



ZnT8: può essere un marker precoce di T1DM in bambini con celiachia e/o tireopatie autoimmuni?

Maria Beatrice Ruozi, Chiara Gertosio, Valeria Paganelli, Alice Brambilla,
Francesca Periti, Annachiara Malvezzi, Rossana Togli, Benedetta Pietra,
Daniela Oliani, Gloria Cantamessa

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

ZnT8: può essere un marker precoce di T1DM in bambini con celiachia e/o tireopatie autoimmuni?

Diabete mellito di tipo 1, celiachia e tireopatie autoimmuni sono malattie frequenti in età pediatrica e spesso associate tra di loro, probabilmente per un comune substrato genetico HLA-correlato. Nella maggior parte dei pazienti pediatrici affetti da T1DM è stata recentemente segnalata la positività degli autoanticorpi diretti specificatamente contro l'isoforma 8 del trasportatore dello zinco (ZnT8). Lo scopo del nostro studio è stato quello di analizzare la prevalenza e il ruolo degli autoanticorpi anti-ZnT8 in bambini e adolescenti affetti da tireopatie autoimmuni (tiroidite di Hashimoto o malattia di Graves), da malattia celiaca o da entrambe le patologie. I dati pubblicati fino ad ora, infatti, riguardano soltanto la presenza e l'andamento di ZnT8 nelle condizioni di diabete all'esordio e nell'individuazione dei soggetti a rischio fra i familiari dei pazienti diabetici. Non ci sono studi in letteratura relativi alla possibilità di impiego di questo parametro nello screening di pazienti a rischio di diabete tipo 1 perché affetti da altre patologie autoimmuni.

ZnT8: it may be an early marker of T1DM in children with celiac disease and/or autoimmune thyroid disease?

Diabetes mellitus type 1, autoimmune thyroid disease and celiac disease are common in childhood and often associated with each other, probably due to a common genetic substrate HLA-related. In most pediatric patients with T1DM has recently been reported positivity of autoantibodies directed specifically against the isoform 8 of the zinc carrier (ZnT8). The aim of our study was to analyze the prevalence and role of anti-ZnT8 in children and adolescents with autoimmune thyroid disease (Hashimoto's thyroiditis or Graves' disease), celiac disease, or both diseases; the published data so far, in fact, concerned only with the presence and performance of ZnT8 conditions of diabetes onset and in the identification of those at risk among relatives of diabetic patients.

There are no studies in the literature concerning the possibility of use of this parameter in screening of patients at risk of type 1 diabetes because suffering from other autoimmune diseases.

Introduzione

Diabete mellito di tipo 1, celiachia e tireopatie autoimmuni sono malattie frequenti in età pediatrica e spesso associate tra di loro [1]. Sebbene l'eziologia di queste patologie resti ancora in gran parte misconosciuta, è ampiamente accettato che l'origine dei disturbi sia multifattoriale, legata ad un'interazione fra predisposizione genetica e fattori ambientali [2].

Tra i numerosi geni coinvolti nella patogenesi di queste malattie una particolare attenzione è stata prestata ai geni del complesso maggiore di istocompatibilità (HLA) di classe II.

Nella maggior parte dei pazienti pediatrici affetti da diabete mellito di tipo 1 è stata recentemente segnalata la positività degli autoanticorpi diretti specificatamente contro l'isoforma 8 del trasportatore dello zinco (ZnT8), oltre ai già noti autoanticorpi anti glutammico decarbossilasi (anti GAD65) e anti tirosina fosfatasi (anti IA2) [3].

Scopo del lavoro

Fino ad alcuni anni fa venivano determinati, per stabilire la presenza di autoimmunità relativa al diabete tipo 1, gli anticorpi anti GAD65 e anti IA2, mentre recentemente è stata segnalata la positività anche degli autoanticorpi diretti specificatamente contro l'isoforma 8 del trasportatore dello zinco (ZnT8) nella maggior parte dei pazienti pediatrici affetti da diabete mellito di tipo 1, anche in assenza degli altri [4]. Non è nota la positività degli anticorpi anti ZnT8 in soggetti affetti da altre patologie autoimmuni a rischio di sviluppare T1DM [5].

