

## Malattia celiaca e riproduzione: possibili modelli *in vivo*

Anna Velia STAZI

Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria,  
Istituto Superiore di Sanità, Roma

**Riassunto.** - Attualmente non esistono modelli *in vivo* per lo studio della malattia celiaca (MC) nelle sue complesse manifestazioni, compreso l'aumento di rischio riproduttivo. La MC è una malattia multifattoriale che richiede la presenza sia di un elemento esogeno (il glutine) che di un complesso di fattori genetici e viene associata ad altre patologie a carattere riproduttivo, endocrino ed immunitario. In particolare non esistono modelli *in vivo* basati su *knock-out* genetici per le complicanze sistemiche della MC, ma esistono modelli sia per la enteropatia da glutine come i setter irlandesi ed i topi Balb/c e BDF1, che per patologie su basi endocrino-immunitarie associate alla MC come i ratti BB ed il topo NOD che potrebbero presupporre l'utilizzo per lo studio degli aspetti riproduttivi. Ciò è auspicabile dal momento che è già stato identificato il primo modello *in vivo* di topo transgenico NOD HLA-DQ8 per lo studio della dermatite erpetiforme, patologia strettamente associata alla MC.

**Parole chiave:** malattia celiaca, modelli animali, riproduzione, impermeabilità intestinale, patologie autoimmuni, patologie endocrine.

**Summary** (*Coeliac disease and reproduction: possible in vivo models*). - Presently there are no *in vivo* models to study the different effects of coeliac disease (CD) including the increase of reproductive risks. CD is a multifactorial condition which requires both an exogenous element (gluten) and complex genetic factors; moreover, CD is associated to several endocrine, immune and reproductive diseases. There are no adequate *in vivo* models for the systemic complications of CD; in particular, there are no genetic knock-out models. However, models are available for gluten enteropathy such as Irish Setter and Balb/c and BDF1 mouse strains, and also for endocrine-immune diseases associated to CD such as BB rats and NOD mice. These models could be used to study reproductive aspects. This is desirable because a new model for *dermatitis herpetiformis* tightly associated with CD, that uses HLA-DQ8 transgenic NOD mice, has already been identified.

**Key words:** coeliac disease, animal models, reproduction, intestinal permeability, auto-immune diseases, endocrine diseases.

### Introduzione

Questo articolo nasce dall'esigenza di sviluppare modelli *in vivo* per lo studio della malattia celiaca (MC) nelle sue complesse manifestazioni con particolare riferimento all'aspetto riproduttivo.

La MC, o intolleranza al glutine, è una malattia cronica dell'intestino tenue caratterizzata da malassorbimento che provoca diarrea e dimagrimento ed è contraddistinta dalla presenza di atrofia dei villi, iperplasia delle cripte ed aumento dei linfociti intestinali. Tuttavia, accanto a questa forma classica intestinale, esistono forme atipiche, con sintomatologia prevalentemente extraintestinali, e la forma silente, caratterizzata da sintomi sfumati o del tutto assenti, in cui, l'unico segno è per esempio l'anemia da carenza di ferro [1] o la presenza di osteoporosi [2]. Gli aspetti generali della MC sono stati illustrati da vari autori [3].

L'insorgere della malattia richiede elementi sia esogeni (il glutine) che endogeni (controllo genetico) e, in particolare, il fattore esogeno risulta tossico solo per i soggetti geneticamente predisposti. Il glutine è una proteina presente in molti cereali, tra cui il grano, alimento importante nella dieta di molte popolazioni tra cui quella italiana, che risulta essere una delle maggiori consumatrici per le caratteristiche della sua alimentazione.

Il glutine comprende una famiglia di proteine vegetali, le prolamine, contenute nel frumento (gliadine), nell'orzo (ordeine) e nella segale (secaline). Rimangono invece dei dubbi circa la tossicità delle prolamine presenti nell'avena (avenine); riso e mais, essendo dei cereali privi di glutine, possono essere utilizzati nella dieta delle persone affette da MC.

Il controllo genetico è reso evidente dal fatto che la MC è associata con specifici alleli del complesso maggiore d'istocompatibilità, noto anche come sistema

HLA (*human leukocyte antigen*) di classe II; i geni del complesso HLA umano si trovano sul cromosoma 6. In particolare, è stata dimostrata l'associazione con i geni del complesso HLA-II che codificano gli eterodimeri DQ2 e DQ8. Nel 90% circa dei celiaci è presente l'aploide DQ2, mentre nella maggior parte dei pazienti DQ2 negativi si riscontra la positività per il DQ8. Gli stessi alleli sono osservati anche nel 25-30% dei familiari sani dei celiaci, questo indica che la presenza degli alleli HLA è un indicatore di predisposizione alla MC ed è essenziale per la patogenesi della malattia, suggerendo come nella predisposizione genetica alla MC, sono coinvolti altri geni non-HLA [5]. Anche se non sono stati individuati con precisione, in letteratura sono riportate diverse regioni di associazioni potenziali sui loci 2q, 3q, 5q, 10q, 11q, 15q e 19q che potrebbero avere un ruolo nella modulazione del fenotipo [5, 6] tuttavia, di queste 7 regioni, solo i loci 2q, 5q e 11q mostrano una maggiore suscettibilità alla MC.

La diagnosi di MC si basa sui dosaggi sierologici di anticorpi anti-gliadina (AGA), anti-endomisio (EMA) ed anti-transglutaminasi tissutali (anti-tTG). Tra questi, la ricerca degli anti-tTG è un test particolarmente sensibile per la diagnosi di MC; infatti le tTG, oltre ad essere maggiormente attive ed espresse in aree definite della mucosa dell'intestino tenue nei pazienti con MC, indicano l'importanza degli effetti sistemici su base autoimmune di tale malattia [7]. Inoltre, la individuazione della transglutaminasi di tipo 2 (tTG2) come principale, se non il solo, bersaglio degli EMA assegna a questo enzima un ruolo regolatore importante nella MC [8]. Tuttavia, nonostante la presenza dei test sierologici, la biopsia intestinale rimane il cardine della diagnosi di MC in quanto evidenzia lo stato della mucosa.

