



**Università
degli Studi
di Palermo**

AREA RICERCA E TRASFERIMENTO TECNOLOGICO
SETTORE DOTTORATI E CONTRATTI PER LA RICERCA
U. O. DOTTORATI DI RICERCA

Dottorato di ricerca in Medicina Molecolare e Clinica.

Dipartimento di Promozione della salute, Materno Infantile, Medicina Interna e Specialistica

di Eccellenza «G. D'Alessandro» (PROMISE).

MEDS-05/A

RECETTORI KIR NELLA PATOGENESI DELLA NON- CELIAC GLUTEN SENSITIVITY (NCGS)

DOTTORANDO

DAVIDE MASSA

COORDINATORE

CH.MO PROF. ANTONINO TUTTOLOMONDO

TUTOR

PROF. DOMENICO DI RAIMONDO

CO TUTOR

PROF.SSA LUISA AGNELLO

CICLO - XXXVIII

ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2025/2026

INDICE

1. Introduzione.....	4
2. Disturbi glutine-correlati.....	4
2.1. Reazioni di ipersensibilità	5
2.1.1. Allergia al grano.....	6
2.1.2. Celiachia.....	8
2.1.3. Dermatite Erpetiforme	13
2.1.4. Atassia da Glutine	15
2.2. Non-Celiac Gluten Sensitivity	16
2.2.1. Definizione.....	16
2.2.2. Epidemiologia	17
2.2.3. Fattori di rischio	19
2.2.4. Patogenesi	21
2.2.5. Diagnosi	22
2.2.6. Trattamento	24
3. Biologia delle cellule Natural Killer e Geni KIR.....	25
3.1 Origine e Differenziamento	27
3.2 Ruolo fisiologico.....	28
3.3 Attività citotossica.....	28
4. Obiettivi dello studio.....	37
5. Materiali e metodi	38
5.1. Pazienti.....	38
5.2. Analisi genetica dei KIR	39
5.2.1 Estrazione del DNA genomico.....	39
6. Risultati.....	42
7. Discussione.....	46
8. Bibliografia	49

Abstract

Introduzione:

La sensibilità al glutine non celiaca (NCGS) è una condizione caratterizzata dalla comparsa di sintomi gastrointestinali ed extraintestinali in seguito all'ingestione di glutine, in assenza di malattia celiaca (CD) e allergia al grano. Nonostante l'ampio interesse per la NCGS, i meccanismi alla base della sua patogenesi restano in gran parte sconosciuti e, ad oggi, non sono stati individuati specifici fattori genetici predisponenti. È noto che, a differenza della CD, la NCGS non è associata a un particolare assetto genotipico o fenotipico HLA. Diversi studi hanno evidenziato il ruolo dell'immunità innata e delle cellule natural killer (NK) nello sviluppo della malattia. I recettori KIR, espressi sulle cellule NK, ne regolano l'attivazione attraverso l'interazione con le molecole HLA.

Obiettivo dello studio:

Questo studio ha l'obiettivo di analizzare le varianti genetiche dei recettori KIR, suddivise in allotipi "inibitori" e "attivatori", per comprendere il loro possibile coinvolgimento nello sviluppo e nella progressione della NCGS. In particolare, vogliamo valutare la presenza di specifiche varianti genetiche KIR nei pazienti con NCGS rispetto a un gruppo di controllo costituito da donatori di sangue sani.

Materiali e metodi:

Abbiamo condotto uno studio retrospettivo caso-controllo su 40 pazienti con diagnosi confermata di NCGS e 32 donatori sani. La tipizzazione dei geni KIR è stata eseguita utilizzando il kit KIR SSO Genotyping Test (One Lambda, Inc., Canoga Park, CA, USA) basato sulla

tecnologia Luminex. Questo test consente di rilevare la presenza o l'assenza dei seguenti geni: 2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 3DS1, 2DP1, 3DP1, oltre alle varianti comuni di 2DL5, 2DS4 e 3DP1.

