

## **EREDITABILITÀ DELLA CELIACHIA E DEL DIABETE MELLITO DI TIPO 1: STUDI MULTICENTRICI DEL REGISTRO NAZIONALE GEMELLI**

Lorenza Nisticò (a), Rodolfo Cotichini (a), Alfonso Galderisi (b), Virgilia Toccaceli (a), Corrado Fagnani (a), Luigi Greco (c), Dario Iafusco (b), Maria Antonietta Stazi (a)

(a) *Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute (CNESPS), Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Centro Regionale di Diabetologia Pediatrica "G. Stoppoloni", Dipartimento di Pediatria, Seconda Università di Napoli*

(c) *Dipartimento di Pediatria, Università di Napoli "Federico II"*

Dalla sua fondazione nel 2000 ad oggi (2009) il Registro Nazionale Gemelli ha coordinato due studi multicentrici sulla ereditabilità della malattia celiaca e del diabete mellito di tipo 1 in coppie di gemelli in età pediatrica. Le ricadute dell'applicazione del metodo gemellare attengono agli ambiti della ricerca eziologica e della consulenza clinica.

Lo studio sulla malattia celiaca (MC), è stato svolto in collaborazione con il professor Luigi Greco del Dipartimento di Pediatria dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II" e l'Associazione Italiana Celiachia (AIC) e i risultati sono stati pubblicati (1, 2). Lo studio sul diabete mellito di tipo 1 (DMT1), che è in fase di conclusione, è in collaborazione con il dottor Dario Iafusco del Dipartimento di Pediatria della Seconda Università di Napoli e il Gruppo di studio sul diabete della Società Italiana di Endocrinologia e Diabetologia Pediatrica (SIEDP).

In entrambi gli studi abbiamo identificato una coorte di coppie di gemelli con almeno uno ammalato di MC o di DMT1. Gli obiettivi erano stimare la concordanza e l'ereditabilità delle due malattie e, nelle coppie in cui entrambi si sono ammalati, osservare il tempo intercorso tra la diagnosi nel primo e nel secondo gemello (tempo di discordanza tra gemello indice e co-gemello) e la proporzione di co-gemelli che si è ammalato ad un tempo definito dalla diagnosi nel primo gemello.

### **Identificazione delle coorti dei gemelli con MC o DMT1**

Per identificare le coorti di gemelli con una o l'altra patologia abbiamo utilizzato una procedura che riduce la possibilità di un campionamento preferenziale di gemelli monozigoti e concordanti rispetto ai dizigoti e discordanti, che porterebbe alla sovrastima di tutti i parametri oggetto dello studio. Abbiamo incrociato gli elenchi di pazienti affetti da una o l'altra patologia con i database del RNG. Nello studio sulla MC l'incrocio di circa settemila nominativi di iscritti all'AIC delle Regioni del Sud Italia e del Piemonte con il RNG, ha portato all'identificazione di 81 coppie con uno o entrambi i gemelli con la malattia. Settantatre coppie hanno partecipato allo studio fornendo informazioni sull'insorgenza della MC e donando il DNA; i gemelli apparentemente non celiaci, hanno acconsentito a sottoporsi al test per il dosaggio degli autoanticorpi e – se positivi – alla biopsia della mucosa intestinale. Il DNA è stato usato sia per caratterizzare i geni DRB1 e DQB1 della regione HLA che conferiscono suscettibilità alla MC, che per stabilire la zigosità delle coppie dello stesso sesso. Ventitré coppie erano monozigoti (MZ) e 50 coppie dizigoti (DZ).

Nello studio sul DMT1, incrociando oltre tredicimila nominativi di pazienti, seguiti nel corso degli anni dai diabetologi pediatri della SIEDP (vedi appendice), abbiamo identificato 147 coppie e una tripletta con uno o entrambi i gemelli affetti da DMT1. Settantasette coppie e la tripletta hanno partecipato allo studio; delle rimanenti, alcune sono tuttora in fase di arruolamento, altre hanno rifiutato e la maggior parte non sono rintracciabili perché attualmente seguiti dai centri di diabetologia dell'adulto. Le 77 coppie partecipanti hanno risposto ad un questionario con domande sull'insorgenza del diabete, sulla composizione della famiglia e sulla ricorrenza familiare di DMT1 o altre malattie associate. In gran parte hanno anche donato la saliva dalla quale abbiamo estratto il DNA che è stato usato per determinare la zigosità e quindi conservato in banca biologica perché possa essere utilizzato per ulteriori studi sui geni di suscettibilità al DMT1 e malattie associate. Ventinove coppie di gemelli erano MZ, 50 DZ e la tripletta era trizigote.