Per quanto riguarda la terapia, la dieta priva di glutine (DPG), è ancora adesso il solo trattamento che deve essere mantenuto per tutta la vita. Questo ci fa comprendere meglio come le persone affette da MC, sono condizionate dalle abitudini alimentari caratteristiche di ogni paese come per esempio il consumo di riso o di mais negli Stati Uniti e Canada [9]; perciò la presenza della MC viene associata a determinanti ambientali, in primo luogo alla alimentazione.

L'interazione tra fattori ambientali e genetici pone rilievo sull'aspetto eziologico multifattoriale della MC nel suo sviluppo, rendendola come modello di malattia autoimmune innescata e mantenuta da un antigene esterno cioè il glutine. L'eziologia multifattoriale fa capire come la MC possa essere associata anche ad altre patologie a carattere endocrino ed immunitario come i linfomi intestinali, le malattie autoimmuni del fegato e del sistema biliare, il diabete mellito e le tiroiditi [10] in cui, anche per queste patologie, giocano un ruolo importante i fattori ambientali. In particolare, lo sviluppo di contemporanee autoimmunità può essere

causato da epitopi divisi tra un antigene, o più antigeni, presenti nei diversi tessuti endocrini ed un agente ambientale; inoltre è interessante sottolineare che tali patologie sembrano poste anche in relazione alla presenza di glutine [11].

Ormai si conosce che la MC oltre ad essere associata a tali patologie, può indurre effetti su altri sistemi ed in primo luogo sugli apparati riproduttivi femminile e maschile [12-14]. Questo è riportabile a due aspetti importanti, sia ad un malassorbimento subclinico di micronutrienti sia ad una base comune di squilibrio immunitario ed endocrino che si associano ad una diretta interferenza, come per le altre patologie autoimmuni, del glutine con tali apparati [15].

Pertanto, la MC può rappresentare un serio problema di sanità pubblica anche a causa della sua elevata frequenza, da essere considerata una delle patologie permanenti più presenti tra quelle con una forte componente genetica; infatti in Europa, si riscontra con una frequenza che varia tra 1:130 a 1:300 nei suoi molteplici aspetti clinici [4].

Con questo lavoro si è voluto focalizzare l'attenzione sulla ricerca dei modelli sperimentali *in vivo* al fine di approfondire gli aspetti riproduttivi della MC [16].

### Malattia celiaca e sistema riproduttivo

Un aspetto importante della MC determina, oltre ad indurre un malassorbimento generale, carenze di specifici micronutrienti come minerali (ferro e zinco) e vitamine (acido folico, B12, K, B6, vitamine liposolubili) che sono importanti per lo sviluppo riproduttivo [12-14].

Gli effetti della MC sulla riproduzione femminile comprendono: ridotta durata della vita riproduttiva (menopausa precoce, menarca ritardato) e della lattazione, amenorrea, infertilità, aborti spontanei [17] e maggiore rischio di osteoporosi [18]. Inoltre, studi epidemiologici dimostrano che bimbi nati da donne celiache presentano maggiore rischio di basso peso alla nascita [19] e maggior rischio di ritardi di crescita fetale intrauterina [20]. Mancano studi adeguati per evidenziare un aumento possibile di malformazioni congenite; tuttavia tale aumento può essere plausibile in quanto la MC, come già sottolineato, induce malassorbimento e quindi carenze di fattori nutrizionali che sono essenziali per la organogenesi quali, ad esempio, ferro e vitamina K. Inoltre, merita attenzione la carenza di acido folico che, essendo essenziale nel metabolismo degli acidi nucleici, si ripercuote sui tessuti in rapida proliferazione, come l'embrione e l'epitelio seminifero [12-14].

Per l'aspetto ormonale, Bona *et al.* [21] hanno ipotizzato che nella MC potrebbe verificarsi un malassorbimento selettivo di micronutrienti essenziali per il

metabolismo di proteine trasportatrici e/o recettoriali degli ormoni sessuali. Infatti, la malnutrizione generale con carenze di proteine è associata, oltre all'amenorrea, ad una scarsa funzionalità dell'ipofisi con conseguente ridotta produzione di gonadotropine ed estrogeni, mentre le carenze di fattori nutrizionali specifici, come il ferro e lo zinco, sono importanti per la funzionalità ovarica e per il ciclo mestruale. Inoltre, le carenze di specifici oligoelementi essenziali a livello ovarico, e perciò estrogenico, potrebbero far comprendere il diretto coinvolgimento di queste sull'aumentato rischio di osteoporosi nelle donne con MC. È stato inoltre ipotizzato che, le alterazioni ormonali siano un effetto diretto della MC piuttosto che una conseguenza secondaria della malnutrizione [17].

Per quanto riguarda gli effetti della MC sul sistema riproduttivo maschile, anche l'uomo è a maggiore rischio di infertilità ed altri disturbi della sfera riproduttiva oltre ad una maggiore incidenza di ipoandrogenismo; problemi legati alle carenze di oligoelementi ed ai disturbi endocrini determinati dalla MC. Per quello che riguarda l'influenza degli aspetti nutrizionali, sono da evidenziare le carenze di vitamine liposolubili, quali A ed E, osservate nella MC [22]. La vitamina A è importante per la funzionalità delle cellule del Sertoli e per le prime fasi della spermatogenesi [23], mentre la vitamina E influenza la corretta differenziazione e funzionalità dell'epitelio dell'epididimo [24], la maturazione degli spermatozoi e la secrezione di proteine da parte della prostata [25]. Inoltre, come già rilevato per la donna, la carenza di acido folico si ripercuote sui tessuti in rapida proliferazione che nell'uomo si traduce in effetti negativi sull'epitelio seminifero [14]. Per ciò che riguarda l'aspetto endocrino, i soggetti maschi affetti mostrano un quadro di resistenza tissutale agli androgeni [26]. Inoltre, meritano attenzione gli aumenti di FSH e prolattina, non associati ad infertilità, ma che possono essere indicatori di uno squilibrio ipotalamico-ipofisario [27], con riflessi generali sulla salute, come ad esempio l'elevato rischio di osteoporosi nei soggetti affetti da MC soprattutto in età avanzata [28].