Risultati:

Abbiamo riscontrato che la frequenza dei geni KIR inibitori era significativamente più alta nei soggetti sani rispetto ai pazienti con NCGS per i seguenti geni: KIR2DL1 (96,87% contro 55%, $p = .0024$, OR = 25.36; 95% CI = 3.15 - 204.35), KIR2DL2 (65,62% contro 32,5%, $p = .006$; OR = 3.95, 95% CI = 1.48 - 10.6), KIR2DL3 (81,25% contro 22,5%, $p < .0001$; OR = 14.92, 95% CI = 4.69 - 47.47) e KIR2DL5 (62,5% contro 10%, $p < .0001$; OR = 15, 95% CI = 4.27 - 52.7). Questi dati suggeriscono un possibile ruolo protettivo di tali geni nella suscettibilità alla NCGS. Inoltre, l'analisi degli aplotipi ha mostrato che l'85% dei pazienti con NCGS possiede un aplotipo di tipo B, mentre nei soggetti sani prevalgono gli aplotipi A e AB, con una frequenza rispettivamente del 31,25% e 56,25%.

Conclusione:

I nostri risultati indicano che i geni KIR inibitori sono più frequentemente presenti nei soggetti sani, suggerendo un possibile effetto protettivo nei confronti della NCGS. Di conseguenza, il bilanciamento tra i recettori KIR attivatori e inibitori potrebbe giocare un ruolo chiave nella patogenesi della malattia.

1. Introduzione

La sensibilità al glutine non celiaca (NCGS) è una condizione caratterizzata dalla comparsa di sintomi gastrointestinali ed extraintestinali in seguito all'ingestione di glutine, in assenza di malattia celiaca (CD, Celiac Disease) e allergia al grano. Tuttavia, studi recenti hanno evidenziato che anche altri componenti del grano, oltre al glutine, potrebbero essere responsabili di questi sintomi. Di conseguenza, è stata proposta una denominazione alternativa, "sensibilità al grano non celiaca" (NCWS), per riflettere meglio la complessità del disturbo. Sebbene la NCGS presenti alcune somiglianze con la celiachia, non sono ancora disponibili dati certi riguardo al rischio di complicanze quali malnutrizione, osteoporosi, malattie autoimmuni o manifestazioni orali, che invece sono ben documentate nei pazienti celiaci. Inoltre, ad oggi, non è stato identificato alcun biomarcatore specifico, né sierologico né a livello della mucosa, che consenta una diagnosi certa della NCGS. L'unico metodo attualmente valido per confermare la condizione è il test di provocazione in doppio cieco controllato con placebo, in cui né il paziente né il medico sanno se l'alimento somministrato sia frumento (potenziale agente scatenante) o riso (placebo).

2. Disturbi glutine-correlati

I disturbi correlati al glutine comprendono un insieme eterogeneo di manifestazioni cliniche che si sviluppano in risposta all'esposizione al glutine o, più in generale, al frumento. Tra queste condizioni rientrano la celiachia, l'allergia al grano, la dermatite erpetiforme, l'atassia da grano e la sensibilità al glutine non celiaca (NCGS) [1]. Il danno d'organo associato a queste patologie è il risultato di reazioni di ipersensibilità, che vengono classificate in quattro categorie principali, ognuna delle quali è caratterizzata da specifici meccanismi patogenetici, descritti di seguito.

