

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Neuroscienze

Direttore Chiar.mo Prof. Edoardo Stellini

CORSO DI LAUREA IN IGIENE DENTALE

Presidente Prof. Edoardo Stellini

TESI DI LAUREA

**Genotipizzazione del sistema antigenico dei leucociti umani
in pazienti affetti da patologia autoimmune
a carattere cutaneo e mucoso: Pemfigo e Pemfigoide.**

Relatore: Chiar.mo Prof. Luca Sbricoli

Correlatore: Prof. Christian Bacci

Prof.ssa Kalliopi Pilichou

Laureando: Alessandro Carolo

ANNO ACCADEMICO 2022\2023

Indice

1 Riassunto	1
2 Abstract	2
3 Introduzione	3
3.1 Pemfigo	7
3.2 Pemfigoide	15
3.3 HLA	17
3.4 Indagini genetiche	21
4 Scopo della tesi	24
5 Materiali e Metodi	25
6 Aspetti etici	32
7 Risultati	33
8 Discussione	40
9 Conclusioni	43
10 Bibliografia	44

1 Riassunto

Background: Il ruolo dei geni HLA è stato ampiamente constatato nella patogenesi di alcune patologie come la celiachia, ma poco è noto in relazione ad altre patologie autoimmuni di interesse odontoiatrico, come il pemfigo o i pemfigoidi.

Scopo dello studio: Lo scopo del presente studio è quello di valutare i geni HLA di pazienti con malattie bollose autoimmuni, determinando il loro aplotipo più comune e verificando se quest'ultimo risulti essere simile o differente a quello riportato in letteratura.

Materiali e metodi: È stato reclutato un campione di 9 pazienti affetti da malattie bollose autoimmuni. Partendo da un campione di sangue intero è stata eseguita la valutazione dei geni HLA mediante studi di biologia molecolare. Lo studio è stato approvato dal comitato etico con ID Studio 21429, codice CESC 5645/AO/23, codice URC AOP2839.

Risultati: I risultati hanno mostrato che gli alleli DQA1*01:01 e DQB1*05:01:01 sono risultati essere in misura rispettivamente di sei e cinque volte più frequenti rispetto a studi che riguardavano il Nord Italia. L'analisi ha dimostrato un incremento della frequenza anche relativamente a due alleli del gene DRB1 (DRB1*01:01:01 e DRB1*11:04:01) seppur in misura minore rispetto a DQA1 e DQB1.

Conclusione: Il presente studio, nonostante la numerosità campionaria limitata, ha dimostrato come gli alleli HLA- DQA1*01:01 e DQB1*05:01:01 possano essere collegati alla manifestazione di malattie bollose.

2 Abstract

Background: The role of HLA genes has been widely noted in the pathogenesis of some diseases such as celiac disease, but little is known in relation to other autoimmune diseases of dental interest, such as pemphigus or pemphigoids.

Aim of the Study: The aim of the present study is to evaluate the HLA genes of patients with autoimmune bullous diseases by determining their most common haplotype and ascertaining whether the latter turns out to be similar or different to those reported in the literature.

Materials and Methods: A sample of 9 patients with autoimmune bullous diseases was recruited. Starting with a whole blood sample, evaluation of HLA genes by molecular biology studies was performed. The study was approved by the ethics committee under Study ID 21429, CESC code 5645/AO/23, URC code AOP2839.

Results: The results showed that the DQA1*01:01 and DQB1*05:01:01 alleles were found to be six- and five-fold more frequent, respectively, than in studies covering northern Italy. The analysis also demonstrated increased frequency with regard to two alleles of the DRB1 gene (DRB1*01:01:01 and DRB1*11:04:01) albeit to a lesser extent than DQA1 and DQB1.

Conclusion: The present study, despite the limited sample size, demonstrated how HLA- DQA1*01:01 and DQB1*05:01:01 alleles can be linked to the manifestation of bullous diseases.

3 Introduzione

La patologia orale (indicata anche come medicina orale oppure stomatologia) è la disciplina che riguarda gli aspetti clinici, anatomo-patologici e terapeutici delle malattie che interessano la mucosa e le parti molli della cavità orale, nonché i tessuti delle regioni periorali. Nell'ambito delle manifestazioni orali esiste una categoria di patologie rappresentata dalle malattie bollose.

Le malattie immunobollose sono disturbi cutanei e vescicolari causati dagli anticorpi patogeni che vanno a legarsi a specifici bersagli proteici all'interno della pelle. Esistono una serie di disturbi immunobollosi con morfologia caratteristica che si riferisce alle proprietà strutturali della proteina bersaglio.

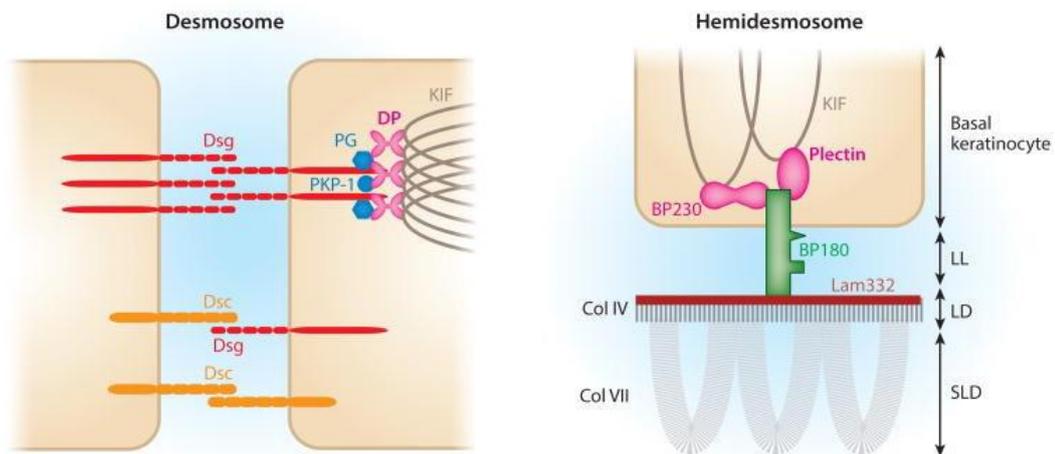


Figura 1. Schematizzazione della struttura di desmosomi e emidesmosomi. Tratto da: Hammers CM, Stanley JR. Mechanisms of Disease: Pemphigus and Bullous Pemphigoid. Annu Rev Pathol. 2016.(1)

Le malattie bollose autoimmuni (MBA) sono patologie dermatologiche a carattere cronico che risultano caratterizzate dalla presenza di autoanticorpi diretti contro antigeni self, in particolare contro specifici antigeni dei desmosomi o degli emidesmosomi, le strutture di adesione

intercheratinocitarie oppure della membrana basale-cellule dello strato basale, e sono caratterizzati dalla formazione di lesioni bollose intra o subepidermiche a livello della cute e/o mucose. Le MBA vengono suddivise sulla base della sede di manifestazione della bolla: MBA subepidermiche e MBA intraepidermiche. Nella quale fanno parte numerosi sottotipi.

Tra le MBA subepidermiche troviamo la famiglia dei Pemfigoidi, che comprendono: il pemfigoide bolloso, il pemfigoide delle membrane mucose, il pemfigoide anti-p200, l'epidermolisi bollosa acquisita, la dermatosi a IgA lineare, la malattia di Duhring e l'herpes gestazionale. Gli autoanticorpi sono diretti contro i vari componenti degli emidesmosomi, cioè le strutture di adesione situate tra la membrana basale e le cellule epidermiche, con conseguente formazione di lesioni bollose a localizzazione subepidermica.

Il secondo gruppo è quello della famiglia del Pemfigo con le sue sottovarianti (volgare, foliaceo, eritematoso e paraneoplastico). Nel pemfigo la risposta che risulta essere autoanticorpale è diretta contro quei meccanismi che hanno il compito di mantenere l'adesione cellulare a livello dell'epidermide, ovvero le Desmogleine (Dsg) 1 e 3 e si ha quindi una perdita di coesione intercheranocitaria che si manifesta clinicamente con la formazione della bolla e istologicamente con acantolisi e di conseguenza di fenditure intraepidermiche. (2,3)

Nei pazienti affetti da MBA la mucosa orale è una delle sedi più frequentemente coinvolte.(4)

L'estensione del coinvolgimento mucoso orale è variabile ma determina inevitabilmente un notevole impatto sulla qualità di vita.(5,6)

Clinicamente, le manifestazioni che si riscontrano più frequentemente sono l'eritema, erosioni, bolle e ulcere che possono essere più o meno estese. Queste caratteristiche sono aspecifiche e non patognomoniche: la clinica da sola infatti non ci permette di fare una corretta diagnosi differenziale.

Oltre all'estensione, anche la localizzazione è notevolmente variabile e ogni area della bocca può essere interessata.

La sintomatologia, seppur variabile in base all'estensione e alla soggettività di ogni individuale, risulta comune a tutte le MBA e spesso è legata a un decadimento qualitativo della vita dei pazienti poiché la sintomatologia associata risulta invalidante, talora anche nelle forme meno estese: dolore, disfagia con conseguenti disturbi della nutrizione.

La mucosa orale rappresenta inoltre una sede in cui le lesioni tendono ad una lenta guarigione, per cui vi sono pazienti in cui, nonostante si sia raggiunto con le attuali terapie un buon controllo del quadro generale, presentano lesioni persistenti.(4)

Per i suddetti motivi, in aggiunta alle frequenti comorbilità dei pazienti che talora limitano le possibilità terapeutiche, si continua a cercare nuovi approcci mirati a controllare la patologia e a migliorare la qualità di vita.

Le malattie della pelle immunobollose insorgono a causa di anticorpi patogeni che legano bersagli nell'epidermide, nella membrana basale epidermica o nel derma. Il legame degli anticorpi all'interno dell'epidermide provoca vesciche

flaccide ed erosioni mentre il legame alla membrana basale epidermica provoca bolle tese.

La trattazione in questione si soffermerà sulle due grandi categorie di famiglie: il Pemfigo e il Pemfigoide descrivendo le loro forme più comuni.