## Concordanza per MC e per DMT1

Nello studio sulla MC, abbiamo attivamente ricercato i segni di una malattia sub-clinica nei co-gemelli che erano apparentemente non celiaci. A coloro che sono risultati positivi al dosaggio degli autoanticorpi anti-endomisio e anti-transglutaminasi è stata eseguita la biopsia della mucosa intestinale. Al termine di questa verifica a 5 co-gemelli clinicamente silenti è stata diagnosticata la MC. Complessivamente, 17 delle 23 coppie MZ e 5 delle 50 coppie DZ erano concordanti per celiachia (cioè entrambi i gemelli erano affetti da MC); nelle rimanenti 5 MZ e 45 DZ solo un gemello dei due era affetto da MC.

Nello studio sul DMT1, tra le 29 coppie di MZ, 8 erano concordanti e 21 discordanti. Tra le coppie DZ, 3 erano concordanti e 47 discordanti, inclusa la tripletta, in cui solo 1 gemello era affetto da DMT1 e che è stata contata come 2 coppie DZ discordanti.

La concordanza *proband-wise*, che è la probabilità che un gemello di una coppia sia malato dato che l'altro gemello lo è, è significativamente maggiore nei MZ rispetto ai DZ in entrambe le malattie.

L'effetto dei genotipi HLA sul rischio di concordanza è stato studiato nelle coppie con MC: queste sono state stratificate in 5 gruppi di genotipi secondo una gerarchia di rischio che era stata precedentemente osservata nella popolazione italiana (3). Sia nelle coppie MZ che in quelle DZ non era evidente un effetto gerarchico dei genotipi di rischio sulla proporzione di coppie concordanti: secondo il modello di regressione di Cox, essere gemello MZ di un gemello celiaco è l'unico fattore che aumenta significativamente il rischio di sviluppare la celiachia, anche dopo aver aggiustato per HLA e sesso.

## Tempo di discordanza nella MC e nel DMT1

Nella nostra coorte l'età media alla diagnosi nel primo gemello che si ammala di MC è di 8,8 anni (intervallo 0-57 anni). La metà di questi si è ammalato entro i 3 anni di età. In 16 su 17 coppie MZ concordanti la diagnosi nel secondo gemello è stata fatta entro 2 anni dal primo, e in una coppia a distanza di 10 anni. In 4 su 5 coppie DZ concordanti per la MC il tempo intercorso fra le diagnosi nel primo e nel secondo gemello è di 1 anno. In una coppia DZ concordante la diagnosi al secondo gemello è stata posta dopo 37 anni. Cinque co-gemelli MZ e 45 co-gemelli DZ non si sono ammalati dopo un intervallo di 1,4-26,9 anni dalla diagnosi nel gemello indice.

Nella coorte di gemelli con DMT1 l'età media alla diagnosi nel primo gemello è 8 anni (intervallo 1,1-20,5). La metà di questi si è ammalato entro i 7 anni di età. Gli 8 co-gemelli MZ concordanti si sono ammalati da 0 a 5,2 anni dalla diagnosi nel primo gemello, con un tempo mediano di poco più di un anno. Nelle 3 coppie DZ concordanti l'intervallo tra le diagnosi nel primo e nel secondo gemello è compreso tra 3,6 e 7 anni con una mediana di 4,7 anni. Ventuno gemelli MZ e i 47 gemelli DZ non si sono ammalati dopo un intervallo di 0,2-31,8 anni dalla diagnosi nel primo.

In conclusione, in entrambe le malattie sembrerebbe che la gran parte delle diagnosi nel secondo gemello della coppia, sia MZ che DZ, avvenga nei primi anni dalla diagnosi nel primo gemello. Dopo 10 anni dalla diagnosi di MC nel gemello indice, non si è ammalato circa il 20% dei co-gemelli MZ e il 90% dei co-gemelli DZ; dopo lo stesso periodo di osservazione dalla diagnosi di DMT1, oltre il 60% dei co-gemelli MZ ed 90% dei co-gemelli DZ non ha sviluppato la stessa malattia. La differenza tra MZ e DZ all'interno di ciascuna malattia è significativa, difatti i gemelli MZ di individui celiaci hanno un rischio relativo di ammalare di celiachia, nel corso degli anni, da 6 a 8 volte più alto di quello dei gemelli DZ. I gemelli MZ di individui con DMT1 hanno un rischio relativo rispetto a quello dei gemelli DZ che è da 3 a 6 volte superiore.