Sulla base della presenza degli effetti riproduttivi, come importante manifestazione extraintestinale della MC, al fine di caratterizzare la loro patogenesi, qui di seguito, verranno riportati i possibili modelli sperimentali *in vivo*.

### Modelli animali

Anche se un primo lavoro di Troncone e Ferguson [29] ha proposto un modello di enteropatia da glutine nei topi Balb/c e BDF1, focalizzato sulle alterazioni della mucosa intestinale e della sua permeabilità, gli

studi disponibili in letteratura mostrano che, al momento, non esistono modelli *in vivo* che possano sviluppare la MC nelle sue complesse manifestazioni; in particolare, non sono disponibili modelli basati su *knock-out* genici. Tuttavia, esistono dati che potrebbero presupporre l'uso di alcuni modelli spontanei per studi di specifici aspetti della MC, come i setter irlandesi, i topi Balb/c e BDF1 per la enteropatia da glutine ed i ratti BB ed il topo NOD per studi di patologie su basi endocrino-immunitarie associate alla MC; tali modelli potrebbero essere considerati anche per lo studio del rischio riproduttivo.

#### Setter irlandese

Fino ad oggi, non esistono adeguate informazioni sulle eventuali conseguenze riproduttive, endocrine ed immunitarie della enteropatia da sensibilità al glutine (GSE) di alcune famiglie di setter irlandesi [30]. Questo dovrebbe essere indagato perchè sappiamo che la MC induce carenza di micronutrienti come ferro, acido folico e vitamina K essenziali alla organogenesi e di vitamine liposolubili necessarie alla spermatogenesi [12-14], situazioni che potrebbero accadere anche nella GSE canina.

Nel setter irlandese è stato riscontrato lo stesso danno della MC quando una frazione di glutine, a livello della mucosa intestinale, promuove un aumento della permeabilità intestinale precedente lo sviluppo della malattia. L'alterazione di tale permeabilità determina la presentazione dell'antigene al sistema immunitario della mucosa gastrointestinale; gli animali non esposti non hanno l'espressione della malattia [8].

La permeabilità della barriera epiteliale intestinale dipende dalla regolazione dei sistemi di giunzione intercellulari (GIC), in particolare delle zonule occludenti [31]. Le GIC sono strutture dinamiche che, in seguito a stimoli fisiopatologici e/o ambientali, sono soggette a mutamenti che ne dettano lo stato funzionale. Responsabile dei mutamenti della permeabilità è la zonulina, una proteina dell'epitelio intestinale [9]. Sarebbe interessante valutare l'espressione e la funzionalità della zonulina nei setter irlandesi affetti da GSE in presenza ed in assenza di glutine.

Un studio sui setter irlandesi ha considerato gli effetti della dieta priva di cereali dalla nascita e la conseguente risposta alla stimolazione immunitaria al glutine [32]. Gli animali manifestavano le caratteristiche alterazioni intestinali se allevati con una dieta contenente grano. La introduzione della DPG induceva la diminuzione della permeabilità intestinale e la risoluzione delle alterazioni morfologiche e biochimiche, reintroducendo il glutine ritornava la sintomatologia. Al contrario, cuccioli delle stesse nidiati allevati con la DPG, stimolati con glutine,

mostravano modesti cambiamenti, a parte un lieve stato infiammatorio. Questi dati indicano l'importanza di un precoce inizio della DPG come fattore protettivo.

A tale proposito, è interessante ricordare che la durata della esposizione al glutine negli adolescenti con MC, ma non negli adulti, è correlata al maggiore rischio di contrarre patologie autoimmuni, suggerendo come, sotto certi aspetti, tale proteina possa paragonarsi ad una sostanza tossica con effetti cronici di cui non è nota la dose senza effetto e che la gravità delle manifestazioni associate alla MC, non è direttamente correlata alla sintomatologia intestinale [14].

#### *Ratto BB*

Il diabete mellito di tipo 1 è un classico esempio di una malattia autoimmune cellula T-mediata e sono descritte diverse aberrazioni nella regolazione sia nel diabete umano che in modelli animali come i topi NOD (non-obese diabetic) e i ratti BB (Biobreeding) [33]. Questi ceppi di roditori mostrano una predisposizione al diabete e considerata l'associazione fra questa malattia e la MC, tali animali potrebbero essere usati per lo studio delle patologie associate alla MC. Questo risulta più interessante se consideriamo che il diabete mellito, come le tiroiditi, è posto in relazione con un aumentato rischio teratogeno [34, 35]. I ratti BB sviluppano spontaneamente il diabete autoimmune, ma mancano dati riguardanti la possibilità che questi animali possano sviluppare anche l'intolleranza al glutine. Ratti BB alimentati con una dieta contenente caseina idrolizzata riducono l'incidenza di diabete rispetto ai ratti alimentati con una dieta contenente cereali [36]; ciò suggerisce che un antigene presente in tale regime alimentare è coinvolto nella patogenesi. Gli stessi autori [37] hanno confermato l'importanza del tipo di dieta nel promuovere la modulazione del diabete e delle citochine intestinali.

Come menzionato precedentemente, le GIC sono associate alle alterazioni della permeabilità intestinale, queste potrebbero anche avere un ruolo nella fisiopatologia del diabete di tipo 1. Meddings *et al.* [38] confrontando ratti BB alimentati con dieta regolare con quelli che ricevevano una dieta contenente caseina idrolizzata, dimostrarono che in tale ceppo vi è una maggiore permeabilità sia dell'intestino tenue che gastrica precedente allo sviluppo del diabete. Sebbene la dieta senza glutine riduca in modo significativo l'incidenza del diabete, essa non ha effetti sull'alterata permeabilità intestinale, suggerendo che questa è un evento precoce.