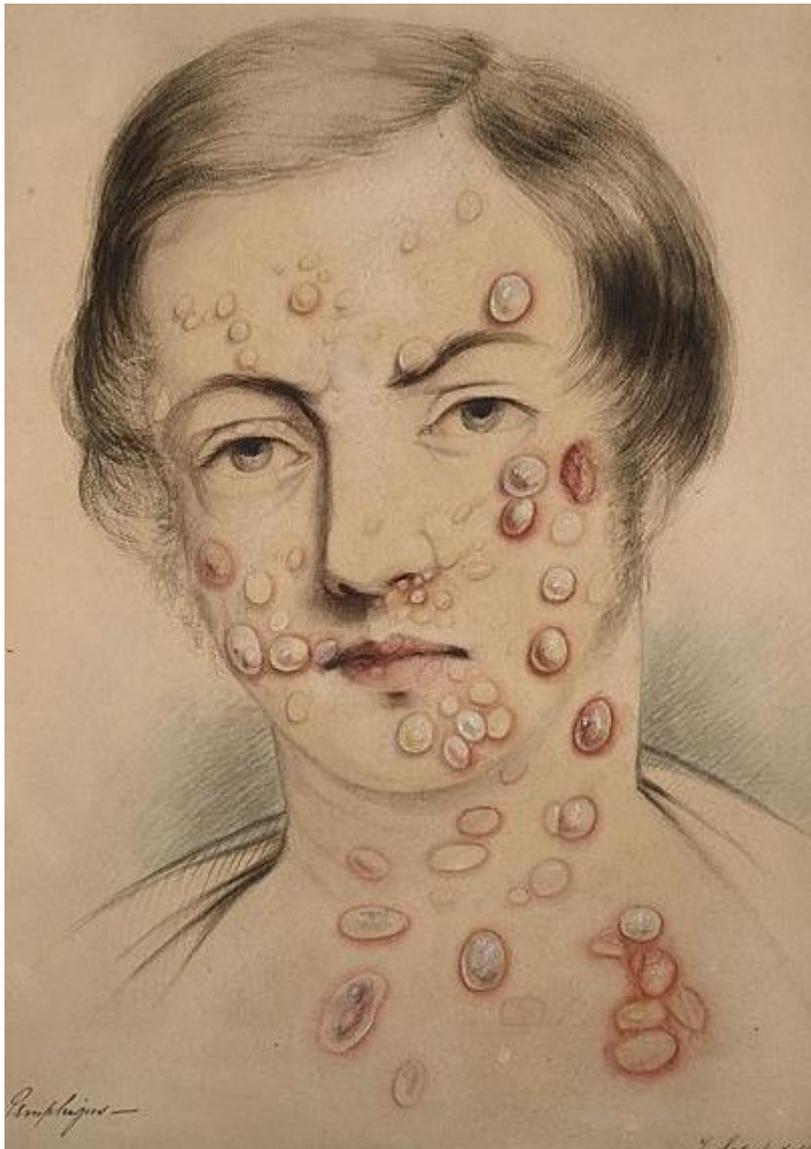


Figura 2 Archivio e museo dell'ospedale di St Bartholomew SBHB MU/14/35/65/1

3.1 Pemfigo

Il pemfigo è un gruppo di malattie causate da anticorpi che legano la desmogleina (Dsg) 1 e 3, che sono proteine caderine presenti all'interno dei desmosomi.(7)

Gli anticorpi patogeni anti-Dsg causano una perdita di adesione dei cheratinociti con conseguente acantolisi (separazione dei cheratinociti) e formazione di una vescica intraepiteliale.(8)

L'incidenza del pemfigo varia tra 0,5 e 34 casi/milione/anno e vi è una variazione geografica significativa nei tassi di incidenza.(9)

Il pemfigo volgare (PV) è la variante più comune nella maggior parte dei paesi ed è caratterizzata da anti-Dsg-3 e/o anticorpi Dsg-1. Dsg-1, è espresso prevalentemente negli strati superiori dell'epidermide mentre Dsg-3 è espresso prevalentemente nei tessuti della mucosa ma anche nell'epidermide inferiore. Il PV può quindi essere prevalentemente mucoso in cui sono presenti anticorpi anti-Dsg-3, o mucocutaneo in cui sono presenti sia gli anticorpi anti-Dsg-1 che 3. L'acantolisi intraepiteliale provoca vescicole flaccide ed erosioni superficiali che sono più comuni sulla testa, sulla parte superiore del tronco, sulle ascelle e sull'inguine. Le lesioni della mucosa sono caratterizzate da erosioni di forma irregolare che si osservano più comunemente sulla mucosa buccale, sul palato e sulla gengiva.(7)

Possono verificarsi anche lesioni laringee, esofagee, congiuntivali e genitali.

Il pemfigo foliaceo (PF) è caratterizzato da anticorpi anti-Dsg-1 e quindi interessa solo la cute e non le mucose. Le erosioni crostose si osservano

prevalentemente nelle aree seborroiche come la parte centrale del torace e della schiena, il viso e il cuoio capelluto. La PF endemica, altrimenti nota come fogo selvagem, è comune in Sud America e determina un quadro clinico simile, sebbene si ritenga che sia acquisita in seguito a punture di insetti a causa della reattività crociata del Dsg-1 e degli antigeni delle ghiandole salivari del flebotomo.(10)

Il pemfigo paraneoplastico (PNP) è una variante rara che provoca una grave malattia mucocutanea ed è più comunemente associata a linfoma non-Hodgkin, malattia di Castleman e leucemia linfocitica cronica.(11)



Figura3. Pemfigo volgare. a\b) Erosioni superficiali sul petto e sul dorso. c) Gengivite erosiva. d) Erosioni superficiali irregolari sul palato molle.(12)

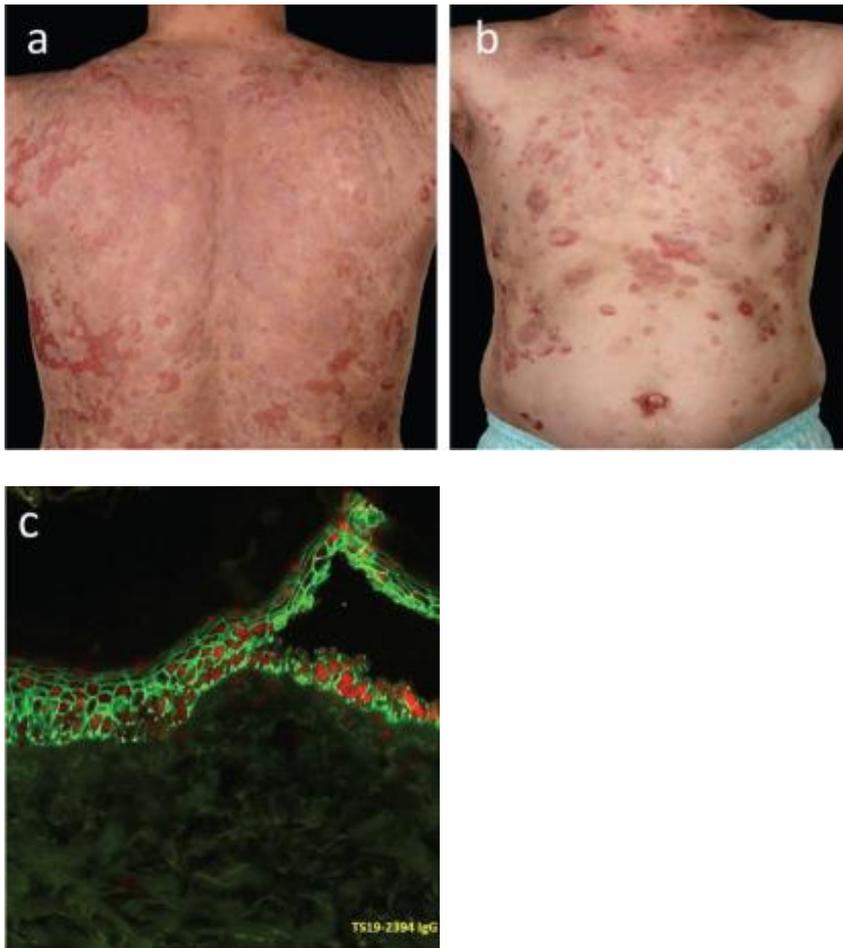


Figura 4. Pemfigo foliaceo. a\b) Erosioni squamose poco profonde sul dorso e sul torace. c) Immunofluorescenza diretta che dimostra il legame intraepiteliale dell'immunoglobulina G come evidenziato dal segnale fluorescente dell'isotiocianato di fluoresceina(12)

Il pemfigo volgare e il pemfigo foliaceo sono i due principali tipi di pemfigo. Il PV è immunologicamente caratterizzato da autoimmunità contro la desmogleina 3, una proteina strutturale del desmosoma epidermico ed epiteliale, e si presenta clinicamente con erosioni sulle superfici della mucosa.(2)

In circa la metà dei pazienti con PV, si osservano ulteriori autoanticorpi contro DSG1 e le lesioni della mucosa sono accompagnate da vesciche flaccide ed erosioni sulla pelle. Al contrario, i pazienti con PF generano solo autoanticorpi contro DSG1 e le lesioni sono limitate alla pelle. (13)(2) La distribuzione

relativa di PV e PF varia nei diversi paesi. Tra tutti i pazienti con pemfigo, la frequenza di PV varia tra il 13% (in Mali) e il 95% (in Arabia Saudita). (14,15)

In Europa e Nord America, il 65-90% dei casi di pemfigo sono PV, che è stato rivisto da Kridin nel 2018.(16) L'incidenza molto più alta di PF che di PV in regioni ben definite in Sud America e Nord Africa ha ispirato il termine PF endemico. Il pemfigo può insorgere in qualsiasi fascia di età con la maggior parte dei pazienti di età compresa tra 45 e 65 anni al momento della diagnosi. Al di fuori delle aree endemiche, dove è stato segnalato che fino al 30% dei pazienti ha meno di 20 anni ,(17,18) il pemfigo è raro sotto i 18 anni .(19,20)

In un recente studio dalla Germania, solo lo 0,6% dei pazienti con PV era minorenne .(16)(21)

L'età media di presentazione in PV varia tra 36,5 anni in Kuwait (22),e i 72,4 anni in Bulgaria. (23)

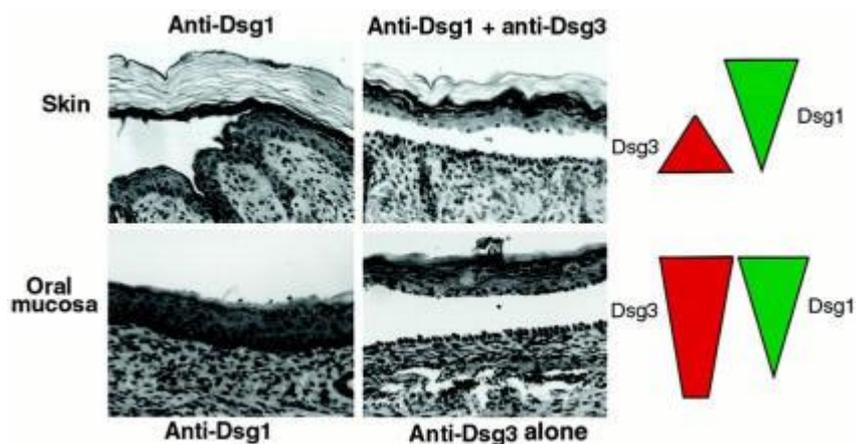


Figura 5. Ipotesi della compensazione della desmogleina. Nella pelle, l'anti-Dsg1 induce una scissione al di sotto dello strato granulare, dove manca Dsg3. Nella mucosa orale, l'anti-Dsg3 da solo è sufficiente a indurre vesciche soprabasal, poiché Dsg1 manca ai livelli inferiori dell'epidermide. Figura adattata da Mahoney et al.(24)

La localizzazione della divisione in PV e PF è spiegata dall'ipotesi di compensazione della desmogleina. Nella pelle (pannelli superiori), la Dsg3 è espressa ai livelli inferiori dell'epidermide, mentre la Dsg1 è presente ai livelli superiori. Nelle membrane mucose (pannelli inferiori), Dsg3 è presente in tutta l'epidermide, mentre Dsg1 è presente solo ai livelli superiori. Nella pelle, l'anti-Dsg1 induce una scissione al di sotto dello strato granulare, dove manca Dsg3. Nella mucosa orale, l'anti-Dsg3 da solo è sufficiente a indurre vesciche soprabasali, poiché Dsg1 manca ai livelli inferiori dell'epidermide. Tuttavia, le vesciche soprabasali della pelle nei pazienti con PV sono associate ad anticorpi sia contro Dsg3 che contro Dsg1.