Lo scopo del nostro studio è stato quello di analizzare la prevalenza e il ruolo degli autoanticorpi anti-ZnT8 in bambini e adolescenti affetti da tireopatie autoimmuni (tiroidite di Hashimoto o malattia di Graves), da malattia celiaca o da entrambe le patologie, al fine di verificarne l'utilità nello screening dei pazienti a rischio per il diabete tipo 1.

Materiali e metodi

Pazienti

Sono stati arruolati 76 pazienti (età media al momento dello studio 17.96 ± 7.13 anni), 56 femmine e 20 maschi, affetti da tireopatie autoimmuni e/o celiachia, seguiti presso l'Unità Operativa di Pediatria della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia. In particolare 26 pazienti (2 maschi e 24 femmine) erano affetti da tireopatie autoimmuni, di cui 7 da malattia di Graves, 25 (11 maschi e 14 femmine) presentavano celiachia e 25 (7 maschi e 18 femmine) l'associazione di entrambe le patologie.

Al momento della diagnosi, l'età dei pazienti con tireopatia autoimmune come unica o prima malattia era di 10.96 ± 3 anni e di quelli affetti da celiachia era di 6.24 ± 3.73 anni.

Al momento dello studio, i pazienti affetti esclusivamente da tireopatia autoimmune avevano un'età media di 22.2 ± 6.31 anni, i 25 soggetti con malattia celiaca una età media di 11.52 ± 3.63 anni e i 25 pazienti affetti da entrambe le patologie età media di 21.3 ± 6.0 anni. Alcuni dei pazienti erano affetti anche da altre malattie legate a disordini autoimmunitari; tra le pazienti con malattia di Graves, una era affetta anche da alopecia e un'altra da sclerosi multipla. Tra i soggetti con tiroidite, in una paziente è stata riscontrata artrite, malattia diagnosticata anche in una adolescente affetta sia da celiachia che da tiroidite. Tra i pazienti con malattia celiaca, in una è stata diagnosticata anche vitiligine.

In tutti i soggetti è stata ricercata la presenza di autoanticorpi anti IA2, GAD65 e ZnT8.

Nei pazienti risultati positivi per uno o più autoanticorpi sono stati valutati la riserva insulinica del pancreas mediante curva da carico endovenoso di glucosio (IVGTT, Intravenous Glucose Tolerance Test), i livelli di C-peptide e di emoglobina glicata (HbA1c) [6].

In 36/38 pazienti con almeno 1 anticorpo positivo è stata eseguita la tipizzazione molecolare HLA-DQA1 e DQB1 ad alta risoluzione con valutazione degli eterodimeri di suscettibilità per il diabete mellito di tipo 1.

Metodi

I dosaggi di autoanticorpi anti GAD65 e anti IA2 con metodica radioimmunologica RIA (Radioimmuno Assay), sono stati eseguiti presso il Laboratorio di Immuno-allergologia della Clinica Pediatrica, Dipartimento Materno-infantile della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia (Dott.ssa C. Torre e Dott.ssa G. Testa) considerando positivo il test per gli autoanticorpi anti-GAD65 con valori di concentrazione serica ≥ 0.9 U/ml e ≥ 0.75 U/ml per gli autoanticorpi anti-IA2.

Gli autoanticorpi anti-ZnT8 sono stati ricercati con metodica immunoenzimatica (ELISA), considerando come valore cut-off per la positività concentrazioni seriche ≥ 15 u/mL.

Si è eseguito test da carico endovenoso di glucosio (IVGTT) per valutare la curva insulinemica, e in particolare si è calcolata la somma dell'insulinemia ai tempi +1' e +3', dopo somministrazione di soluzione glucosata, per ottenere la FPIR (First Phase Insuline Response), il cui valore è stato valutato sui centili di normalità in base allo stadio puberale dei pazienti al momento del test [6].