La permeabilità intestinale e la secrezione intraluminale di zonulina sono state valutate in due ceppi (diabete-suscettibile e diabete-resistente) di ratto BB/Wor. Sino a 40 giorni di età, non è stata osservata nessuna differenza in entrambi i ceppi. Nell'età

successiva, però i ratti diabete-suscettibili hanno mostrato aumento della zonulina intraluminale, a differenza dei ratti diabete-resistenti che non mostravano cambiamenti con l'età. Nei ratti diabete-suscettibili, le alterazioni della permeabilità intestinale sono confinate all'intestino tenue, parallelamente alla distribuzione regionale del recettore per la zonulina, cioè del sito in cui il sistema zonulina è operativo. Inoltre, esiste una diretta correlazione tra la secrezione intraluminale della zonulina e la presenza di forme conclamate di diabete nel ratto BB/Wor [39].

Si può perciò ipotizzare che il ratto BB diabetico potrebbe anche essere utilizzato per indagare l'anormale permeabilità intestinale in relazione a talune alterazioni immunitarie ed endocrine associate alla MC che si riscontrano anche nelle alterazioni riproduttive nell'uomo.

In particolare, gli effetti riproduttivi della patologia diabetica nell'uomo possono essere sia indiretti attraverso interazioni con l'equilibrio endocrino che diretti sulla funzionalità delle cellule germinali. Anche nei ratti BB si osserva una ridotta fertilità maschile legata sia ad un danno diretto del tessuto testicolare che ad uno squilibrio ormonale [40]. Le alterazioni sono associate ad un disturbo primario delle cellule di Leydig e sono indicative di una accelerazione dei fenomeni di invecchiamento e di una atrofia generalizzata.

I ratti BB, perciò, possono essere un modello per lo studio dei problemi sia di impotenza che di infertilità nell'uomo diabetico. È di grande interesse considerare che anche nei soggetti maschi affetti da MC siano presenti analoghe disfunzioni riproduttive ed ormonali. Nella MC, in particolare, si osservano specifici disturbi endocrini per la diminuzione della attività dell'enzima 5- $\alpha$ -riduttasi e conseguente ridotta sintesi di di-idrotestosterone; inoltre si hanno disturbi dell'asse ipotalamo-ipofisario con iperprolattinemia e riduzione della libido [41].

#### *Topo NOD*

Il topo NOD (*non-obese diabetic*) è un altro ceppo di roditori che sviluppa spontaneamente il diabete mellito [20]. In tale ceppo, analogamente al ratto BB, il diabete è associato ad altre alterazioni endocrine e riproduttive [42]; si osserva inoltre la perdita della tolleranza ad auto-antigeni come GAD, insulina ed una proteina tirosina fosfato simile denominata IA-2 [43].

I topi NOD possono essere anche utili per studiare la patogenesi delle tiroiditi autoimmuni che come il diabete, risultano un fattore di rischio teratogeno [34, 35]. In particolare può essere indotta sperimentalmente una forma di tiroidite simile a quella di Hashimoto, una complicanza della MC [44]. Visto tale associazione, di notevole interesse potrebbe essere lo studio di tali modelli *in vivo* per valutare i disturbi riproduttivi.

Nei topi NOD maschi, Sainio-Pollanen *et al.* [45] hanno osservato, durante la fase di insulite autoimmune, una distribuzione anomala di fenomeni apoptotici nell'epitelio seminifero risultante nella disorganizzazione della spermatogenesi. Nei topi NOD femmine, Rosmalen *et al.* [46] hanno valutato la correlazione fra ormoni sessuali e diabete autoimmune, tali topi sviluppano più frequentemente il diabete rispetto ai maschi, per contro la castrazione aggrava il diabete nei maschi. Le femmine NOD prediabetiche sviluppano iperinsulinemia e conseguentemente insule ipertrofiche con infiltrazioni leucocitarie. La formazione di insule ipertrofiche è ridotta nei NOD maschi rispetto alle femmine e aumenta in seguito alla castrazione. Questi dati indicano che i livelli di androgeni influenzano le infiltrazioni autoimmuni e le insule pancreatiche nei topi NOD, confermando le complesse interazioni tra equilibrio endocrino ed immunitario, osservate anche nelle complicanze della MC.

Per chiarire le relazioni tra disturbi riproduttivi, come la diminuzione degli embrioni vitali e degli impianti e le variazioni strutturali dei tessuti, Tatewaki *et al.* [47] hanno studiato la istopatologia degli organi riproduttivi femminili dei topi NOD. I topi NOD diabetici manifestano: atrofia dell'endometrio e miometrio, atrofia dello stroma ovarico, alta concentrazione di lipidi nelle cellule della granulosa ovarica, ridotto peso uterino, accumulo dei lipidi nell'epitelio ghiandolare e follicoli atretici.

Le alterazioni strutturali dell'utero sono associate con la diminuzione degli impianti e degli embrioni vitali allo stadio post-impianto mentre quelle dell'ovario portano a disordini nella maturazione degli oociti. Oltre ai cambiamenti metabolici si riscontra, perciò, un evidente danno strutturale alla base delle alterazioni riproduttive; inoltre, il tipo di lesioni istopatologiche possono essere in relazione con una ridotta funzionalità e/o produzione estrogenica.

È da ricordare come problemi riproduttivi quali infertilità, amenorrea, pubertà ritardata, menopausa precoce ed abortività sono frequenti nelle donne affette da MC, con meccanismi non ancora chiariti [12, 13]. Tuttavia, informazioni sui meccanismi patogenetici stanno provenendo da studi eseguiti su topi transgenici con differenti loci HLA che possono dare risposte autoimmuni diverse a stimoli esterni [48]. È quindi necessaria una accurata caratterizzazione dei ceppi per utilizzarli come modelli per lo studio di patologie umane e/o per lo studio di interazioni geni-ambiente come accade per la MC.

#### **Modelli animali: fattori ambientali e suscettibilità genetica**

In questo paragrafo si vogliono mettere in evidenza due importanti aspetti: la risposta dei modelli animali ai fattori ambientali e l'influenza di questi sulla suscettibilità genetica nelle manifestazioni patologiche a seguito dell'ingestione di glutine.

L'assorbimento attraverso l'apparato digestivo di fattori esogeni presenti nell'ambiente può influenzare l'esito di alcune patologie come la MC, le tiroiditi ed il diabete. A titolo di esempio, le tiroiditi hanno uno sviluppo spontaneo limitato nei topi NOD-h2(H4), ma subiscono un aumento significativo, anche nella gravità delle lesioni, se i topi assumono acqua contenente iodio [49]; inoltre, topi NOD femmine, alimentate precocemente con una DPG, subiscono una diminuzione nell'insorgenza del diabete rispetto a quelle alimentate con una dieta standard [50].