Tabella 1: Caratteristiche demografiche e tassi di incidenza del pemfigo in diversi paesi del mondo(25)

Country	Region	Time Period (y)	Number of Patients	F-to-M Ratio	Mean Age, y	Annual Incidence Rate (/Million)
Botswana (Madu et al., 2019)	Gaborone, Kanye, Mochudi, Lobatse, Mahalapye	2008–2015	15	ND	ND	1.7 (0.9 (PF); 0.8 (PV ¹))
Bulgaria (Tsankov et al., 2000)	Sofia	1980–1995	74	1.2	72.4	4.7
Croatia (Marinovic et al., 2011)	Zagreb	2005–2010	41	1.9	ND	3.7
Finland (Hietanen and Salo, 1982)	Nationwide	1969–1978	44	1.1	57.5	0.8
France (Bastuji-Garin et al., 1995)	Ile-de-France administrative area	1985–1990	87	1.2	52	1.7
France (Thomas et al., 2010)	Midi-Pyrénées region	2002–2006	37	1.2	62	2.7
France (Jehn et al., 2019)	13 regions in France	2004–2013	249	1.07	59	1.5
Germany (Hahn-Ristic et al., 2002)	Würzburg and Mannheim	1989–1997	14	1.3	ND	0.8 (PV in native Germans); 6.8 (PV in foreigners)
Germany (Bertram et al., 2009)	lower Franconia	2001–2002	1	ND	62	0.5 (PV)
Greece (Michailidou et al., 2007)	Thessaloniki	1985–2004	129	2.3	59.6	8.0 (PV)
India (Kumar, 2008)	Thrissur District	2001	13	2.3	37 (F), 58 (M)	4.4
Israel (Pisanti et al., 1974)	Jerusalem	1952–1972	76	1.6	ND	16.1 (PV)
Israel (Kridin et al., 2016)	Haifa	2000–2015	180	1.7	54.7	7.2
Iran (Chams-Davatchi et al., 2005)	Tehran	1984–2003	1,209	1.5	42	16.0 (Tehran District), 10.0 (Iran)
Iran (Salmanpour et al., 2006)	Shiraz	1991–2000	221	1.3	38	6.7
Italy (Micali et al., 1998a)	Sicily	1982–1996	84	1.6	56	6.0
Kuwait (Nanda et al., 2004)	Kuwait city (covering 50% of the population of Kuwait)	1991–2002	60	0.9	36.5	4.6
Macedonia (V'ickova-Laskoska et al., 2007)	Skopje (covering all the population)	1990–2004	133	1.3	52	4.4
Malaysia (Adam, 1992)	Kuala Lumpur	ND	84	1	ND	2.0
Mali (Mahé et al., 1996)	Bamako	ND	30	4	46.7	2.9
Poland (Serwin et al., 2018)	Podlaskie Province	2001–2015	66	2.9	55	3.7
Romania (Baican et al., 2010)	Northwestern Romania	2001–2007	68	1.8	53	4.0
Saudi Arabia (Tallab et al., 2001)	Southern region	1990–1999	19	0.5	43.1	1.6
Serbia (Golusin et al., 2005)	Vojvodina	1990–2002	51	1.55	55.6	6.6
Serbia (Milinkovic et al., 2016)	Central Serbia	1991–2010	478	1.4	ND	4.0 ²
South Korea (Lee et al., 2018)	Nationwide	2006–2015	1,604	1.2 (PV); 0.9 (PF)	ND	2.1 (PV); 1.1 (PF)
Spain (Grau-Pérez et al., 2019)	Canary Islands	2004–2017	9 (PV); 15 (PF)	2.0 (PV); 0.5 (PF)	51.1 (PV); 51.3 (PF)	5.9
Switzerland (Marazza et al., 2009)	Nationwide	2001–2002	7	2.5	62.3	0.6
Taiwan (Huang et al., 2012)	Nationwide	2002–2009	853	1.3	52.5	4.7
Taiwan (Chiu et al., 2020)	Nationwide	2010–2015	1,207	1.2	53.0	4.0
Tunisia (Morini et al., 1993)	Sousse area	1985–1987	20	F only	28.0 (PF)	4.0 (PF)
Tunisia (Bastuji-Garin et al., 1995)	Nationwide	1986–1991	198	4	36.7	6.7
Tunisia (Zarza et al., 2011)	Northern Tunisia	1997–2007	92	2	50	8.6
Turkey (Uzun et al., 2006)	Adana and Antalya	1998–2004	148	1.5	43	2.4
Turkey (Bozdog and Bilgin, 2012)	Aydin	1998–2009	87	1.6	48	1.8
Turkey (Yayli et al., 2017)	All regions of the country	2013–2014	220	1.4	49	4.7
United Kingdom (Langan et al., 2008)	Nationwide	1996–2006	138	1.9	ND	6.8 (PV)
United States (Simon et al., 1980)	Connecticut	1972–1977	12	5	63.6	4.2 (general population), 32 (among Jews)

Abbreviations: F, female; M, male; ND, nondetermined; PF, pemphigus foliaceus; PV, pemphigus vulgaris.
Annual incidence rates were estimated as ratios of the number of newly diagnosed cases of pemphigus in the catchment area of the study over the mean population size in the middle year of each study (population sizes were obtained from the national censuses). Unadjusted incidence rates were adopted because only a minority of studies reported adjusted incidence rates, and the latter used various standardized populations as a reference.
¹Including pemphigus vegetans.
²Age-adjusted incidence rate.

A parte due studi provenienti dal Kuwait (Nanda et al 2004)(19) e dall'Arabia Saudita (Tallab et al., 2001)(12), è stata segnalata una preponderanza femminile in tutte le rimanenti coorti di studio di pemfigo non endemico, con il rapporto femmine-maschi prevalentemente compreso tra 1 e 2, con 5.0 negli Stati Uniti (Simon et al., 1980)(26) (Tabella 1)

INCIDENZA

Molteplici linee di evidenza suggeriscono che il PV mostra una distribuzione geografica ed etnica eterogenea. I tassi di incidenza annuale di Pemfigo Volgaris variano tra 0,76 casi per milione in Finlandia(27) e 32,0 casi per milione tra gli ebrei negli Stati Uniti.(21)

Una predisposizione prominente al PV è stata osservata in alcuni gruppi etnici, in particolare in individui di ascendenza ebrea ashkenazita e mediterranea. Corrispondentemente, i tre più alti tassi di incidenza annuale di PV in tutto il mondo sono stati registrati nel distretto di Teheran, Iran (16,0 per milione)(28) e tra la popolazione ebraica a Gerusalemme, Israele (16,1 per milione)(29) e Connecticut (32,0 per milione).(21)

In un recente studio basato sulla popolazione, il rischio di PV è aumentato di 3,6 volte tra gli ebrei rispetto agli arabi nel nord di Israele.(30)

Nello studio di Simon et al. (1980) (21) hanno riportato un'incidenza più di sette volte elevata di PV nelle persone di origine ebraica rispetto alle loro controparti non ebre.

La FP sporadica è una malattia poco frequente, corrispondente alla minoranza dei casi di pemfigo nella maggior parte delle popolazioni studiate.(13)

La sua incidenza annuale nel mondo occidentale è stimata in <1 caso per milione (Schmidt et al., 2016). Il tasso di incidenza annuale di PF in Corea del

Sud era di 1,1 per milione(31) e nel nord di Israele era di 0,8 per milione, senza una evidente predilezione etnica.(25)

Un'associazione con HLA-DRB1*0101 è stata osservata tra i pazienti messicani con Pemfigo Foliaceo sporadica.(32)

PREVALENZA

I dati sulla prevalenza del pemfigo sono scarsi. Nel registro nazionale danese dei pazienti, la prevalenza del pemfigo è stata calcolata in 60 per milione nel 2006. Sulla base dei dati della più grande assicurazione sanitaria tedesca, la prevalenza del pemfigo è stata stimata in 148 per milione di individui nel 2014 e 53 per milione di bambini e/o adolescenti nel 2015.(16)(18)

Per PV e PF, in quest'ultimo studio sono stati riportati tassi di prevalenza di 95 per milione e 10 per milione. (18)

3.2 Pemfigoide

La famiglia delle dermatosi pemfigoidi è caratterizzata da vesciche subepidermiche autoimmuni. Il paradigma classico del pemfigoide, nonché il membro più comune, è il pemfigoide bolloso. La sua presentazione clinica variabile, con o senza bolle franche, è legata a un prurito significativo.

Il pemfigoide delle mucose è un termine ombrello per un gruppo di dermatosi vescicolose subepidermiche che prediligono le membrane mucose e possono cicatrizzare. I medici che si imbattono in questi disturbi pemfigoidei possono trarre beneficio da una panoramica della loro presentazione clinica, del work-up diagnostico e dalla gestione terapeutica, con particolare attenzione alla malattia pemfigoidea più verosimilmente diagnosticata, il pemfigoide bolloso.

Il pemfigoide bolloso (BP) è una MBA che colpisce prevalentemente gli anziani. Il termine pemfigoide fu coniato per la prima volta da Lever nel 1953 per descrivere una malattia caratterizzata da formazione bollosa dovuta al distacco subepidermico per distinguerla dal pemfigo, un disturbo vescicolare intraepidermico indotto dall'acantolisi.

Successivamente, Jordan e Beutner hanno dimostrato la presenza di autoanticorpi in pazienti con pemfigoide bolloso (BP) utilizzando tecniche di immunofluorescenza diretta e indiretta.(33)

Il pemfigoide bolloso è il disturbo vescicolare autoimmune più frequente.(34) Colpisce principalmente soggetti anziani, durante l'ottava decade di vita, senza predilezione di genere, con rare segnalazioni di BP nei bambini e negli adolescenti.(35,36)

L'incidenza del BP è aumentata negli ultimi decenni a causa dell'invecchiamento della popolazione con molteplici comorbidità e dell'esposizione a farmaci che possono potenzialmente scatenare la malattia, nonché del miglioramento della diagnosi clinica delle presentazioni non bollose e dell'accuratezza delle tecniche di laboratorio dimostrare la presenza di autoanticorpi contro le proteine emidesmosomiali.(30)

Studi epidemiologici sul BP in Europa dimostrano che l'incidenza varia da 2,5 a 42,8 casi/milione/anno, mentre in Asia l'incidenza annuale è stimata tra 2,6 e 7,5 casi/milione. Le differenze statistiche possono essere correlate al tipo di studio svolto, durata e dati raccolti.