I livelli sierici di glucosio a digiuno sono stati dosati usando il metodo della esochinasi-G-6-PDH (Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Germany), con un analizzatore chimico (Architectc-16000). I coefficienti di variazione (CV) intrasaggio ed intersaggio erano, rispettivamente, 1.98% e 2.15% per una glicemia di 4.4 mmol/L (80 mg/dl) e 0.65% e 1.51% per una glicemia di 15.5 mmol/L (279 mg/dl).

I livelli sierici di insulina sono stati determinati tramite metodica di immunochemiluminescenza in fase solida (Immunolite 2000, Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, U.S.A.). I CV intrasaggio ed intersaggio erano, per valori di insulinemia di 7.67 μ UI/ml, rispettivamente di 5.5% e 7.3%, e di 3.8% e 4.2%, a valori di 100 μ UI/ml.

L'emoglobina glicata (HbA1c) è stata valutata con metodo HPLC a scambio ionico di tipo dedicato (Biorad Variant II).

Il peptide C dell'insulina è stato dosato con un metodo immunometrico di tipo non competitivo con rivelazione a chemiluminescenza (strumento Immulite 2000 Xp, Siemens).

La tipizzazione genomica HLA ad alta risoluzione per gli eterodimeri di suscettibilità al diabete DQA1 e DQB1 è stata eseguita mediante reverse PCR-SSO (Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotide) presso il Laboratorio di Immunogenetica del Servizio Trasfusionale della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia.

Risultati

Dei 76 pazienti, 25 (32.9%) presentavano positività di 1 solo autoanticorpo, 11 (14.5%) positività di 2 autoanticorpi e 2 (2.6%) erano positivi per 3 autoanticorpi. In particolare:

- la positività isolata degli anticorpi anti IA2 è stata osservata in 14 pazienti;
- la positività isolata degli anti GAD65 era presente in 11;
- 10 soggetti avevano positività a IA2 e GAD65;
- 1 paziente era positivo a GAD65 e ZnT8;
- in 2 pazienti si sono osservati livelli superiori ai valori di cut-off per gli autoanticorpi anti- IA2, GAD65 e ZnT8;

- in 38 pazienti tutti gli autoanticorpi sono risultati negativi.

Riguardo la distribuzione della positività dei 3 autoanticorpi nelle varie patologie, si è potuto osservare come la maggior parte dei pazienti che presentano positività per più di un autoanticorpo fossero quelli affetti da tireopatia autoimmune associata a celiachia (8 casi), nei pazienti celiaci sono stati trovati 4 casi e nel gruppo dei soggetti con ATD si è riscontrato 1 solo caso con positività per 2 o 3 autoanticorpi ($p=n.s.$); non si sono osservate differenze per sesso ed età.

I pazienti ZnT8 positivi rispetto ai negativi presentano titolo anticorpale significativamente più elevato di anti GAD65 (15.56 ± 17.38 vs 0.93 ± 1.78 , $p < 0.001$) e anti IA2 (65.83 ± 36.91 vs 3.42 ± 13.2 , $p < 0.001$) (Figura 2).

Non è stata riscontrata significativa differenza di età.

Dei 38 soggetti con almeno 1 autoanticorpo positivo, 24 hanno eseguito curva da carico endovenoso di glucosio per la valutazione della secrezione insulinica; 7 pazienti (29.7%) hanno mostrato ridotta riserva pancreatica di insulina (FPIR $< 1^\circ$ centile). Il livello di C-peptide è risultato patologico in 5/38 casi (13.1%) autoanticorpi-positivi e di questi 2 presentavano anche FPIR $< 1^\circ$ centile.

Tutti e 3 i soggetti ZnT8 positivi avevano una FPIR $< 1^\circ$ centile; il livello di C-peptide era inferiore alla norma in 2 casi (1 positivo anche per GAD65+IA2 e 1 positivo anche per GAD65) e nella norma in 1 (con positività anche per GAD65 e IA2); il valore di emoglobina glicata è risultato superiore alla norma in una paziente affetta da tiroidite e celiachia (con positività per tutti e tre gli anticorpi).

Si osserva come il numero di autoanticorpi sia correlato positivamente con il numero di eterodimeri di suscettibilità al T1DM.