Un aspetto interessante è il fatto che, anche l'espressione di diversi ormoni steroidei può essere modulata dall'ambiente e che tale diversità espressiva ormonale, a sua volta, può influenzare le manifestazioni di patologie nelle loro varie forme, come avviene nel diabete. Considerando che questi ormoni sono fondamentali per la funzione riproduttiva, si potrebbe ipotizzare che i meccanismi ambientali influenzano l'associazione tra i disturbi della sfera riproduttiva ed il diabete. Proprio uno studio di Durant *et al.* [51] ha messo in evidenza come la progressione del diabete di tipo 1 nei topi NOD viene modulata dallo stress e dai suoi diversi effetti sull'equilibrio di estrogeni, androgeni e corticosteroidi. I mutamenti ormonali quindi agiscono in modo complesso a differenti livelli, dal sistema immunitario ai meccanismi coinvolti nell'omeostasi del glucosio.

Ricordando l'associazione tra la MC ed il diabete e considerando che il diabete, come le tiroiditi, è associato di per sé ad un aumentato rischio teratogeno [34, 35], potrebbe essere interessante indagare il possibile ruolo che l'assunzione di glutine ha su tali interazioni. Ciò potrebbe portare alla comprensione sia della patogenesi delle malattie associate alla MC sia dei relativi fattori di suscettibilità genetica influenzabili, a loro volta, da fattori ambientali.

L'influenza dei fattori ambientali sulla suscettibilità genetica fanno comprendere come la sensibilità al glutine attraverso la dieta, oltre a manifestarsi come MC, si può manifestare anche in sede cutanea come dermatite erpetiforme (DE). La DE, come la MC, è una patologia autoimmune strettamente associata al locus HLA di classe II nel cromosoma 6; infatti il 90% dei pazienti affetti da DE presentano HLA DQ2, mentre i rimanenti pazienti presentano HLA DQ8 [52]. Tale patologia si manifesta con eruzioni papulovesicolari ed è spesso associata a vari gradi di enteropatia. La diagnosi definitiva, per immunofluorescenza diretta, dipende dalla ricerca dei depositi granulari e fibrillari delle IgA presenti nel materiale biotico prelevato dalle lesioni vescicolari; tali lesioni si risolvono quando il paziente si sottopone alla DPG e/o a trattamento farmacologico [53].

Il modo in cui i fattori ambientali influenzano l'espressione fenotipica della DE e MC è reso evidente nei gemelli omozigoti. Tali individui, pur

essendo identici nella suscettibilità genetica, presentano una risposta fenotipica diversa all'ingestione del glutine manifestando la DE e/o la MC [54].

Il rilievo dato alla DE, risulta dal fatto che, per il suo studio, viene descritto il primo modello *in vivo* di topo transgenico NOD HLA-DQ8 [55]. Con questo modello, la presenza contemporanea del *background* del NOD e del transgene HLA-DQ8 contribuisce a determinare rispettivamente sia l'autoimmunità e patogenesi della malattia che la sensibilità al glutine. Gli autori, nel loro studio, hanno messo in evidenza che 15 topi NOD DQ8-positivi dei 90 sensibilizzati al glutine svilupparono eruzioni vescicolari simili a quelle osservate nella DE che si risolvevano con la DPG. L'esame istologico ha rilevato che la giunzione dermale-epidermale presentava depositi granulari di IgA mentre il derma presentava infiltrazioni di neutrofili. Questo modello *in vivo* è utile per determinare sia la specificità dei depositi delle IgA che i meccanismi patogenetici che si verificano nella cute a seguito dell'ingestione di glutine, ponendo una base importante per lo studio dei meccanismi patogenetici delle patologie strettamente associate alla DE come MC. La presenza dei meccanismi patogenetici comuni è anche avvalorata dal fatto che, nei pazienti con DE si ha un aumento della risposta della zonulina. Questa proteina dell'epitelio intestinale, come già accennato, è responsabile dei mutamenti della permeabilità che sono caratteristici della fase precoce della MC; la gravità di tali mutamenti è in relazione ai vari gradi di enteropatia [56].

Come per il diabete, anche nei riguardi della DE e della MC l'espressione di diversi ormoni può essere modulata dall'ambiente e che la diversità espressiva ormonale, a sua volta, può influenzare le varie forme di manifestazioni di tali patologie. Infatti si è visto che, la diversa manifestazione alla sensibilità al glutine nelle due patologie riflette anche un diverso stato di livelli sierici degli ormoni sessuali maschili [57]. Solo in un numero limitato di uomini con DE si riscontrano lievi aumenti dei livelli sierici di testosterone e di gonadotropine rispetto a quelli con MC, nei quali si hanno anche alterazioni quantitative più evidenti. Perciò, considerando che l'equilibrio endocrino è fondamentale per la normale funzione riproduttiva, si potrebbe presupporre che i meccanismi ambientali influenzano l'associazione tra i disturbi della sfera riproduttiva e l'intolleranza al glutine. Pertanto, l'utilizzo del modello di topo transgenico NOD-HLA-DQ8 potrebbe contribuire a chiarire l'influenza della sensibilità al glutine sull'equilibrio degli ormoni sessuali per la presenza di quella componente genetica DQ8 che ne determina la sua sensibilità.

## Conclusioni

Attualmente, non sono disponibili validi modelli animali per lo studio del rischio riproduttivo della MC. Esistono, tuttavia, modelli sia per patologie su basi endocrino-immunitarie associate alla MC che per la enteropatia da glutine. Per le complicanze riproduttive della MC sarebbe interessante un'esplorazione maggiore di tali modelli in quanto potrebbe dare informazioni sulle interazioni fra glutine ed altri fattori metabolici, nutrizionali ed ambientali, i fattori che modulano la permeabilità intestinale e la patogenesi delle manifestazioni extraintestinali.