La frequenza del BP aumenta anche nei pazienti di età superiore a 80 anni, con quasi 150-330 nuovi casi/milione/anno in questa fascia di età.(30)



Figura 6 Coinvolgimento della mucosa - vesciche ed erosioni al palato

L'età media per il pemfigoide bolloso è di 80 anni, ma può essere osservata anche negli adulti più giovani nel pemfigoide bolloso indotto da farmaci e nella popolazione pediatrica.(37)

Negli Stati Uniti l'incidenza di BP è compresa tra 2,4 e 23 casi per milione nella popolazione generale annualmente, ma negli individui over 70 anni, il numero di casi annui arriva fino a 190-312 per milione. L'incidenza aumenta in modo esponenziale con l'età con il più alto carico di malattia nelle persone di età superiore agli 80 anni.(38)

L'incidenza della BP è aumentata negli ultimi decenni a causa dell'aumento dell'aspettativa di vita della popolazione che invecchia.(39)

Le donne sono colpite più degli uomini sotto i 75 anni, ma successivamente l'incidenza è maggiore negli uomini.(33)

Numerosi studi hanno dimostrato che le condizioni neurologiche sono fattori di rischio e indicatori di prognosi sfavorevole nel pemfigoide bolloso. Tra gli altri, alcuni fattori di rischio che sono stati identificati in tutta la letteratura includono la demenza, il morbo di Parkinson, i disturbi psichiatrici e le condizioni croniche allettate.(33)

La mortalità dei pazienti con BP è aggravata dall'aumentata incidenza di complicanze infettive che è la principale causa di morte.(40)

Sebbene rara, è stata segnalato anche il BP pediatrico e si presenta in modo diverso rispetto alla forma adulta. I neonati con BP hanno un coinvolgimento acrale predominante e quasi sempre raggiungono la remissione completa

dopo il trattamento con corticosteroidi sistemici e una singola terapia adiuvante.(35)

Infine, il pemfigoide gestazionale (PG), noto anche come herpes gestazionale, è una MBA autolimitante che si verifica classicamente durante la gravidanza avanzata e può causare vesciche transitorie nel neonato. Il bersaglio antigenico nel PG è simile a quello del BP e può essere considerato una variante della BP che si verifica in gravidanza. I fattori di differenziazione risiedono principalmente nella popolazione di pazienti colpite e nell'insorgenza della dermatosi durante la gravidanza.(35)

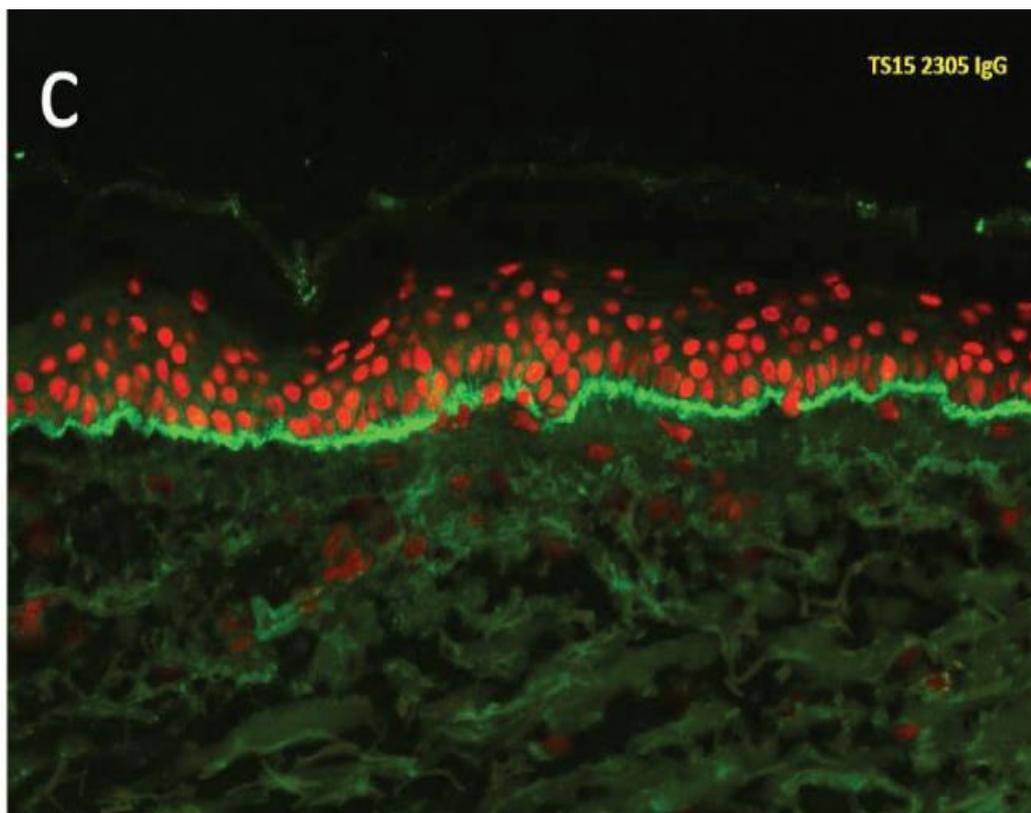


Figura 2:Immunofluorescenza diretta che dimostra il legame dell'immunoglobulina G alla membrana basale dell'epidermide, caratteristica del PB. (12)

3.3 HLA

La maggior parte degli studi sulla predisposizione genetica alle malattie bollose si sono concentrate sull'associazione tra la malattia e i geni del complesso di istocompatibilità maggiore, che nell'uomo viene chiamato HLA. Questa regione lunga circa 4Mb sul cromosoma 6p21.3 codifica più di 200 geni e ha la più alta densità genica del genoma umano. (41)

Il locus HLA è suddiviso in tre sub-regioni principali: la regione di classe I che codifica i geni polimorfici HLA-A, HLA-B e HLA-C, che vanno a contribuire alla presentazione dei peptide antigenici ai linfociti T citotossici.

La regione di classe II che contiene i geni polimorfici HLA-DQ, HLA-DR e HLA-DP, che sono espressi su cellule che presentano l'antigene (APC) e contribuiscono alla visualizzazione dei peptidi alle cellule T helper.

La regione di classe III, che consiste in molteplici geni importanti per il sistema immunitario (ad esempio TNF-C2 e C4).(41)

Un gran numero di disturbi autoimmuni come il pemfigo sono stati trovati associati alle regioni HLA, rendendo le associazioni HLA un segno distintivo dell'autoimmunità. (42)

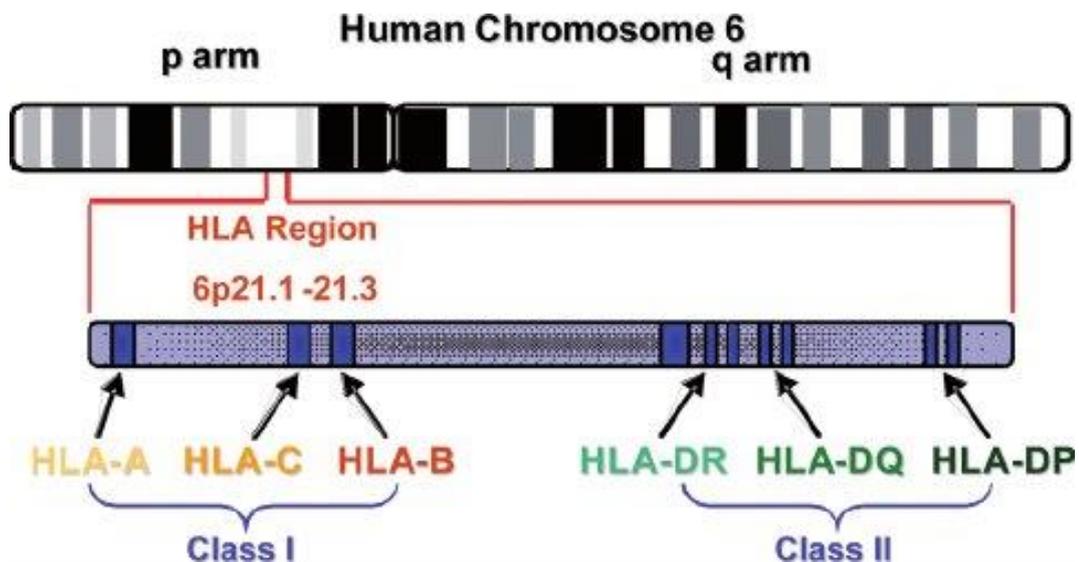


Figura 3 Mappa genica della regione dell'antigene leucocitario umano (HLA). La regione HLA si trova sul braccio corto del cromosoma 6, in corrispondenza di 6p21.31.(43)

3.4 Indagini genetiche

L'assegnazione accurata di singoli alleli HLA è essenziale per diverse discipline, come ad esempio la medicina clinica dei trapianti (44), ricerca sulla suscettibilità alle malattie infiammatorie (45), l'immunologia dei tumori (46) e la biologia evolutiva (47).

Fino a poco tempo fa, la tipizzazione HLA veniva effettuata principalmente mediante sonde oligonucleotidiche sequenza-specifiche (SSOP), dei primer specifici, e con la tipizzazione basata sulla sequenza, utilizzando il sequenziamento Sanger degli esoni 2 e 3 dei geni HLA di classe I (HLA-A/B/C) o dell'esone 2 dei geni HLA di classe II (HLA-DR/DQ/DP). Questo processo purtroppo richiede tempo e risulta incompatibile con qualsiasi contesto di ricerca ad alta produttività.

La tipizzazione basata sul sequenziamento di Sanger ha la capacità di eseguire una tipizzazione ad alta risoluzione, ma richiede l'amplificazione della reazione a catena della polimerasi (PCR), l'amplificazione dei singoli esoni di

ciascun locus e spesso di diverse reazioni di sequenziamento separate per ogni amplicone. I risultati di solito contengono un gran numero di ambiguità cis/trans. Un metodo basato su PCR e sequenziamento Sanger che genera una tipizzazione HLA inequivocabile per quattro loci HLA è stato pubblicato da Voorter et al. (48).

Anche se è automatizzabile e fornisce risultati affidabili, rimangono comunque le sfide pratiche riguardanti gli approcci basati sulla PCR.

Negli ultimi anni sono stati sviluppati metodi alternativi che utilizzano la tecnologia di sequenziamento di nuova generazione (NGS). (49)

La maggior parte dei metodi NGS si basa sulla tradizionale PCR delle regioni target, seguita da un sequenziamento massivo e parallelo degli ampliconi.

Il vantaggio del NGS è la maggiore quantità di letture di sequenziamento per singolo campione e dei locus che consente una determinazione allelica altamente sicura. Tuttavia, le limitazioni della PCR iniziale persistono per questi approcci NGS. I metodi basati sugli ampliconi sono laboriosi, necessitano di ampie fasi di ottimizzazione dei primer della PCR e spesso richiedono una cura precisa dei risultati.

