possono essere facilmente applicati alla pratica clinica, è stata elaborata mettendo in relazione la presenza della sequenza aminoacidica HLA-DQ $\alpha\beta$ specifica per DMT1 con gli eterodimeri di suscettibilità specifici per CD al fine di prevedere l'associazione delle malattie autoimmuni. Nessun soggetto può essere preservato dal rischio di sviluppare patologie autoimmuni multiple, pertanto per un corretta gestione del paziente è consigliabile valutare tutte le diverse combinazioni alleliche e non solo quelle relative alla malattia in esame.

Il rischio di associazione di queste tre malattie autoimmuni è maggiore in chi ha una diagnosi iniziale di DMT1 o CD, quindi in questi pazienti è utile determinare gli eterodimeri di suscettibilità per la seconda malattia autoimmune mentre nei pazienti con ATD come malattia di esordio la valutazione degli eterodimeri di suscettibilità per DMT1 e CD è indicata solo in presenza di positività autoanticorpale per le stesse patologie. L'individuazione di un particolare profilo immunogenetico HLA (predisponente per le diverse patologie autoimmuni) è fondamentale per:

- individuare i soggetti a rischio che meritano un follow-up stretto;
- informare la famiglia su tutti i sintomi che possono portare ad una diagnosi precoce;
- in futuro, nel momento in cui esisteranno possibilità terapeutiche per prevenire lo sviluppo della malattia autoimmune, intervenire sui soggetti a rischio.

Il meccanismo genetico che sottende allo sviluppo delle malattie autoimmuni resta estremamente complicato e solo con la prosecuzione degli studi sarà possibile valutare la possibile condivisione di basi immunogenetiche tra le varie malattie autoimmuni.

Tabelle e figure

Tabella 1. Distribuzione dei pazienti e dei controlli in base al numero degli eterodimeri di suscettibilità HLA-DQ $\alpha\beta$ per CD.

	Numero di eterodimeri di suscettibilità per CD			
	0 (% pazienti)	1 (% pazienti)	2 (% pazienti)	4 (% pazienti)
DMT1	27 (16.46%)	50 (30.49%)	25 (15.24%)	62 (37.80%)
ATD	54 (45.76%)	41 (34.75%)	16 (13.56%)	7 (5.93%)
CD	1 (1.92%)	20 (38.46%)	20 (38.46%)	11 (21.15%)
Controlli	171 (76.34%)	33 (14.76%)	13 (5.8%)	7 (3.13%)

Tabella 2. Distribuzione dei pazienti e dei controlli in base al numero degli eterodimeri di suscettibilità HLA-DQ $\alpha\beta$ per DMT1.

	Numero di eterodimeri di suscettibilità per DMT1			
	0 (% pazienti)	1 (% pazienti)	2 (% pazienti)	4 (% pazienti)
DMT1	15 (9.15%)	23 (14.02%)	64 (39.02%)	62 (37.80%)
ATD	37 (31.36%)	49 (41.53%)	25 (21.19%)	7 (5.93%)
CD	1 (1.92%)	15 (28.85%)	25 (48.08%)	11 (21.15%)
Controlli	143 (63.84%)	53 (23.66%)	21 (9.38%)	7 (3.13%)

Tabella 3. OR relativo allo sviluppo di malattie autoimmuni singole o in associazione, in base alla presenza di molecole HLA-DQ specifiche.