## Ereditabilità della MC e del DMT1

L'applicazione dei modelli di decomposizione della varianza fenotipica ai dati raccolti nelle due coorti di gemelli ci ha permesso di stimare il contributo del patrimonio genetico ereditato e dell'ambiente alla suscettibilità alla MC e al DMT1. Nella celiachia il contributo dei geni, cioè la quota di ereditabilità, è dell'87% e il contributo delle esperienze ambientali condivise e non condivise è, rispettivamente, del 12% e dell'1%. Il contributo dei geni alla suscettibilità al DMT1 può essere stimato intorno al 63%, le esperienze ambientali non condivise dai gemelli all'interno della coppia si aggirano attorno al 20% e le esperienze condivise contribuiscono per circa il 15%. Per quest'ultima malattia è possibile fare un confronto con 2 studi precedenti – simili per approccio sulle popolazioni danese e finlandese (4, 5) – dal quale emerge una sostanziale coerenza: la quota di ereditabilità è prevalente rispetto al contributo dell'ambiente, sebbene con delle differenze riguardo il modello che spiega meglio i dati (che nella popolazione finlandese non include l'ambiente condiviso), e le stime puntuali.

## Conclusioni

Negli ultimi anni sono stati individuati, oltre l'HLA, 11 loci associati alla celiachia e 21 associati al diabete tipo 1 (6). Solo una quota dell'ereditabilità della MC e del DMT1 è spiegata dall'HLA e dagli altri geni. La parte di ereditabilità non ancora spiegata, la cosiddetta *missing heritability*, potrebbe essere dovuta, almeno in parte, a varianti rare con un effetto moderato, che andrebbero ricercate ricorrendo al sequenziamento massivo; oppure a varianti che conferiscono un rischio ancora più piccolo di quelli finora identificati, il cui ruolo potrebbe essere messo in evidenza da meta-analisi; le interazioni gene-gene potrebbero contribuire a spiegare la quota di ereditabilità mancante; infine altre cause potrebbero essere le *copy number variations*, o le modificazioni epigenetiche. Per queste due ultime classi di variazioni, profili differenti sono stati descritti in coppie di gemelli monozigoti (7, 8): le variazioni del genoma insorte *de novo*, cioè non trasmesse da una generazione all'altra, potrebbero spiegare la quota di ambiente non condiviso responsabile della suscettibilità alle patologie e in questo senso i gemelli monozigoti

discordanti si stanno dimostrando una importante strumento di informazione per capire le tante fonti della variabilità dei fenotipi.

## Bibliografia

1. Greco L *et al.* The first large population based twin study of celiac disease. *Gut* 2002;50:624-8.
2. Nisticò L *et al.* Concordance, disease progression, and heritability of celiac disease in Italian twins. *Gut* 2006;55:803-8.
3. Margaritte-Jeannin P *et al.* HLA-DQ relative risks for coeliac disease in European populations: a study of the European Genetics Cluster on Coeliac Disease. *Tissue Antigens* 2004;63:562-7.
4. Kyvik KO *et al.* Concordance rates of insulin dependent diabetes mellitus: a population based study of young Danish twins. *BMJ* 1995;311:913-7.
5. Hyttinen V *et al.* Genetic liability of type 1 diabetes and the onset age among 22,650 young Finnish twin pairs. *Diabetes* 2003;52:1052-5.
6. Smyth DJ *et al.* Analysis of polymorphisms in 16 genes in type 1 diabetes that have been associated with other immune-mediated diseases. *BMC Medical Genetics* 2006;7:20.
7. Fraga MF *et al.* Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(30):10604-9.
8. Bruder CE *et al.* Phenotypically concordant and discordant monozygotic twins display different DNA copy-number-variation profiles. *Am J Hum Genet* 2008;82(3):763-71.

## Appendice

### Lista delle abbreviazioni

AIC	Associazione Italiana Celiachia
DMT1	diabete mellito di tipo 1
DZ	dizigoti
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
MC	malattia celiaca
MZ	monozioti
RNG	Registro Nazionale Gemelli
SIEDP	Società Italiana di Endocrinologia e Diabetologia Pediatrica

### **Diabetologi pediatri del Gruppo di studio sul diabete della Società Italiana di Endocrinologia e Diabetologia Pediatrica che hanno partecipato allo studio multicentrico**

**Coordinamento: Dr. Dario Iafusco, Seconda Università di Napoli**

Bari, Policlinico di Bari, Dipartimento Biomedicina Età Evolutiva: L. Cavallo, C. Zecchino, M. Del Vecchio  
Benevento, Ospedale Civile "G. Rummo": G. de Filippo