Le caratteristiche principali dei pazienti positivi per ZnT8 hanno suggerito un elevato grado di rischio di insorgenza di T1DM, dal momento che tutti avevano FPIR $< 1^\circ$ c, e sono risultati positivi ad almeno uno degli altri autoanticorpi di suscettibilità.

Due dei tre soggetti ZnT8 positivi avevano sia celiachia che tireopatia autoimmune associate e presentavano 2 e 4 eterodimeri di suscettibilità al diabete mellito di tipo 1, la paziente con ipertiroidismo e ZnT8 positiva, invece, aveva 4 eterodimeri di suscettibilità.

Discussione

L'eziopatogenesi del diabete mellito tipo 1 riconosce una componente di suscettibilità genetica associata ad almeno 20 geni, i meglio conosciuti dei quali sono quelli del sistema maggiore di istocompatibilità [7]; è stato calcolato che essi siano responsabili di più del 40% della suscettibilità al diabete [8]. I fattori ambientali che contribuiscono alla comparsa di questa patologia sono prevalentemente di natura infettiva e alimentare.

Indipendentemente dalla causa che porta all'esordio del T1DM, le proteine delle cellule β -pancreatiche costituiscono il target dell'attacco autoimmune. Tra queste sono state inizialmente individuate la glutammico decarbossilasi e la tirosina fosfatasi [9].

La determinazione degli autoanticorpi anti GAD65 e anti IA2 viene utilizzata sia per la diagnosi del tipo di diabete presentato dai pazienti all'esordio, sia per individuare i soggetti a rischio aumentato di sviluppare la malattia [10].

Più recentemente è stato individuato il trasportatore dello zinco (ZnT8), che viene considerato un importante autoantigene pancreatico, nei confronti del quale vengono prodotti autoanticorpi, il cui andamento permette di valutare massa e funzione delle β -cellule pancreatiche [11].

ZnT8 non è stato messo in relazione con gli stessi geni di suscettibilità al diabete del sistema HLA, associati a GAD65 e IA2, pertanto costituisce un marker indipendente di malattia e può aggiungere valore predittivo al dosaggio degli autoanticorpi nel prediabete [12].

È stato dimostrato che la determinazione degli anticorpi antiZnT8 in associazione agli anticorpi anti GAD65 e IA2 aumenta le possibilità di diagnosi del diabete tipo 1, in quanto, con questo tipo di valutazione, solo il 7% dei pazienti risulta essere negativo per gli autoanticorpi diretti contro autoantigeni delle isole pancreatiche [13].

Gli studi finora pubblicati sugli anticorpi anti ZnT8 riguardano la loro presenza e andamento nelle condizioni di diabete all'esordio e nell'individuazione dei soggetti a rischio fra i familiari dei pazienti diabetici.

Non ci sono dati relativi alla possibilità di impiego di questo parametro nello screening di pazienti a rischio di diabete tipo 1 perché affetti da altre patologie autoimmuni.

Scopo del nostro studio è stato pertanto valutare se la determinazione degli anticorpi anti ZnT8, unita a quella degli anticorpi anti GAD65 e IA2, permetta di effettuare uno screening più preciso del rischio di T1DM in gruppi di pazienti affetti da malattie autoimmuni tiroidee, malattia celiaca o da entrambe le patologie.

Il risultato dello studio ha messo in evidenza che il numero dei soggetti risultati positivi per gli anticorpi anti ZnT8 è molto più basso rispetto a quello dei soggetti risultati positivi per uno o entrambi gli altri autoanticorpi diretti contro costituenti delle β -cellule pancreatiche. Inoltre non abbiamo trovato nessun soggetto positivo solo per gli anticorpi anti ZnT8.

Gli autoanticorpi anti ZnT8 sono stati individuati in soggetti con titoli molto più elevati di anti GAD65 e IA2, rispetto ai pazienti risultati negativi.