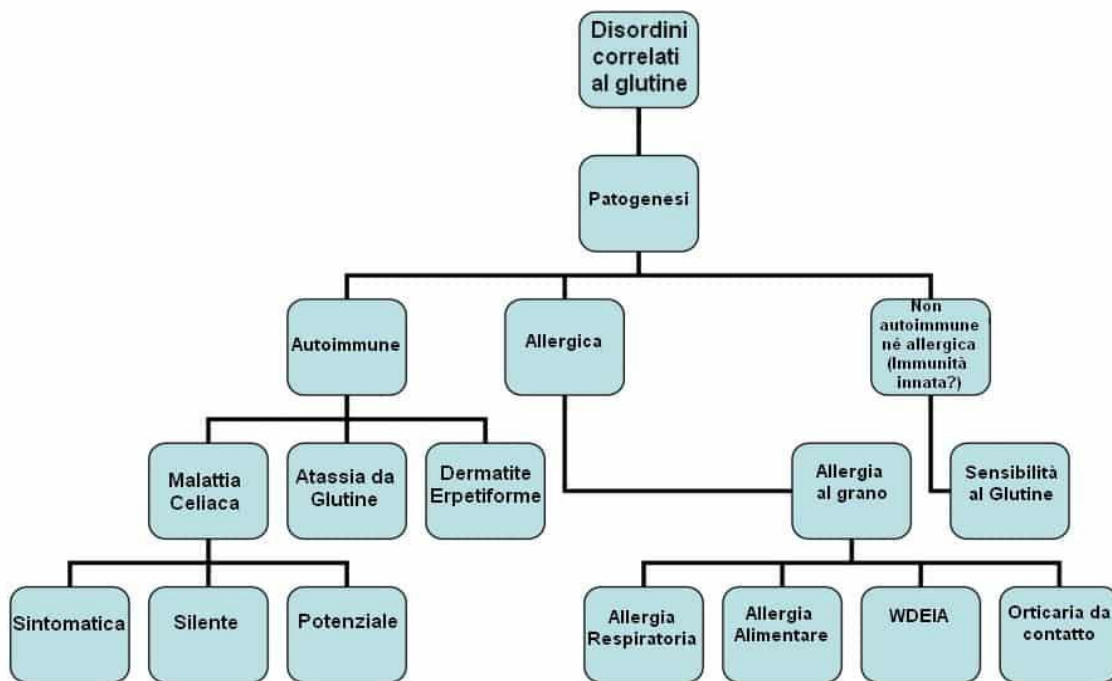


Figura 1. Nomenclatura dei disturbi correlati al glutine.

2.1. Reazioni di ipersensibilità

Il danno d'organo osservato nelle condizioni sopra menzionate è il risultato di reazioni patologiche di ipersensibilità, tradizionalmente suddivise in quattro categorie, ciascuna caratterizzata da specifici meccanismi immunologici, descritti di seguito:

- **Reazione di Tipo I (ipersensibilità immediata):** mediata dalle IgE, è tipicamente coinvolta nelle reazioni allergiche. Si attiva rapidamente, entro pochi minuti, determinando il rilascio di sostanze vasoattive e spasmogene che alterano la funzione dei vasi sanguigni e della muscolatura liscia.
- **Reazione di Tipo II (citotossica mediata da anticorpi):** gli anticorpi si legano a specifici antigeni espressi sulla superficie cellulare o su altri componenti tissutali, causando danno cellulare. Questo meccanismo rende le cellule bersaglio suscettibili alla fagocitosi o alla lisi mediata dal complemento.

- **Reazione di Tipo III (mediata da immunocomplessi):** gli immunocomplessi si formano durante la risposta anticorpale, e la loro patogenicità dipende in parte dalle dimensioni. L'attivazione del complemento porta alla produzione di anafilotossine (C3a, C4a, C5a), che inducono degranulazione mastocitaria e aumento della permeabilità vascolare. Gli immunocomplessi più grandi tendono a depositarsi sulla membrana basale dei vasi, dove l'azione dei neutrofili e il rilascio di enzimi litici provocano danni tissutali.
- **Reazione di Tipo IV (ipersensibilità ritardata mediata da cellule):** coinvolge principalmente i linfociti T, in particolare i T Helper 1, e i macrofagi. Questi ultimi, dopo aver fagocitato e processato l'antigene, lo presentano ai linfociti T-Helper, attivandoli attraverso le citochine. L'aggregazione di macrofagi e linfociti nel sito della reazione può portare alla formazione di granulomi, caratteristici di alcune risposte immunitarie croniche.