Per la GSE del setter irlandese, mancano dati per valutare le alterazioni dell'assorbimento di oligoelementi e vitamine; studi in questo senso potrebbero fornire indicazioni sulle eventuali patologie riproduttive associate alla GSE canina e quindi anche sulla possibile comparazione fra tale modello e la MC visto che un suo aspetto importante è la carenza specifica di micronutrienti necessari per lo sviluppo riproduttivo maschile e femminile.

Nella MC aumentano gli anticorpi sirici contro la gliadina, l'endomisio, la reticolina e la transglutaminasi tissutale, un insieme di reazioni immunitarie correlato con le manifestazioni extraintestinali della MC; ciò spiega la difficoltà dello studio della MC intesa come complesso sistemico di patologie. Infatti si è visto che, nei soggetti affetti da disordini autoimmuni (diabete mellito, tiroiditi), l'incidenza della MC è 10-30 volte superiore rispetto alla popolazione generale, rafforzando l'ipotesi di una base patogenetica comune [58].

Un maggiore sviluppo di modelli animali come ad esempio il ratto BB ed il topo NOD, che possono studiare patologie come la MC, il diabete mellito di tipo I e le tiroiditi autoimmuni, è auspicabile anche per le loro concordanze genetico-ambientali su base autoimmune. Ciò porterebbe al miglioramento della conoscenza della prevenzione e del trattamento soprattutto nelle prime fasi di vita, in considerazione anche del fatto che tali patologie sono di per se importanti fattori di rischio teratogeno [34, 35]. È interessante sottolineare che per lo studio della associazione tra le alterazioni della tiroide e la MC deve essere valutato anche il trattamento con lo iodio [59]. Infatti, nelle tiroiditi autoimmuni la presenza ambientale di iodio si deve considerata come fattore di rischio allo stesso modo della presenza di glutine nella dieta che innesca la MC [49]; di notevole interesse risulta anche la modulazione del diabete nel topo BB che viene influenzata dalla presenza del glutine nella dieta [50].

Pertanto, i modelli *in vivo* attualmente disponibili, applicati con opportuni fattori esogeni importanti per l'innescare dei fattori genetici, possono fornire utili

informazioni circa il meccanismo con cui un agente ambientale, come lo iodio ed il glutine, innescano una risposta patogenetica in un ospite suscettibile [49].

L'importanza della prevenzione e del trattamento nelle prime fasi di vita fa evidenziare anche il problema dell'esposizione a lungo termine al glutine in queste importanti fasi, in quanto in pazienti adolescenti e non negli adulti, è stata osservata una correlazione tra durata dell'esposizione al glutine e rischio di patologie autoimmuni, dovuta alla tossicità cronica di tale proteina nei soggetti predisposti [59]. Il ruolo della prevenzione precoce dell'esposizione al glutine è stato osservato anche in diversi modelli animali, la GSE nel setter irlandese [32], nel topo BALB/c [29] e nel ratto [60].

Lo sviluppo di modelli *knock-out* in tempi brevi è difficoltoso a causa della complessità delle alterazioni genetiche della MC e delle carenti informazioni sul ruolo dei singoli geni. Una migliore ricerca sui modelli *knock-out* potrebbe contribuire alla conoscenza di specifici elementi genetici nella patogenesi di disordini su base autoimmune.

Passi in avanti sono auspicabili dal momento che è stato identificato il primo modello *in vivo* di topo transgenico NOD HLA-DQ8 per lo studio della DE [55]. La DE è una importante patologia autoimmune della cute strettamente associata alla MC, per avere sia la stessa sensibilità all'ingestione del glutine attraverso la dieta che per la stretta relazione ai loci HLA-DQ8 e HLA-DQ2. In questo modello, la presenza della componente transgenetica DQ8, determinando la sensibilità al glutine, potrebbe contribuire a chiarire l'influenza del glutine sull'equilibrio degli ormoni sessuali dal momento che le diverse manifestazioni riguardo la sensibilità al glutine nelle due patologie, riflettono anche stati diversi di livelli sierici di tali ormoni [57]; questi studi potrebbero contribuire a chiarire gli effetti sulla riproduzione.

Inoltre, dal momento che nei pazienti con DE si ha un aumento della risposta della zonulina, proteina dell'epitelio intestinale responsabile dei mutamenti della permeabilità caratteristici della fase precoce della MC [56], la presenza di questo modello animale potrebbe aiutare a comprendere sia i meccanismi patogenetici coinvolti nella permeabilità intestinale che, come descritto per la GSE canina, porterebbe conseguentemente ad indagare sulla presenza di specifiche carenze di micronutrienti essenziali alla organogenesi ed alla spermatogenesi [12-14].

Infine, lo sviluppo di modelli sperimentali *in vivo* faciliterebbe anche lo studio dei possibili effetti cronici, della cui importanza si è parlato sopra, con conseguente riduzione dei lunghi tempi di osservazione richiesti dagli studi clinici. Gli effetti cronici possono essere dovuti all'assunzione prolungata di glutine a partire dalle prime fasi della vita in quanto il

mantenimento della DPG, teoricamente "semplice" [61], può essere compromesso dalle tracce di glutine che possono contaminare gli amidi usati come additivi alimentari e come eccipienti nei farmaci. L'assunzione di tali tracce può costituire un ulteriore rischio da non sottovalutare soprattutto per l'infanzia e per gli uomini e donne in età fertile.

#### Ringraziamenti

Il presente lavoro è stato effettuato nell'ambito del Progetto di Ricerca Finalizzata "Danno genotossico e metabolismo dell'acido folico", Istituto Superiore di Sanità, Esercizio finanziario 2003.

Si ringrazia Claudio Ricciardi per gli utili suggerimenti dati per la elaborazione di questo lavoro.

Ricevuto il 24 novembre 2004.