Per quanto riguarda le patologie autoimmuni dei soggetti testati, 2/3 casi positivi erano affetti da 2 patologie autoimmuni. La terza paziente, che presentava solo malattia di Graves e positività limitata agli anticorpi anti GAD65, è sorella e figlia di soggetti con T1DM, pertanto la positività anticorpale potrebbe essere dovuta più alla familiarità per T1DM che al fatto di appartenere a una categoria a rischio per diabete. Dal punto di vista della ricerca della predisposizione genetica, si è osservato come il numero di eterodimeri di suscettibilità sia direttamente correlato al numero di autoanticorpi presenti senza associazione con gli anticorpi anti ZnT8.

Pertanto da questi risultati si può concludere che, nelle patologie autoimmuni prese in considerazione, gli anticorpi anti ZnT8 sono positivi solo molto raramente.

La loro positivizzazione sembra essere più tardiva rispetto a quella degli altri anticorpi, in considerazione del fatto che nessun soggetto è risultato positivo solo per gli anti trasportatore dello zinco. Tale andamento è suggerito anche dal fatto che, in presenza di anticorpi anti ZnT8, il titolo degli altri è molto elevato e la riserva insulinica pancreatica è già compromessa; essendo il processo che conduce all'esordio clinico di diabete molto lento, una riserva insulinica ridotta suggerisce che l'inizio dell'aggressione autoimmune del pancreas risalgia a molto tempo prima.

Si può quindi concludere che nello screening delle categorie di pazienti con patologie autoimmuni a rischio di diabete tipo 1, la determinazione degli anticorpi anti ZnT8 non permette di individuare un numero maggiore di soggetti rispetto a quanto è possibile ottenere con la valutazione degli anticorpi anti GAD65 e IA2. Tale dosaggio non sembra utile neanche per anticipare la diagnosi di rischio aumentato per questa patologia. Il fatto che il titolo anticorpale di anti GAD65 e IA2 sia molto elevato in caso di associazione con gli anti ZnT8 suggerisce invece che il riscontro di tutti gli autoanticorpi nello stesso individuo indichi un rischio molto alto di sviluppare il diabete mellito di tipo 1 a breve.

Tabelle e figure

Tabella 1. Caratteristiche dei 3 pazienti ZnT8 positivi.

Pazienti ZnT8 +	Positività anticorpale	Patologia	FPIR	Eterodimeri
Paziente 1 (F)	+ GAD65 + IA2	ATD + CD	<1° c	2
Paziente 2 (M)	+ GAD65 + IA2	ATD + CD	<1° c	4
Paziente 3 (F)	+ GAD65	ATD	<1° c	4

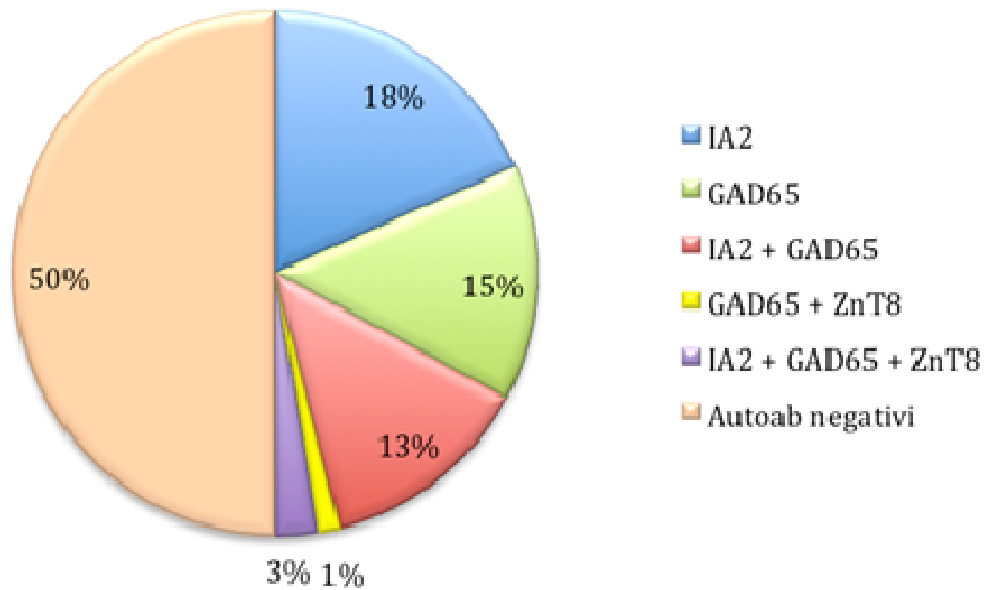


Figura 1. Distribuzione della positività agli autoanticorpi nella popolazione in esame.