2.1.1. Allergia al grano

L'allergia al grano è una forma di allergia alimentare classica scatenata dall'ingestione di grano, non limitata al solo glutine, e mediata da reazioni di ipersensibilità di tipo I e IV. Un ruolo centrale in questa condizione è svolto dalle immunoglobuline IgE, responsabili di una sintomatologia che può includere eruzioni cutanee, prurito, gonfiore, difficoltà respiratorie e, nei casi più gravi, shock anafilattico [2].

Il frumento, appartenente alla famiglia delle Poaceae, è ricco di proteine allergeniche, suddivise in quattro categorie in base al solvente utilizzato per la loro estrazione. Questa classificazione, introdotta dal chimico americano T.B. Osborne nel XIX secolo, distingue tra albumine (solubili in acqua), globuline (estratte con soluzioni saline diluite), gliadine (solubili in miscele di acqua e alcool) e glutenine (estratte con acidi diluiti).

Le gliadine si suddividono ulteriormente in α/β -gliadine (a mobilità rapida), γ -gliadine (intermedie) e ω -gliadine (a mobilità lenta). Tra queste, la omega-5-gliadina è particolarmente rilevante poiché associata alla forma più grave di allergia al grano, nota come "anafilassi grano-dipendente".

Le glutenine, invece, si distinguono in due gruppi principali: quelle ad alto peso molecolare (HMW) e quelle a basso peso molecolare (LMW), classificate attraverso tecniche di elettroforesi [3]. Complessivamente, gliadine e glutenine costituiscono circa l'85% delle proteine del frumento e vengono comunemente indicate come glutine o prolamine, per il loro elevato contenuto di prolina [4].

Numerosi studi hanno evidenziato che molti individui allergici al grano mostrano sensibilizzazione verso le α , β , γ e/o ω -globuline, nonché verso le glutenine HMW. Inoltre, alcuni allergeni come gli inibitori dell' α -amilasi e le proteine di trasferimento lipidico (LTPs) possono indurre reazioni crociate con allergeni presenti nel polline delle graminacee, data l'appartenenza del frumento alla famiglia delle Poaceae.

Il quadro clinico dell'allergia al grano è molto variabile e può manifestarsi con sintomi lievi, come irritazioni cutanee, oppure con disturbi più gravi, tra cui difficoltà respiratorie. I sintomi più comuni comprendono eruzioni cutanee, prurito, gonfiore, nausea, affaticamento e dispnea. Questa forma di allergia è piuttosto frequente nei bambini, con sintomi cutanei, gastrointestinali o, nei casi più gravi, anafilassi grano-dipendente legata alla omega-5-gliadina. Tuttavia, nella maggior parte dei casi tende a risolversi spontaneamente entro i 10-12 anni. Anche gli adulti possono sviluppare allergia al grano, spesso con manifestazioni gastrointestinali dovute alle proteine del glutine o con episodi di anafilassi grano-dipendente indotti dall'attività fisica, anch'essi correlati alla omega-5-gliadina.

L'esposizione agli allergeni del grano può indurre una risposta immunitaria caratterizzata dalla produzione di anticorpi IgE, responsabili della reazione allergica, oppure dall'attivazione dei linfociti T, che è implicata nei meccanismi dell'intolleranza al glutine.

2.1.2. Celiachia

La celiachia è una patologia autoimmune cronica e multiorgano che colpisce l'intestino tenue nei soggetti geneticamente predisposti, scatenandosi in seguito all'assunzione di glutine [5]. Storicamente, era conosciuta con diversi nomi, tra cui Sprue Celiaca, Enteropatia sensibile al glutine e Sprue non tropicale.

Negli ultimi decenni, si è registrato un incremento significativo della sua prevalenza, sebbene numerosi casi rimangano ancora non diagnosticati. La celiachia può insorgere a qualsiasi età, con oltre il 70% delle nuove diagnosi che riguardano persone di età superiore ai 20 anni [6]. Nei Paesi occidentali, la sua prevalenza è stimata intorno allo 0,6% nei casi confermati istologicamente e all'1% negli screening sierologici della popolazione generale. Il rapporto tra i sessi varia tra 1:3 e 1,5:1 a sfavore delle donne.