Le nuove tecniche basate sull'arricchimento mediante sonde oligonucleotidiche garantiscono flessibilità di analisi di bersagli genomici di diverse dimensioni e complessità. (50)

Più recentemente sono stati introdotti numerosi software bioinformatici che hanno permesso di ottenere in modo più automatico e preciso la corretta identificazione dell'aplotipo HLA.

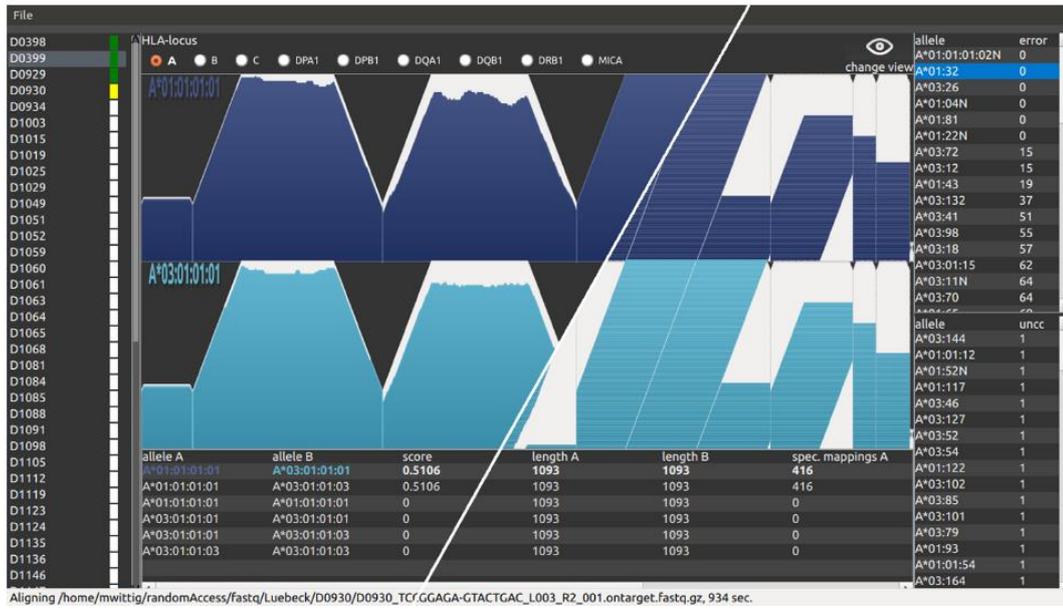


Figura 4 Esempio del risultato analisi software HLAAssign (Kiel University, Kiel, Germany).(51)

4 Scopo della tesi

L'obiettivo dello studio è la genotipizzazione del sistema antigenico dei leucociti umani in pazienti noti affetti da patologia pemfigo / pemfigoide per determinare l'aplotipo più comune e identificare nuovi fattori di suscettibilità nello sviluppo della malattia. In particolare, lo studio si pone l'obiettivo di verificare se nella popolazione arruolata con diagnosi conclamata di Pemfigo o Pemfigoide sia presente un aplotipo HLA simile o differente a quello riportato in letteratura. Obiettivo secondario è verificare se forme specifiche di Pemfigo e Pemfigoide siano associate a geni specifici del complesso HLA in modo da favorire eventuali indagini genetiche in ambito familiare.

5 Materiali e Metodi

Criteri d'inclusione

Sono stati arruolati tutti pazienti con diagnosi conclamata, attraverso indagine isto-patologica, di Pemfigo (o sue forme affini) o Pemfigoide (o sue forme affini), afferenti all'ambulatorio di Patologia e Medicina Orale e Diagnostica Odontostomatologica afferente alla UOC di Clinica Odontoiatrica (Direttore Prof E. Stellini) della Azienda Ospedale Università di Padova (Prof C. Bacci).

I candidati dovevano, inoltre, possedere i seguenti criteri di inclusione:

- Essere in grado di tollerare una normale procedura di prelievo ematico;
- Essere in buona salute generale;
- Essere in grado di leggere e compilare il modulo di consenso informato.

Reclutamento dei pazienti e raccolta del campione

Tutti i pazienti con diagnosi conclamata sono stati contattati telefonicamente e a ciascuno è stata proposta la partecipazione allo studio. Sono state spiegate le procedure, i vantaggi e le possibili complicanze della partecipazione. I pazienti che hanno accettato di partecipare sono stati convocati presso l'ambulatorio di Patologia Orale della Azienda Ospedale Università di Padova (Prof C. Bacci). Ogni paziente è stato indirizzato a presentarsi il giorno prestabilito della procedura presso la segreteria della U.O.C Clinica Odontostomatologica dell'Azienda Ospedale Università di Padova. Una volta sottoposti e firmati i documenti di Consenso informato e Consenso al trattamento dei dati, il paziente è stato fatto accomodare nell'ambulatorio preposto di Patologia orale. Una volta accomodato un'infermiera del reparto ha provveduto ad eseguire il prelievo di sangue venoso. La provetta è stata

inserita nell'apposito sacchetto per materiale biologico fornito di copia dei consensi firmati dal paziente, e trasportata e consegnata presso il laboratorio della U.O.C Patologia Cardiovascolare (Prof.ssa Kalliopi Pilichou).

Estrazione del DNA da sangue intero

Il DNA genomico (gDNA) è stato ottenuto da sangue intero mediante l'utilizzo dell'estrattore automatico MagNA Pure Compact Instrument (Roche Applied Science, Mannheim, Germany), impostando il programma "DNA_Blood_100_400" presente nel software dello strumento. Il processo di estrazione prevede inizialmente la lisi cellulare e la digestione proteica, mediante l'aggiunta del buffer di lisi e della proteinasi K; successivamente il DNA viene isolato con l'utilizzo di biglie magnetiche.

I complessi DNA-biglie vengono poi purificati dai residui cellulari mediante lavaggi e il DNA viene infine eluito ad elevate temperature.

Lo strumento permette di automatizzare il processo di estrazione e standardizzare il volume di eluizione, ottenendo inoltre DNA qualitativamente elevato.

L'estrattore automatico consente anche di ridurre il rischio di contaminazione tra campioni differenti, grazie alla presenza di un filtro HEPA integrato e della decontaminazione mediante raggi UV.

Analisi quantitativa e qualitativa del DNA

L'isolamento dell'acido nucleico è seguito da un controllo quantitativo e qualitativo.

La quantificazione del DNA è fondamentale per la standardizzazione del materiale di partenza della PCR, poiché questo fattore influenza notevolmente l'efficienza della reazione di amplificazione.

La quantificazione del DNA è stata effettuata con l'utilizzo dello Spettrofotometro a goccia Nanovue (GE Healthcare Life Sciences, UK). Una volta selezionato il tipo di acido nucleico di cui si vuole misurare l'assorbanza, è necessario eseguire una misurazione di 2 μ l di H₂O DNasi/RNasi-free definita "bianco di lettura", che consente di eliminare il rumore di fondo nelle misurazioni dei campioni.

Ponendo poi 2 μ l di ogni campione sul supporto, lo strumento restituisce la misurazione della concentrazione dei campioni e i relativi rapporti di assorbanza A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} .

Lo spettrofotometro permette di registrare l'assorbanza a 260 nm, lunghezza d'onda alla quale gli acidi nucleici assorbono la luce UV, e l'assorbanza a 280 nm e 230 nm, lunghezze d'onda alla quale assorbono la luce UV rispettivamente proteine e carboidrati. Il rapporto 260/280 dovrebbe essere compreso tra 1.8 e 2.0 ed è generalmente impiegato come indice di contaminazione da proteine. Il rapporto 260/230, invece, permette di individuare possibili contaminazioni da carboidrati complessi come TRIzol, fenolo o sali caotropici (composti organici presenti nei comuni buffer di lisi utilizzati nel processo di estrazione del DNA); il valore di tale rapporto deve essere compreso tra 2.0 e 2.2.

Preparazione della libreria.

La preparazione della libreria per il sequenziamento è stata effettuata mediante un pannello custom che comprendeva 11 geni della famiglia delle HLA. Il DNA genomico estratto viene frammentato casualmente attraverso il processo di tagmentazione, al termine del quale alle estremità dei frammenti formati vengono aggiunte sequenze di adattatori, necessarie per consentire

l'amplificazione nella fase seguente di PCR. Il DNA tagmentato viene successivamente purificato con l'impiego di biglie e amplificato mediante reazioni di PCR. In seguito, vengono aggiunti: gli indici, sequenze univoche fondamentali per poter unire le librerie di campioni differenti e gli adattatori (comuni a tutti i campioni) richiesti per la generazione di cluster nella flow cell. A questo punto i prodotti di PCR, dopo essere stati purificati, possono essere uniti in una singola provetta, poiché distinguibili grazie agli indici differenti per ogni singolo campione. Il protocollo per la preparazione della libreria, dopo aver effettuato i saggi quantitativi e qualitativi descritti in precedenza, prevede le seguenti fasi:

Tagmentazione: durante questa fase avviene la frammentazione e l'aggiunta di adattatori universali al DNA genomico. La frammentazione enzimatica del DNA viene effettuata grazie all'impiego del kit Nextera (Illumina, Inc San Diego, USA) a questo segue la ligazione di adattatori universali mediante aggiunta di ligasi e Adaptor Oligo Mix.

Purificazione del DNA tagmentato: permette di eliminare l'enzima rimasto dalla fase precedente, impedendo che si leghi alle estremità e che vada ad interferire con i processi successivi. Per svolgere questa operazione vengono aggiunte ai campioni delle biglie magnetiche AMPure XP beads (Beckman Coulter, Indianapolis, USA); va a seguire un'incubazione di 5 minuti a temperatura ambiente. Il surnatante viene separato dai complessi biglie-DNA mediante l'utilizzo di un supporto magnetico ed eliminato. Infine, il DNA viene eluito dalle biglie e riportato in soluzione.

Prima amplificazione: consente l'amplificazione dei frammenti ottenuti dalla precedente tagmentazione. La reazione di amplificazione si realizza in un

termociclatore Mastercycle ProS (Eppendorf, Hamburg, Germany) e prevede diverse fasi: 3 minuti a 72°C; 30 secondi a 98°C; 10 cicli a 98°C per 10 secondi, 60°C per 30 secondi, 72°C per 30 secondi e 72°C per 5 minuti;

Purificazione degli amplificati: consente, mediante l'utilizzo di biglie magnetiche, l'eliminazione dai primer residui impiegati nella reazione di amplificazione. A questo punto viene effettuato un controllo qualitativo e quantitativo delle librerie dei singoli campioni rispettivamente con Qubit 2.0 e TapeStation 4200 come descritto in precedenza.

Ibridazione: durante questo processo si inseriscono delle sonde biotilate, che si legano in modo specifico alle regioni di interesse della libreria. La reazione avviene a 58°C per un tempo compreso tra un minimo di 90 minuti e un massimo di 24 ore.