		Eterodimeri DMT1		
		1	2	4
Eterodimeri CD	1	CD+ATD (4.0)	DMT1+ATD+CD (5.39)	
		CD (3.0)	DMT1+ ATD (4.49)	
		ATD (2.27)	DMT1 (3.0)	
		DMT1+ATD+CD (1.9)	CD+ATD (1.49)	
		DMT1 (0.6)	DMT1+CD (1.34)	
		DMT1+ ATD (0.4)	CD (1.38)	
		DMT1+CD	ATD (1.03)	
	2		CD (3.1)	
			DMT1+CD (2.4)	
			CD+ATD (2.1)	
			CD+DMT1+ATD (1.6)	
			DMT1+ATD (1.47)	
			DMT1 (1.18)	
			ATD (1.01)	
	4			DMT1+CD (36.4)
				DMT1 (23.8)
				CD+ATD (13.48)
				DMT1+ATD+CD (12.1)
				DMT1+ATD (11)
				CD (10.8)
				ATD (2.9)

Bibliografia

1. Sattar N, Lazare F, Kacer M et al. Celiac disease in children, adolescents, and young adults with autoimmune thyroid disease. *J Pediatr* 2011;158:272-275.
2. Kakleas K, Karayianni C, Critselis E et al. The prevalence and risk factors for coeliac disease among children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2010;90:202-208.
3. Karavanaki K, Kakleas K, Paschali E et al. Screening for associated autoimmunity in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus (T1DM). *Horm Res* 2009;71:201-206.
4. Sumnik Z, Cinek O, Bratanic N et al. Thyroid autoimmunity in children with coexisting type 1 diabetes mellitus and celiac disease: a multicenter study. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2006;19:517-522.
5. De Block CE, De Leeuw H, Vertommen JJ et al. Beta-cell, thyroid, gastric, adrenal and celiac autoimmunity and HLA-DQ types in type 1 diabetes. Belgian Diabetes Registry. *Clin Exp Immunol* 2001;126:236-241.
6. Wang H, He R. HLA-DQA and DQB alleles contribute to susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *Chin Med Sci J* 1993;8:231-234.
7. Margaritte-Jeannin P, Babron MC, Bourgey M et al. HLA-DQ relative risks for celiac disease in European populations: a study of the European Genetics Cluster on Celiac Disease. *Tissue Antigens* 2004;63:562-567.
8. Reichstetter S, Kwok WW, Nepom GT. Impaired binding of a DQ2 and DQ8-binding HSV VP16 peptide to a DQA1*0501/DQB1*0302 trans class II heterodimer. *Tissue Antigens* 1999;53:101-105.
9. Bratanic N, Smigoc Schweiger D, Mendez A et al. An influence of HLA-A, B, DR, DQ, and MICA on the occurrence of Celiac disease in patients with type 1 diabetes. *Tissue Antigens* 2010;76:208-215.

10. Simell S, Hoppu S, Simell T et al. Age at development of type 1 diabetes- and celiac disease-associated antibodies and clinical disease in genetically susceptible children observed from birth. *Diabetes Care* 2010;33:774-779.
11. Catino M, Tumini S, Mezzetti A et al. Celiac disease and diabetes mellitus in children: a non casual association. *Diab Nutr Metab* 1998;11:296-302.
12. Fauci A, Braunwald E, Kasper D et al. Harrison, principi di medicina interna. XVII edizione. *Mc Graw Hill*, Milano, Italia, 2009.
13. Atkinson Ma, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* 2001;358:221-229.
14. Jankosky C, Deussing E, Gibson RL et al. Viruses and vitamin D in the etiology of type 1 diabetes mellitus and multiple sclerosis. *Virus Res* 2012;163(2):424-430.
15. Costenbader KH, Gay S, Riquelme ME et al. Genes, epigenetic regulation and environmental factors: Which is the most relevant in developing autoimmune diseases? *Autoimmun Rev* 2012;11(8):604-609.
16. Rewers M, Eisenbarth GS. Autoimmunity: Celiac disease in T1DM-the need to look long term. *Nat Rev Endocrinol* 2011;8(1):5-8.
17. Ergür AT, Oçal G, Berberoğlu M et al. Celiac disease and autoimmune thyroid disease in children with type 1 diabetes mellitus: clinical and HLA-genotyping results. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2010;2:151-154.
18. Picarelli A, Di Tola M, D'Amico T et al. Type 1 diabetes mellitus and celiac disease: endothelial dysfunction. *Acta Diabetol* 2011, in press.