Dal punto di vista clinico, la forma classica si manifesta con sintomi tipici del malassorbimento, come diarrea, steatorrea, perdita di peso e, nei bambini, deficit della crescita. Tuttavia, la celiachia può presentarsi con una gamma di manifestazioni molto ampia, tra cui anemia, disturbi addominali vaghi (spesso confusi con la sindrome dell'intestino irritabile), esofagite da reflusso o eosinofila, neuropatie, atassia, alterazioni dell'umore, bassa statura, osteomalacia e osteoporosi, aumento delle transaminasi epatiche, complicanze della gravidanza e, in alcuni casi, linfoma.

Nel 2011, la classificazione di Oslo ha suddiviso la celiachia in cinque principali fenotipi clinici: classica, non classica, subclinica, potenziale e refrattaria.

Celiachia classica

Questa forma, che rappresenta circa il 40% delle diagnosi, è caratterizzata da sintomi tipici del malassorbimento, come dimagrimento e diarrea. Nei bambini, si associa spesso a ritardo della crescita e bassa statura. La sindrome da malassorbimento può includere anemia sideropenica, steatorrea, ipocolesterolemia, carenza di vitamina K con tendenza alle ecchimosi, deficit di vitamina D e calcio con conseguente osteoporosi. L'espressione clinica varia in base a diversi fattori, tra cui il tempo trascorso tra l'insorgenza dei sintomi e la diagnosi, la quantità di glutine assunta con la dieta e la sensibilità individuale al glutine.

Celiachia non classica

In passato definita "atipica", oggi è la forma più comune. In questi casi, il paziente non presenta segni evidenti di malassorbimento, ma sintomi gastrointestinali sfumati, spesso sovrapponibili a quelli della sindrome del colon irritabile. Possono inoltre comparire manifestazioni extra-intestinali, come affaticamento, amenorrea, infertilità o menopausa precoce, disturbi dell'umore, sviluppo di altre malattie autoimmuni (ad esempio, la tiroidite autoimmune, che interessa circa il 25% dei celiaci, in prevalenza donne), osteoporosi precoce, alterazioni dello smalto dentale, neuropatie e atassia cerebellare sporadica.

Celiachia asintomatica (silente)

Questa forma è caratterizzata dalla positività degli anticorpi sierologici e dalla presenza di lesioni istologiche a livello intestinale, in assenza di sintomi evidenti. Spesso viene diagnosticata in soggetti sottoposti a screening familiare. Sebbene il termine "silente" possa sembrare improprio, un'anamnesi approfondita può rivelare la presenza di sintomi lievi, inizialmente non riconosciuti dal paziente. In ogni caso, dopo l'adozione di una dieta priva di glutine, si osserva un miglioramento clinico.

Celiachia latente/potenziale

Con questi termini, spesso usati come sinonimi, si descrive una condizione in cui il paziente presenta anticorpi sierici specifici positivi, ma senza alterazioni istologiche della mucosa intestinale.

Celiachia refrattaria (RCD)

Questa forma si caratterizza per la persistenza o la ricomparsa di sintomi di malassorbimento (diarrea, perdita di peso) nonostante almeno 12 mesi di rigorosa dieta priva di glutine, in pazienti con diagnosi confermata. L'atrofia dei villi intestinali persiste all'esame istologico del duodeno. Si distinguono due sottotipi: il tipo 1, caratterizzato da un aumento di linfociti intraepiteliali aberranti ma policlonali, e il tipo 2, in cui i linfociti presentano una proliferazione monoclonale. La distribuzione dei diversi fenotipi clinici della celiachia è illustrata nella Figura 2.