Purificazione: avviene attraverso biglie magnetiche marcate con streptavidina.

Seconda amplificazione: durante questa fase avviene l'aggiunta di un indice 1 differente per ogni singolo campione (un barcode molecolare che consente di identificare in modo univoco tutti i frammenti di un determinato campione); un indice 2 uguale per tutti i campioni.

Questo passaggio è necessario per unire le singole librerie ottenute per ogni campione e per poter procedere con il successivo sequenziamento. Nella miscela di reazione vengono introdotti i primer per l'indice 1 e per l'indice 2 e la miscela di amplificazione della libreria. Il programma di amplificazione prevede: 30 secondi a 98°C; 10 cicli a 98°C per 10 secondi, 60°C per 30 secondi, 72°C per 30 secondi e 72°C per 5 minuti; il prodotto di PCR viene

successivamente purificato mediante sonde magnetiche come descritto al punto 2 e viene effettuata una quantificazione delle librerie finali

Unione delle librerie: 750 ng DNA di ciascun campione vengono posti in una provetta per un volume finale della libreria non deve superare i 40 μ L. Nel caso in cui il volume finale superi i 40 μ L, le librerie possono essere concentrate con apposite colonnine.

Allineamento delle reads: I file FASTQ rappresentano l'input per l'allineamento ossia il processo che identifica il match ottimale tra le reads e la sequenza del genoma di riferimento. Alle sequenze analizzate viene attribuito un punteggio in base alla loro similarità di sequenza. I risultati vengono salvati in formato Sequence Alignment Map (SAM) e successivamente in Binary Alignment/Map (BAM) files (una versione compressa in formato binario dei file SAM), che costituiscono l'input per la chiamata delle varianti. L'allineamento delle reads viene comunemente ottenuto con l'algoritmo BWA (Burrows-Wheeler Aligner), che allinea sequenze relativamente corte ad una lunga sequenza di riferimento. Questo algoritmo richiede l'utilizzo del software Genome Analysis Toolkit (GATK) per chiamare le varianti. Il software GATK (<https://software.broadinstitute.org/gatk/>) analizza SNPs, inserzioni, delezioni e altre varianti confrontandole con varianti conosciute e registrandole nel formato file VCF (Variant Call File).

La probabilità di errore viene descritta da un punteggio di qualità della variante.

VCF è un formato sviluppato dalla comunità scientifica che contiene informazioni in merito alle varianti trovate in posizioni specifiche, ottenute dal confronto con un genoma di riferimento.

Per determinare l'assetto aplo tipico più probabile è stato utilizzato un software commerciale HLAAssign (Kiel University, Kiel, Germany).

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita con la versione 7.0 per Windows del software GraphPad (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com) e con la versione 17.9.4 del software MedCalc Statistical (MedCalc Software bvba, Ostend, Balgium;)

6 Aspetti etici

Il presente studio è stato sottoposto al Comitato etico in data 10\01\2023, con ID Studio 21429, codice CESC 5645/AO/23, codice URC AOP2839; è stato approvato con parere definitivo in data 2\03\203.

7 Risultati

Sono stati contattati 10 pazienti. 9 hanno aderito al progetto e hanno completato il percorso previsto (tasso di adesione del 90%). Sono stati arruolati pazienti che nel corso della loro vita hanno sviluppato e manifestato una malattia bollosa autoimmune. Tab 2

Tabella 2 Tabella dati clinici

Nr.paziente	Data di nascita	Paese di nascita	Diagnosi	Scala VAS	Occupazione	Famigliarità	Altre patologie
ID1	10\1\1961	Padova	Pemfigoide	1	Oss	nega	nega
ID2	7\4\1948	Padova	Pemfigoide	5	Casalinga	Lichen Miocardiopatia	Lichen scleroatrofico Miocardiopatia ostruttiva Pemfigoide
ID3	10\2\1967	Vicenza	Pemfigoide	5	Casalinga	Pemfigoide	Fibromialgia Depressione Pemfigoide
ID4	10\10\1953	Padova	Pemfigo vulgaris Pemfigoide	6	Impiegata	nega	Diverticoli Pemfigo Volgaris
ID5	21\7\1954	Este	Pemfigoide	9	Educatrice asilo nido	nega	nega
ID6	3\2\1939	Padova	pemfigoide	10	Operaia	nega	nega
ID7	30\1\57	Este	Vasculite leucocitoclastica Sopetto pemfigo ig4	0	Casalinga	nega	Ipertensione
ID8	21\8\1939	Treviso	Pemfigoide	3	Meccanico fabbrica	nega	Ipertensione Diabete
ID9	17\4\1945	Treviso	Pemfigoide	3\4	Parroco	nega	Infarto Pemfigoide

Come viene riportato nella tabella 2 i componenti del campione provengono tutti dalla regione Veneto, sono nati in un periodo di tempo che varia dal 1939 al 1967 con un'età media di 71 anni. Si può osservare inoltre che nel loro iter diagnostico ai pazienti è stata diagnosticata una manifestazione riconducibile alla famiglia dei pemfigoidi in 8 casi su 9. Al loro arrivo presso la UOC di Clinica Odontoiatrica, una volta svolto l'iter burocratico e aver fatto accomodare il paziente presso l'ambulatorio preposto di Patologia orale gli è stato chiesto di dare un punteggio relativo al loro stato di ansia ed è stato misurato per mezzo della

Scala di VAS (scala dell'analogo visivo); come si può osservare solamente 3 persone presentavano un'ansia moderatamente elevata (33% del totale). Come si può osservare ai componenti del campione è stato chiesto se fossero a conoscenza di una possibile familiarità in famiglia per la loro MBA o altre patologie, 2 persone su 9 (22% del campione) hanno risposto di una presenza di familiarità in famiglia per alcune patologie: lichen, miocardiopatia ostruttiva e pemfigoide non specificato. Ai componenti del campione è stato chiesto se oltre alla loro MBA presentassero dal punto di vista anamnestico la presenza di altre patologie.

A questa domanda 7 persone su 9 (77% del campione) hanno risposto di avere una o più patologie così riportate: ipertensione (28%), diabete (14%), depressione (14%), miocardiopatia ostruttiva (14%), lichen scleroatrofico (14%), diverticoli (14%), fibromialgia (14%).

Per finire 3 persone su 9 (33% del campione) ha risposto di non soffrire di ulteriori patologie all'infuori delle loro MBA.

Dati metriche corsa NGS

La tabella n3 Riepilogo della copertura (coverage summary) ci dà un'analisi sulla copertura ottenuta nelle regioni target dei geni durante il sequenziamento dei campioni. Possiamo osservare il valore di copertura media delle regioni, compreso tra un valore minimo di 358,7X e un valore massimo di 573,4X, con una media aritmetica di 502,9X.

Tabella 3 Riepilogo della copertura

Sample	Mean Region Coverage Depth	Uniformity of Coverage (Pct > 0.2*mean)	Target Coverage at 1X
1	573.4	95.4%	99.60%
2	480.5	96.5%	99.8%
3	482.8	96.2%	99.8%
4	558.6	97.20%	99.6%
5	535.6	91.9%	99.0%
6	553.4	96.8%	100.0%
7	358.7	96.5%	99.9%
8	428.8	96.0%	99.9%
9	555.1	99.4%	100.0%
Sample	Target Coverage at 10X	Target Coverage at 20X	Target Coverage at 50X
1	99.6%	98.8%	98.2%
2	99.8%	99.6%	98.8%
3	99.8%	99.4%	98.7%
4	99.60%	98.8%	98.5%
5	99.0%	97.7%	95.6%
6	100.0%	99.7%	99.1%
7	99.9%	99.4%	98.1%
8	99.9%	99.5%	98.6%
9	100.0%	100.00%	99.9%

I valori della uniformità di copertura, compresi tra un valore minimo del 91,9% e un massimo del 99,4%, con una media di 96,2%.

Si nota inoltre i valori di copertura del bersaglio rispettivamente a 1 X (99,7% di copertura), a 10 X (99,3% di copertura), a 20 X (99,2% di copertura), a 50 X (98,3% di copertura).

Maggiore è il grado copertura percentuale del target, maggiore risulta essere l'accuratezza di analisi. Nella figura 10 è rappresentata graficamente la copertura del gene HLA-DQA1 a titolo esemplificativo.

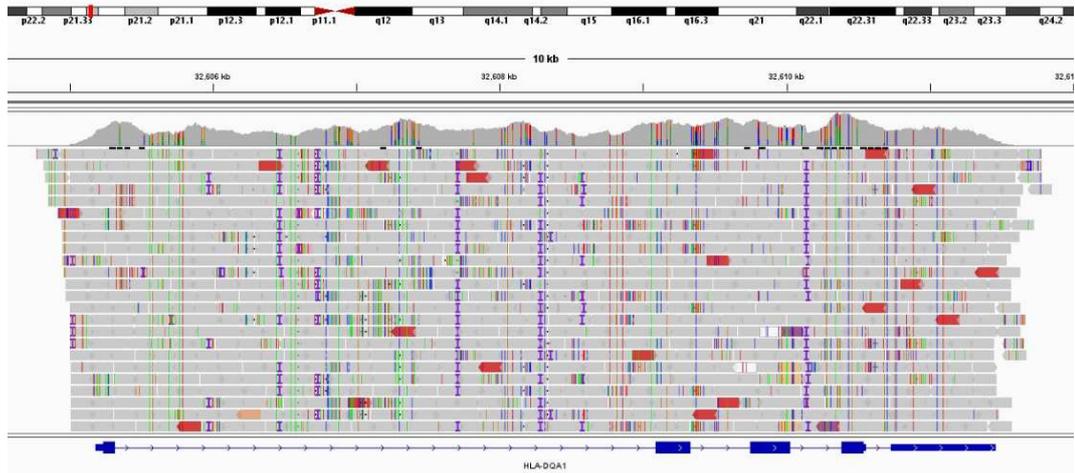


Figura 5 Copertura del gene HLA-DQA1

Tabella 4 Aplotipi totali

Allele	Nr.	Allele	Nr.	Allele	Nr.	Allele	Nr.
A*24:02:01	4	B*51:01:01	4	C*02:02:02	5	G*01:01:01	6
A*32:01:01	4	B*38:01:01	3	C*04:01:01	3	G*01:01:02	4
A*26:01:01	3	B*07:02:01	2	C*06:02:01	3	G*01:01:03	2
A*02:01:01	2	B*13:02:01	1	C*07:01:01	2	G*01:04:01	2
A*01:01:01	1	B*14:01:01	1	C*12:03:01	2	G*01:01:08	1
A*11:126	1	B*27:05:02	1	C*01:02:01	1	G*01:03:01	1
A*29:02:01	1	B*35:01:01	1	C*07:02:01	1	G*01:05N	1
A*30:01:01	1	B*35:02:01	1	C*08:02:01	1	G*01:06	1
A*33:01:01	1	B*35:03:01	1				
		B*49:01:01	1				
		B*57:01:01	1				
		B*58:01:0	1				
Allele	Nr.	Allele	Nr.	Allele	Nr.	Allele	Nr.
DPA1*01:03:01	15	DPB1*04:01:01	7	DQA1*01:01:01	6	DQB1*05:01:01	7
DPA1*02:01:01	1	DPB1*02:01:02	4	DQA1*05:05:01	5	DQB1*03:01:01	3
DPA1*02:01:02	1	DPB1*01:01:01	2	DQA1*01:01:02	2	DQB1*03:02:01	2
DPA1*02:01:08	1	DPB1*03:01:01	2	DQA1*01:03:01	2	DQB1*06:02:01	2
		DPB1*04:02:01	1	DQA1*01:04:01	2	DQB1*02:02:01	1
		DPB1*104:01	1	DQA1*01:02:01	1	DQB1*04:02:01	1
		DPB1*17:01	1			DQB1*05:03:01	1
						DQB1*06:03:01	1
Allele	Nr.	Allele	Nr.	Allele	Nr.		
DRB1*01:01:01	4	DRB3*02:02:01	10	MICA*002:01	5		
DRB1*11:04:01	4	DRB3*01:01:02	2	MICA*008:01:01	5		
DRB1*04:02:01	2	DRB3*02:24	2	MICA*007:01	2		
DRB1*11:01:01	2	no call	2	MICA*009:01	2		
DRB1*01:02:01	1			MICA*004	1		
DRB1*07:01:01	1			MICA*016	1		
DRB1*08:04:01	1			MICA*017	1		
DRB1*13:01:01	1			MICA*019:01	1		
DRB1*14:01:01	1						
DRB1*15:01:01	1						