Bologna, Policlinico "Sant'Orsola-Malpighi", Clinica Pediatrica, Serv. Diab. Pediatrica: S. Salardi, S. Zucchini, G. Maltoni

Bolzano, Ospedale Generale Regionale, Divisione di Pediatria: *B. Pasquino, P. Kaufmann*

Brindisi, ASL BR Ospedale “A. Perrino”: *F. Gallo*

Campobasso, Ospedale “A. Cardarelli”, UO di Auxoendocrinologia e Diabetologia Pediatrica: *M. Cicchetti*

Caserta, Azienda Ospedaliera “S. Anna e San Sebastiano”: *E. Castaldo*

Catanzaro, Ospedale “Pugliese”, UO Pediatria: *F. Citriniti*

Chieti, Ospedale Clinicizzato “SS. Annunziata”, Servizio Diabetologia: *F. Chiarelli, S. Tumini, A. Di Stefano*

Cosenza, Ospedale Civile dell’Annunziata, Reparto di Pediatria: *D. Sperli, R. De Marco*

Ferrara, Arcispedale “S. Anna”, UO Pediatria e Adolescentologia: *P. Banin*

Firenze, Azienda universitaria Ospedale “Meyer”, Centro Regionale di Diabetologia Pediatrica: *S. Toni, L. Lenzi*

Genova, Ospedale “G. Gaslini”, Centro Diabetologia Pediatrica: *R. Lorini, G. D’Annunzio*

Messina, Policlinico Universitario, Istituto di Clinica Pediatrica: *F. de Luca, F. Lombardo, G. Salzano*

Milano, Ospedale “San Raffaele”, Reparto di Pediatria: *G. Chiumello, F. Meschi, R. Bonfanti, G. Frontino*

Modena, Azienda Policlinico, Dipartimento Pediatria: *L. Iughetti*

Napoli, Università di Napoli “Federico II”, Dipartimento di Pediatria, Centro Regionale di Diabetologia Pediatrica: *A. Franzese, P. Buono, I. De Simone*

Napoli, Seconda Università di Napoli, Dipartimento di Pediatria, Centro Regionale di Diabetologia Pediatrica “G. Stoppoloni”: *F. Prisco, D. Iafusco, A. Galderisi*

Novara, Ambulatorio e Day Service di Diabetologia Pediatrica: *F. Cadario*

Padova, Università di Padova Dipartimento Pediatria, Pediatria 2: *C. M. Monciotti, V. Savio*

Palermo, Ospedale dei Bambini “G. Di Cristina”, Diabetologia Pediatrica: *F. Cardella*

Parma, Azienda Ospedaliera Universitaria, Clinica Pediatrica, Centro di Riferimento Regionale per la Diabetologia Pediatrica: *M. Vanelli, G. Chiari, K. Errico, B. Iovane*

Pavia, IRCCS Policlinico “San Matteo”, Dipartimento di Scienze Pediatriche, UOS Endocrinologia e Diabetologia Pediatrica: *V. Calcaterra*

Potenza, ASL2 Unità Semplice di Endocrinologia e Diabetologia Pediatrica: *F. Citro*

Reggio nell’Emilia, Ospedale “S. Maria Nuova”, U. O. di Pediatria Ambulatorio di Diabetologia: *S. Cantoni*

Rimini, Azienda USL di Rimini, Modulo di Endocrinologia Pediatrica: *A. Marsciani*

Roma, Sapienza Università di Roma, Policlinico Umberto I, Servizio di Diabetologia Pediatrica: *N. Sulli*

Roma, Ospedale Pediatrico “Bambino Gesù” (sedi di Roma e Palidoro): *M. Cappa, P. Patera, R. Schiaffini*

Torino, Università di Torino, SCU Diabetologia Pediatrica, Day Hospital Diabetologia: *F. Cerutti, I. Rabbone*

Trento, Ospedale “Santa Chiara”, U.O. Pediatria: *V. Cauvin, M. Bellizzi*

Treviglio (BG), Ospedale Civile Consorziato, Reparto Pediatria: *L. Gargantini*

Tricase (LE), Ospedale “Card. G. Panico”: *D. Ingleto*

Trieste, IRCCS “Burlo Garofalo”, Endocrinologia Pediatrica: *G. Tonini, E. Faleschini*

Varese, Università dell’Insubria, Ospedale Filippo del Ponte, U.O. Clinica Pediatrica: *A. Salvatoni*

Verona, Azienda ULS20, Servizio Autonomo di Diabetologia Pediatrica: *L. Pinelli, G. Contreas*