Accettato il 13 luglio 2005.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Bottaro G, Cataldo F, Rotolo N, Spina M, Corazza GR. The clinical pattern of subclinical/silent celiac disease: an analysis on 1026 consecutive cases. *Am J Gastroenterol* 1999;94:691-6.
2. Bianchi ML, Bardella MT. Bone and celiac disease. *Calcif Tissue Int* 2002;71:465-71.
3. Thomas Rossi, MD. Celiac disease. *Adolesc Med* 2004;15:91-103.
4. Fornaroli F, Drago S, Di Pierro MR, Catassi C, Fasano A. Celiac disease: a world in exploration. *Minerva Pediatr* 2003;55:23-31.
5. Greco L, Babron MC, Corazza GR, Percopo S, Sica R, Clot F, Fulchignoni-Lataud MC, Zavattari P, Momigliano-Richiardi P, Casari G, Gasparini P, Tosi R, Mantovani V, De Virgili S, Iacono G, D'Alfonso A, Selinger-Leneman H, Lemainque A, Serre SL, Clerget-Darpoux F. Existence of a genetic risk factor on chromosome 5q in Italian coeliac disease families. *Ann Hum Genet* 2001;65:35-41.
6. Naluai TAT, Nilsson S, Gudjonsdottir AH, Louka AS, Ascher H, Ek J, Hallberg B, Samuelsson L, Krisitasson B, Martinsson T, Nerman O, Sollid LM, Wahlstrom J. Genoma-wide linkage analysis of Scandinavian affected sibpairs supports presence of susceptibility loci for celiac disease on chromosomes 5 and 11. *Eur J Hum Genet* 2001;9:938-44.
7. Esposito C, Paparo F, Caputo I, Porta R, Salvati VM, Mozzarella G, Auricchio S, Troncone R. Expression and enzymatic activity of small intestinal tissue transglutaminase in celiac disease. *Am J Gastroenterol* 2003;98:1813-20.
8. Caputo I, D'Amato A, Troncone R, Auricchio S, Esposito C. Transglutaminase 2 in celiac disease: Minireview article. *Amino Acids* 2004;26:381-6.
9. Thompson T. Wheat starch, gliadin, and the gluten-free diet. *J Am Diet Assoc* 2001;101:1456-9.
10. Troncone R, Greco L, Auricchio S. Gluten-sensitive enteropathy. *Pediatr Clin North Am* 1996;43:355-73.
11. Iughetti L, Bulgarelli S, Forese S, Lorini R, Balli F, Bernasconi S. Endocrine Aspects of Coeliac Disease. *J Pediatr Endocrinol Metabol* 2003;16:805-18.

12. Stazi AV, Mantovani A. La malattia celiaca: fattore di rischio per la donna in età fertile. *Minerva Ginecologica* 2000;52:189-96.
13. Stazi AV, Mantovani A. A risk factor for female fertility and pregnancy: celiac disease. *Gynecol Endocrinol* 2000;14:454-63.
14. Stazi AV, Mantovani A. Malattia celiaca e implicazioni endocrine e nutrizionali nella riproduzione maschile. *Minerva Med* 2004;95:243-54.
15. Cronin CC, Shanahan F. Why is celiac disease so common in Ireland? *Perspect Biol Med* 2001;44:342-52.
16. Stazi AV, Mantovani A. Possibili modelli animali delle complicanze endocrine, immunologiche e riproduttive della malattia celiaca. *Minerva Med* 2002;93:457-70.
17. Sher KS, Jayanthi V, Probert CS, Stewart CR, Mayberry JF. Infertility, obstetric and gynaecological problems in coeliac sprue. *Dig Dis* 1994;12:186-90.
18. Eastell R. Management of osteoporosis due to ovarian failure. *Med Pediatr Oncol* 2003;41:222-7.
19. Ciacci C, Cirillo M, Auriemma G, Di Dato G, Sabbatini F, Mazzacca G. Celiac disease and pregnancy outcome. *Am J Gastroenterol* 1996;91:718-22.
20. Foschi F, Diani F, Zardini E, Zanoni G, Caramaschi P. Celiac disease and spontaneous abortion. *Minerva Ginecol* 2002;54:151-9.
21. Bona G, Marinello D, Oderda G. Mechanisms of abnormal pubertà in coeliac disease. *Horm Res* 2002;57(Suppl 2):63-5.
22. Odetti P, Valentini S, Aragno I, Garibaldi S, Pronzato MA, Rolandi E, Barreca T. Oxidative stress in subjects affected by celiac disease. *Free Radic Res* 1998;29:17-24.
23. Livera G, Rouiller-Fabre V, Pairault C, Levacher C, Habert R. Regulation and perturbation of testicular functions by vitamins A. *Reproduction* 2002;124:173-80.
24. Bensoussan K, Morales CR, Hermo L. Vitamin E deficiency causes incomplete spermatogenesis and affects the structural differentiation of epithelial cells of the epididymis in the rat. *J Androl* 1998;19:266-88.
25. Wilson MJ, Kaye D, Quach HT, Sinka AA, Vatassery GT. Effect of vitamin E deficiency on the growth and secretory function of the rat prostatic complex. *Exp Mol Pathol* 2003;74:267-5.
26. Green JR, Goble HL, Edwards CR, Dawson AM. Reversible insensitivity to androgens in men with untreated gluten enteropathy. *Lancet* 1977;8006:280-2.
27. Farthing MJ, Rees LH, Dawson AM. Male gonadal function in coeliac disease: III. Pituitary regulation. *Clin Endocrinol* 1983;19:661-71.
28. Szulc P, Delmas PD. Osteoporosis in the aged male. *Press Med* 2002;31:1760-6.
29. Troncone R, Ferguson A. Gliadin presented via the gut induces oral tolerance in mice. *Clin Exp Immunol* 1988;72:284-7.
30. Garden OA, Manners HK, Sorensen SH, Rutgers HC, Daniels S, Legrand-Defretin V, Batt RM. Intestinal permeability of Irish setter puppies challenged with a controlled oral dose of gluten. *Res Vet Sci* 1998;65:23-8.
31. Marinaro M, Fasano A, De Magistris MT. Zonula occludens toxin acts as an adjuvant through different mucosal routes and induces protective immune responses. *Infect Immun* 2003;71:1897-902.
32. Hall EJ, Batt RM. Dietary modulation of gluten sensitivity in a naturally occurring enteropathy of Irish setter dogs. *Gut* 1992;33:198-205.
33. Rosmalen JG, van Ewijk W, Leenen PJ. T-cell in autoimmune diabetes: teachers and students. *Trends Immunol* 2002;23:40-6.
34. Reece EA, Homko CJ, Wu YK. Multifactorial basis of the syndrome of diabetic embryopathy. *Teratology* 1996;54:171-82.
35. Stoll C, Dott B, Alembik Y, Koehl C. Congenital anomalies associated with congenital hypothyroidism. *Ann Genet* 1999;42:17-20.
36. Scott FW, Daneman D, Martin JM. Evidence for a critical role of diet in the development of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res* 1988;7:153-7.
37. Scott FW, Rowsell P, Wang GS, Burghardt K, Kolb H, Flohe S. Oral exposure to diabetes-promoting food or immunomodulators in neonates alters gut cytokines and diabetes. *Diabetes* 2002;51:73-8.
38. Meddings JB, Jarand J, Urbanski SJ, Hardin J, Gall DG. Increased gastrointestinal permeability is an early lesion in the spontaneously diabetic BB rat. *Am J Physiol* 1999;276:951-7.
39. Fasano A. Intestinal zonulin: open sesame. *Gut* 2001;49:159-62.
40. Murray FT, Cameron DF, Orth JM, Katovich MJ. Gonadal dysfunction in the spontaneously diabetic BB rat: alterations of testes morphology, serum testosterone and LH. *Horm Metab Res* 1985;17:495-501.
41. Sher KS, Jayanthi V, Probert CS, Stewart CR, Mayberry JF. Infertility, obstetric and gynaecological problems in coeliac sprue. *Dig Dis* 1994;12:186-90.
42. Flohe SB, Wasmuth HE, Kerad JB, Beales PE, Pozzilli P, Elliott RB, Hill JP, Scott FW, Kolb H. A wheat-based, diabetes-promoting diet induced a Th1-type cytokine bias in the gut of NOD mice. *Cytokine* 2003;21:149-54.
43. Kudva YC, Deng YJ, Govindarajan R, Abraham RS, Marietta EV, Notkins AL, David CS. HLA-DQ8 transgenic and NOD mice recognize different epitopes within the cytoplasmic region of the tyrosine phosphatase-like molecule, IA-2. *Hum Immunol* 2001;62:1099-105.
44. Many MC, Maniratunga S, Deneff JF. The non-obese diabetic (NOD) mouse: an animal model for autoimmune thyroiditis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1996;104(Suppl 3):17-20.
45. Sainio-Pollanen S, Henriksen K, Parvinen M, Simell O, Pollanen P. Stage-specific degeneration of germ cells in the seminiferous tubules of non-obese diabetic mice. *Int J Androl* 1997;20:243-53.
46. Rosmalen JG, Pigmans MJ, Kersseboom R, Drexhage HA, Leenen PJ, Homo-Delarche F. Sex steroids influence pancreatic islet hypertrophy and subsequent autoimmune infiltration in nonobese diabetic (NOD) and NODscid mice. *Lab Invest* 2001;81:231-9.
47. Tawewaki R, Otani H, Tanaka O, Kitada J. A morphological study on the reproductive organs as a possible cause of developmental abnormality in diabetic NOD mice. *Histol Histopathol* 1989;4:343-58.