La tabella n 4 riporta tutti gli aplotipi riscontrati durante il sequenziamento in laboratorio. E' noto che in letteratura vengono presi maggiormente in considerazione i geni DQA1, DQB1, DRB1. Tutti gli aplotipi riscontrati sono stati raggruppati per frequenza e incolonnati.

In questo studio si è visto che DQA1*01:01 è stato riscontrato 8 volte su 18 alleli (44%) DQB1*05:01:01 è stato riscontrato 7 volte su un totale di 18 alleli (38,8%); DRB1*01:01:01 e DRB1*11:04:01 sono stati riscontrati 4 (22,2%) rispettivamente.

Analisi statistica in confronto alla popolazione del Nord Italia

Le frequenze degli alleli riscontrate nella nostra popolazione sono state confrontate con i dati provenienti dal database internazionale Allele Frequency Database (<http://www.allelefreqencies.net>). Nello specifico vista la provenienza geografica dei pazienti abbiamo deciso di confrontare le frequenze alleliche con quelle della popolazione del Nord Italia. Da tale analisi è emerso un arricchimento statisticamente significativo di due specifici alleli all'interno della nostra popolazione. Nello specifico DQA1*01:01 risulta essere presente in misura 6 volte maggiore (p-value: <0.0001) e DQB1*05:01:01 in misura 5 (p-value: <0.0005) volte maggiore rispetto alla popolazione del Nord Italia. Per quanto riguarda il gene DRB1, due alleli (DRB1*01:01:01 e DRB1*11:04:01) mostravano una frequenza maggiore all'interno della popolazione seppur con un grado minore di significatività (p-value <0.0162 e <0.0431 rispettivamente). Fig 11

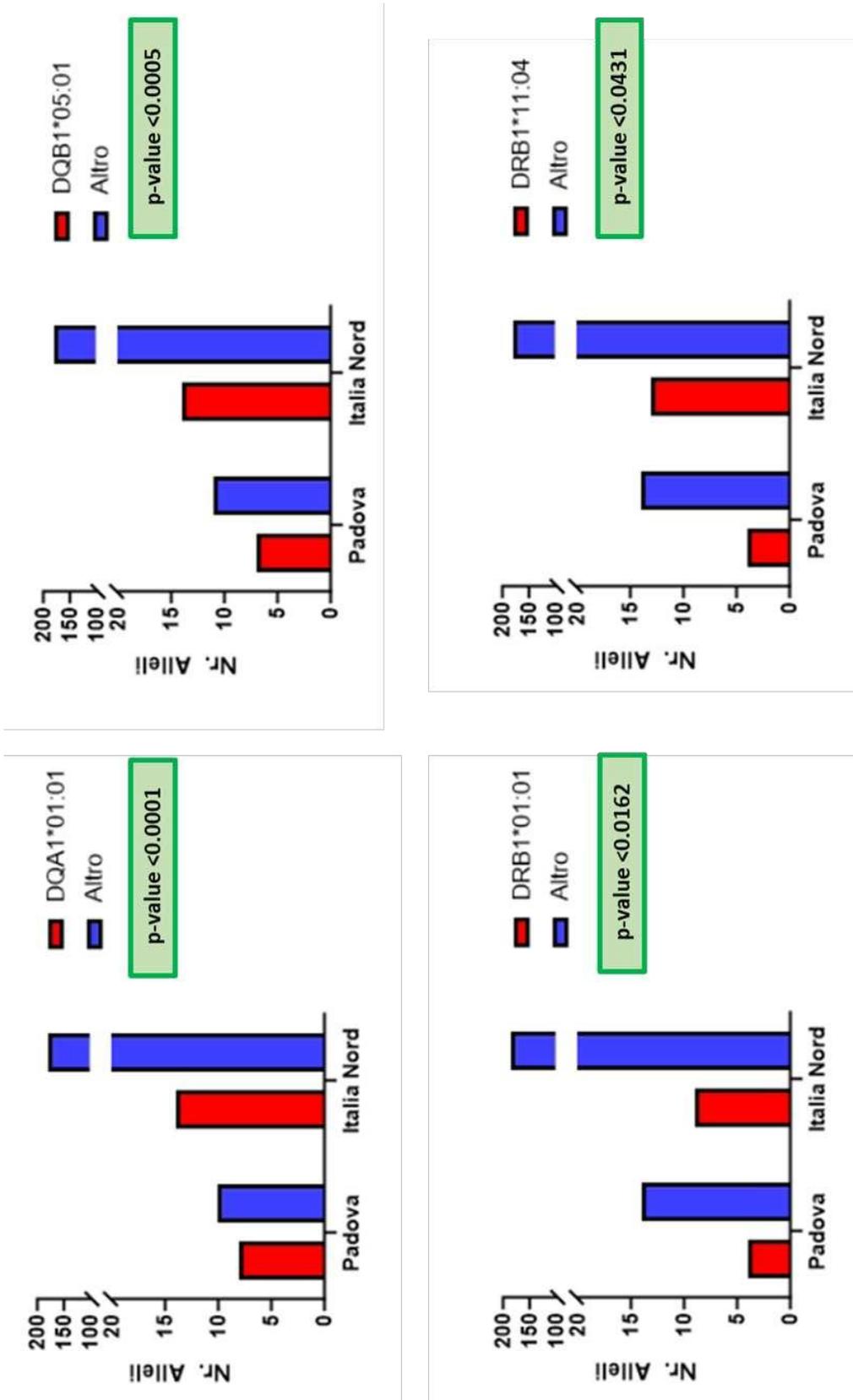


Figura 6 Analisi statistica con studi del Nord Italia

8 Discussione

Questo studio si proponeva di sequenziare il DNA di pazienti noti affetti da patologie bollose autoimmuni (pemfigo e pemfigoide con relative sotto classi) per determinarne l'aplotipo più comune e identificare nuovi fattori di suscettibilità nello sviluppo della malattia. In particolare l'analisi era mirata a ricercare se fosse presente un aplotipo HLA simile o differente rispetto a quello riportato in letteratura. Secondariamente ci si proponeva di verificare se forme specifiche di Pemfigo e Pemfigoide fossero associate a geni specifici del complesso HLA in modo da favorire eventuali indagini genetiche in ambito familiare.

È stata eseguita una anamnesi del paziente e dell'ambito familiare, dalla quale è emerso che 8 pazienti su 9 (88%) sono affetti da MBA della famiglia dei pemfigoidi, a 1 paziente su 9 (11%) è stato diagnosticato un sospetto Pemfigo Ig4 correlato, in fase di approfondimento, e solamente 1 persona su 9 (11%) è affetta da una forma mista.

Tutti i pazienti che hanno partecipato allo studio provengono dalla regione Veneto e hanno un'età compresa tra i 56 e gli 84 anni con una media di 71 anni. Ai partecipanti allo studio è stato misurato il livello di ansia mediante la scala di VAS (scala dell'analogo visivo) con un valore misurato tra 0 e 10 e una media di 4,6. Il livello di ansia riportato dai pazienti non riguardava la procedura di prelievo in sé, bensì la loro quotidianità. Durante questo studio ci siamo chiesti quindi se l'ansia possa contribuire alla formazione di una autoimmunità, i cui bersagli molecolari tuttavia sono ancora in fase di identificazione.

Dai dati correlati alla corsa eseguita per sequenziare i campioni dei pazienti in laboratorio abbiamo osservato un coverage medio di 502,9X e un coverage medio a 50X nel 98,3% del nostro target di interesse. Questi due parametri rivelano che i risultati forniti dalla corsa sono affidabili grazie alla profondità e l'uniformità di copertura della nostra regione di interesse.

Il risultato del sequenziamento con questo pannello custom appositamente disegnato per analizzare 11 geni del complesso HLA ci ha fornito numerose informazioni riguardanti la distribuzione dei diversi aplotipi all'interno della coorte. Tuttavia, lo studio si è concentrato inizialmente ponendo attenzione ai geni DQA1, DQB1, DRB1; in quanto più comunemente associati a MBA, come è stato dimostrato nello studio di Vodo et al (52) del 2018.

Dai geni sopracitati sono risultati più frequenti i seguenti alleli: DQA1*01:01 risulta essere presente in misura 6 volte maggiore (p-value: <0.0001) e DQB1*05:01:01 in misura 5 (p-value: <0.0005) volte maggiore rispetto alla popolazione del Nord Italia in base al confronto con i dati provenienti dal database internazionale Allele Frequency Database (<http://www.allelefreqencies.net>). L'analisi ha dimostrato un incremento della frequenza anche relativamente a due alleli del gene DRB1 (DRB1*01:01:01 e DRB1*11:04:01) seppur in misura minore rispetto a DQA1 e DQB1.

È necessario puntualizzare che lo studio è limitato dalla numerosità campionaria della coorte e che il risultato di questa analisi può essere inteso come un "pilot study" che dovrà essere necessariamente confermato aumentando il numero di pazienti reclutati.

Gli sviluppi futuri del presente studio prevedono il sequenziamento dell'intero genoma dei pazienti affetti da malattie vescicolo-bollose, per indagare se siano presenti mutazioni specifiche in altri loci genetici, che potrebbero contribuire alle manifestazioni cliniche della patologia.