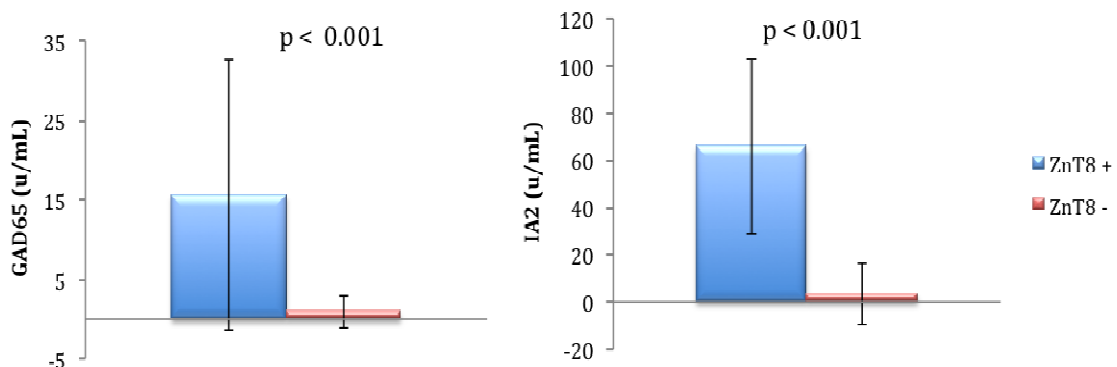


Figura 2. Titolo di autoanticorpi anti GAD65 in presenza o assenza di positività per ZnT8 e titolo di autoanticorpi anti IA2 in presenza o assenza di positività per ZnT8.

Bibliografia

1. Atkinson M, Eisenbarth G. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* 2001;358:221-229.
2. Betterle C. Le malattie autoimmuni. *Ed Piccin*, Padova, Italia, 2001.
3. Kawasaki E. ZnT8 and type 1 diabetes. *Endocrine Journal* 2012;59(7):531-537.
4. Andersson C, Larsson K, Vaziri-Sani F et al. The three Znt8 autoantibody variants together improve the diagnostic sensitivity of childhood and adolescent type 1 diabetes. *Autoimmunity* 2011;44:394-405.
5. Rink L, Haase H. Zinc homeostasis and immunity. *Trends Immunol* 2007;28:1-4.
6. Lorini R, Vanelli M. Normal values of first-phase insulin response to intravenous glucose in healthy Italian children and adolescents. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1996;9(2):163-167.
7. Todd JA. From genome to aetiology in a multifactorial disease, type 1 diabetes. *BioEssays* 1999;2:164-174.
8. Vermeulen I, Weets I, Asanghanwa M et al. Contribution of antibodies against IA-2beta and zinc transporter 8 to classification of diabetes diagnosed under 40 years of age. *Diabetes Care* 2011;34:1760-1765.
9. Kukreja A, Maclaren NK. Autoimmunity and Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(12):4371-4378.
10. Lesley RGD, Atkinson MA, Notkins AL. Autoantigens IA-2 and GAD in type 1 (insulin dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1999;42:3-14.
11. Wenzlau JM, Frish LM, Gardner TJ et al. Novel antigens in type 1 diabetes: the importance of ZnT8. *Curr Diab Rep* 2009;9(2):105-112.
12. Chimienti F, Devergnas S, Pattou F et al. In vivo expression and functional characterization of the zinc transporter ZnT8 in glucose-induced insulin secretion. *J Cell Sci* 2006;119:4199-4206.
13. Andersson C, Vaziri-Sani F, Delli A et al. Triple specificity of ZnT8 autoantibodies in relation to HLA and other islet autoantibodies in relation to HLA and other islet autoantibodies in childhood and adolescent type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes* 2012, in press.