48. Poussin MA, Goluszko E, David CS, Franco JU, Christadoss P. HLA-DQ6 transgenic mice resistance to experimental autoimmune myasthenia gravis is linked to reduced acetylcholine receptor-specific IFN-gamma, IL-2 and IL-10 production. *J Autoimmun* 2001;17:175-80.
49. Rose NR, Rasooly L, Saboori AM, Burek CL. Linking iodine with autoimmune thyroiditis. *Environ Health Perspect* 1999;107(Suppl 5):749-52.
50. Funda DP, Kaas A, Bock T, Tlaskalova-Hogenova H, Buschard K. Gluten-free diet prevents diabetes in NOD mice. *Diabetes Metab Res Rev* 1999;15:323-7.
51. Durant S, Christeff N, Coulaud J, Nunez EA, Dardenne M, Homo-Delarche F. Basal concentrations of various steroids in the nonobese diabetic (NOD) mouse and effect of immobilization stress. *Autoimmunity* 1998;28:249-58.
52. Collin P, Reunala T. Recognition and management of the cutaneous manifestations of celiac disease: a guide for dermatologist. *Am J Clin Dermatol* 2003;4:13-20.
53. Powell GR, Bruckner AL, Weston WL. Dermatitis herpetiformis presenting as chronic urticaria. *Pediatr Dermatol* 2004;21:564-7.
54. Hervonen K, Karell K, Holopainen P, Collin P, Partanen J, Reunala T. Concordance of dermatitis herpetiformis and celiac disease in monozygous twins. *J Invest Dermatol* 2000;115:990-3.
55. Marietta E, Black K, Camilleri M, Krause P, Rogers RS 3<sup>rd</sup>, David C, Pittelkow MR, Murray JA. A new model for dermatitis herpetiformis that uses HLA-DQ8 transgenic NOD mice. *J Clin Invest* 2004;114:1090-7.
56. Smecuol E, Sugai E, Niveloni S, Vazquez H, Pedreira S, Mazure R, Moreno ML, Label M, Maurino E, Fasano A, Meddings J, Bai JC. Permeability, zonulin production, and enteropathy in dermatitis herpetiformis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005;3:335-41.
57. Gawkrödger DJ, Sweeting VM, Edwards CR, Barnetson RS. Male sex hormone status in dermatitis herpetiformis. *Br J Dermatol* 1985;112:57-61.
58. Kumar V, Rajadhyaksha M, Wortsman J. Celiac disease-associated autoimmune endocrinopathies. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001;8:678-85.
59. Sategna Guidetti C, Solerio E, Scaglione N, Aimò G, Mengozzi. Duration of gluten exposure in adult coeliac disease does not correlate with the risk of autoimmune disorders. *Gut* 2001;49:502-5.
60. Kozakova H, Stepankova R, Tuckova L, Sinkora M, Tlaskalova-Hogenova H. Humoral and cellular immune responses in gluten-treated suckling or hand-fed rats 2000;49:665-72.
61. Abdulkarim AS, Murray JA. Celiac disease. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2002;5:27-38.