9 Conclusioni

Questo studio ha dimostrato che gli alleli DQA1*01:01 e DQB1*05:01:01 sono risultati più frequenti rispetto agli studi di riferimento, sono risultati più frequenti anche i due alleli del gene DRB1 seppur in maniera meno significativa. Quantunque si puntualizza che lo studio è stato limitato da una numerosità campionaria della coorte non elevata e che il risultato dell'analisi si può intendere come un "pilot study" che deve necessariamente essere confermato aumentando il numero dei pazienti reclutati ed estendendo l'analisi al resto del pannello.

10 Bibliografia

1. Hammers CM, Stanley JR. Mechanisms of Disease: Pemphigus and Bullous Pemphigoid. *Annu Rev Pathol.* 23 maggio 2016;11:175–97.
2. Schmidt E, Kasperkiewicz M, Joly P. Pemphigus. *Lancet.* 7 settembre 2019;394(10201):882–94.
3. Daniel BS, Murrell DF. Review of autoimmune blistering diseases: the Pemphigoid diseases. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* settembre 2019;33(9):1685–94.
4. Ramos-e-Silva M, Ferreira A, Jacques C de-Moura-Castro. Oral involvement in autoimmune bullous diseases. *Clin Dermatol.* 2011;29(4):443–54.
5. Kouris A, Platsidaki E, Christodoulou C, Armyra K, Korkoliakou P, Stefanaki C, et al. Quality of life, depression, anxiety and loneliness in patients with bullous pemphigoid. A case control study. *An Bras Dermatol.* 2016;91(5):601–3.
6. Wang EQ, Radjenovic M, Castrillón MA, Feng GHY, Murrell DF. The effect of autoimmune blistering diseases on work productivity. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* novembre 2018;32(11):1959–66.
7. Amagai M, Klaus-Kovtun V, Stanley JR. Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell.* 29 novembre 1991;67(5):869–77.
8. Egami S, Yamagami J, Amagai M. Autoimmune bullous skin diseases, pemphigus and pemphigoid. *J Allergy Clin Immunol.* aprile 2020;145(4):1031–47.
9. Jelti L, Cordel N, Gillibert A, Lacour JP, Uthurriague C, Doutre MS, et al. Incidence and Mortality of Pemphigus in France. *J Invest Dermatol.* febbraio 2019;139(2):469–73.
10. Qian Y, Jeong JS, Abdeladhim M, Valenzuela JG, Aoki V, Hans-Filho G, et al. IgE anti-LJM11 sand fly salivary antigen may herald the onset of fogo selvagem in endemic Brazilian regions. *J Invest Dermatol.* marzo 2015;135(3):913–5.
11. Kaplan I, Hodak E, Ackerman L, Mimouni D, Anhalt GJ, Calderon S. Neoplasms associated with paraneoplastic pemphigus: a review with emphasis on non-hematologic malignancy and oral mucosal manifestations. *Oral Oncol.* luglio 2004;40(6):553–62.
12. Tull TJ, Benton E. Immunobullous disease. *Clin Med (Lond).* maggio 2021;21(3):162–5.
13. Kasperkiewicz M, Ellebrecht CT, Takahashi H, Yamagami J, Zillikens D, Payne AS, et al. Pemphigus. *Nat Rev Dis Primers.* 11 maggio 2017;3:17026.
14. Tallab T, Joharji H, Bahamdan K, Karkashan E, Mourad M, Ibrahim K. The incidence of pemphigus in the southern region of Saudi Arabia. *Int J Dermatol.* settembre 2001;40(9):570–2.

15. Mahé A, Flageul B, Cissé I, Kéita S, Bobin P. Pemphigus in Mali: a study of 30 cases. *Br J Dermatol.* gennaio 1996;134(1):114–9.
16. Kridin K. Pemphigus group: overview, epidemiology, mortality, and comorbidities. *Immunol Res.* aprile 2018;66(2):255–70.
17. Diaz LA, Sampaio SA, Rivitti EA, Martins CR, Cunha PR, Lombardi C, et al. Endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem): II. Current and historic epidemiologic studies. *J Invest Dermatol.* gennaio 1989;92(1):4–12.
18. Aoki V, Rivitti EA, Diaz LA, Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. Update on fogo selvagem, an endemic form of pemphigus foliaceus. *J Dermatol.* gennaio 2015;42(1):18–26.
19. Mintz EM, Morel KD. Clinical features, diagnosis, and pathogenesis of chronic bullous disease of childhood. *Dermatol Clin.* luglio 2011;29(3):459–62, ix.
20. Hübner F, König IR, Holtsche MM, Zillikens D, Linder R, Schmidt E. Prevalence and age distribution of pemphigus and pemphigoid diseases among paediatric patients in Germany. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* novembre 2020;34(11):2600–5.
21. Hübner F, Recke A, Zillikens D, Linder R, Schmidt E. Prevalence and Age Distribution of Pemphigus and Pemphigoid Diseases in Germany. *J Invest Dermatol.* dicembre 2016;136(12):2495–8.
22. Nanda A, Dvorak R, Al-Saeed K, Al-Sabah H, Alsaleh QA. Spectrum of autoimmune bullous diseases in Kuwait. *Int J Dermatol.* dicembre 2004;43(12):876–81.
23. Tsankov N, Vassileva S, Kamarashev J, Kazandjieva J, Kuzeva V. Epidemiology of pemphigus in Sofia, Bulgaria. A 16-year retrospective study (1980-1995). *Int J Dermatol.* febbraio 2000;39(2):104–8.
24. Mahoney MG, Wang Z, Rothenberger K, Koch PJ, Amagai M, Stanley JR. Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. *J Clin Invest.* febbraio 1999;103(4):461–8.
25. Kridin K, Schmidt E. Epidemiology of Pemphigus. *JID Innov.* marzo 2021;1(1):100004.
26. Simon DG, Krutchkoff D, Kaslow RA, Zarbo R. Pemphigus in Hartford County, Connecticut, from 1972 to 1977. *Arch Dermatol.* settembre 1980;116(9):1035–7.
27. Hietanen J, Salo OP. Pemphigus: an epidemiological study of patients treated in Finnish hospitals between 1969 and 1978. *Acta Derm Venereol.* 1982;62(6):491–6.
28. Chams-Davatchi C, Valikhani M, Daneshpazhooh M, Esmaili N, Balighi K, Hallaji Z, et al. Pemphigus: analysis of 1209 cases. *Int J Dermatol.* giugno 2005;44(6):470–6.
29. Pisanti S, Sharav Y, Kaufman E, Posner LN. Pemphigus vulgaris: incidence in Jews of different ethnic groups, according to age, sex, and initial lesion. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* settembre 1974;38(3):382–7.
30. Kridin K, Zelber-Sagi S, Bergman R. Pemphigus Vulgaris and Pemphigus Foliaceus: Differences in Epidemiology and Mortality. *Acta Derm Venereol.* 2 ottobre 2017;97(9):1095–9.

31. Lee YB, Lee JH, Lee SY, Kim JW, Yu DS, Han KD, et al. Incidence and death rate of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus in Korea: A nationwide, population-based study (2006-2015). *J Dermatol.* dicembre 2018;45(12):1396–402.
32. del Mar Sáez-de-Ocariz M, Vega-Memije ME, Zúñiga J, Salgado N, Ruíz J, Balbuena A, et al. HLA-DRB1*0101 is associated with foliaceous pemphigus in Mexicans. *Int J Dermatol.* aprile 2005;44(4):350.
33. Kershenovich R, Hodak E, Mimouni D. Diagnosis and classification of pemphigus and bullous pemphigoid. *Autoimmun Rev.* 2014;13(4–5):477–81.
34. Ujiie H, Nishie W, Shimizu H. Pathogenesis of bullous pemphigoid. *Dermatol Clin.* luglio 2011;29(3):439–46, ix.
35. Taquin H, Chiaverini C, Lacour JP. Spectrum of Clinical Responses to Therapies in Infantile Bullous Pemphigoid. *Pediatr Dermatol.* 2016;33(2):e77-81.
36. Schmidt E, Zillikens D. Pemphigoid diseases. *Lancet.* 26 gennaio 2013;381(9863):320–32.
37. Langan SM, Smeeth L, Hubbard R, Fleming KM, Smith CJP, West J. Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris--incidence and mortality in the UK: population based cohort study. *BMJ.* 9 luglio 2008;337(7662):a180.
38. Kridin K, Ludwig RJ. The Growing Incidence of Bullous Pemphigoid: Overview and Potential Explanations. *Front Med (Lausanne).* 2018;5:220.
39. Miyamoto D, Santi CG, Aoki V, Maruta CW. Bullous pemphigoid. *An Bras Dermatol.* 2019;94(2):133–46.
40. Amber KT, Murrell DF, Schmidt E, Joly P, Borradori L. Autoimmune Subepidermal Bullous Diseases of the Skin and Mucosae: Clinical Features, Diagnosis, and Management. *Clin Rev Allergy Immunol.* febbraio 2018;54(1):26–51.
41. The MHC sequencing consortium. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature.* ottobre 1999;401(6756):921–3.
42. Todd JA, Acha-Orbea H, Bell JI, Chao N, Fronck Z, Jacob CO, et al. A molecular basis for MHC class II--associated autoimmunity. *Science.* 20 maggio 1988;240(4855):1003–9.
43. Bayat A, McCarty S, Syed F. Influence of the Human Leukocyte Antigen Complex on the Development of Cutaneous Fibrosis: An Immunogenetic Perspective. *Acta Derm Venerol.* 2010;90(6):563–74.
44. Flomenberg N, Baxter-Lowe LA, Confer D, Fernandez-Vina M, Filipovich A, Horowitz M, et al. Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplantation outcome. *Blood.* 1 ottobre 2004;104(7):1923–30.
45. Cassinotti A, Birindelli S, Clerici M, Trabattoni D, Lazzaroni M, Ardizzone S, et al. HLA and autoimmune digestive disease: a clinically oriented review for

- gastroenterologists. *Am J Gastroenterol.* gennaio 2009;104(1):195–217; quiz 194, 218.
46. Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol.* 1989;47:187–376.
 47. Ober C, Weitkamp LR, Cox N, Dytch H, Kostyu D, Elias S. HLA and mate choice in humans. *Am J Hum Genet.* settembre 1997;61(3):497–504.
 48. Voorter CEM, Palusci F, Tilanus MGJ. Sequence-based typing of HLA: an improved group-specific full-length gene sequencing approach. *Methods Mol Biol.* 2014;1109:101–14.
 49. Bentley G, Higuchi R, Hoglund B, Goodridge D, Sayer D, Trachtenberg EA, et al. High-resolution, high-throughput HLA genotyping by next-generation sequencing. *Tissue Antigens.* novembre 2009;74(5):393–403.
 50. Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, Lopez R, Parham P, Marsh SGE. The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Res.* gennaio 2013;41(Database issue):D1222-1227.
 51. Wittig M, Anmarkrud JA, Kässens JC, Koch S, Forster M, Ellinghaus E, et al. Development of a high-resolution NGS-based HLA-typing and analysis pipeline. *Nucleic Acids Res.* 23 giugno 2015;43(11):e70.
 52. Vodo D, Sarig O, Sprecher E. The Genetics of Pemphigus Vulgaris. *Front Med (Lausanne).* 2018;5:226.