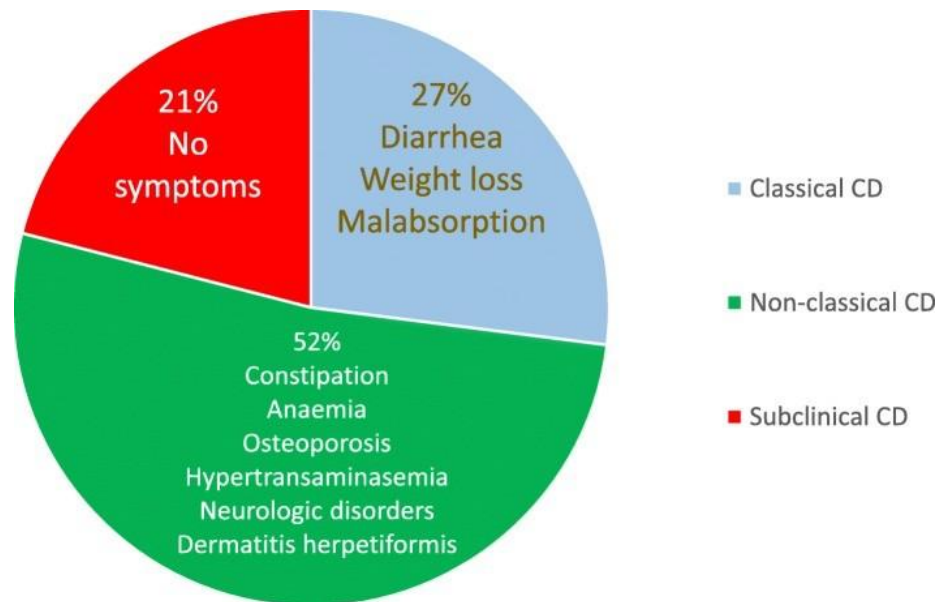


Figura 2. Prevalenza dei fenotipi clinici della CD.

Perché la celiachia si manifesti, è necessaria la concomitanza di due fattori imprescindibili: l'esposizione al glutine e una predisposizione genetica.

Sul piano genetico, alcune varianti specifiche dell'HLA di classe II predispongono allo sviluppo della malattia. In particolare, gli allotipi HLA DQ2 (DQA10501-DQB10201) e HLA DQ8 (DQA10301-DQB10302) hanno un elevato valore predittivo negativo: la loro assenza permette di escludere la celiachia con una probabilità del 99%.

Come molte altre malattie autoimmuni, la celiachia ha una forte componente ereditaria. Il rischio di svilupparla è significativamente maggiore tra i familiari di primo grado, con una probabilità compresa tra il 5% e il 10%, e più basso nei parenti di secondo grado. È inoltre più frequente nei pazienti con altre patologie autoimmuni, diabete mellito di tipo 1, sindrome di Down e altre condizioni associate [7]. Studi sui gemelli monozigoti hanno evidenziato un tasso di concordanza superiore rispetto ai dizigotici, attestandosi tra il 75% e l'80%. Tra gli eterodimeri HLA di classe II, DQ2 e DQ8 rivestono un ruolo chiave nella trasmissione ereditaria della malattia. Inoltre, l'omozigosi per HLA-DQ2 è associata a un rischio maggiore (stimato tra il 25% e il 30%) di sviluppare una celiachia a insorgenza precoce nei neonati con un familiare di primo grado affetto [8]. Oltre alla risposta immunitaria adattativa innescata dal glutine, recenti ricerche suggeriscono il coinvolgimento di meccanismi immunitari innati nella patogenesi della malattia. In particolare, è stato dimostrato che la risposta innata può rappresentare un passaggio preliminare all'attivazione dell'immunità adattativa. Un ruolo chiave è svolto dal peptide α -gliadina p31-43, ritenuto responsabile dell'attivazione dell'immunità innata e potenzialmente in grado di causare un danno diretto alla mucosa intestinale. Inoltre, i soggetti celiaci presentano un aumento significativo di linfociti T e plasmacellule a livello intestinale.

Le plasmacellule secernenti IgA sono particolarmente abbondanti: la loro presenza è 2,4 volte superiore rispetto ai soggetti sani e costituiscono il 66% delle cellule secernenti anticorpi. Si osserva anche un incremento delle IgM (28%) e delle IgG (6%). Nel contesto della malattia celiaca, le transglutaminasi tissutali (tTG) svolgono un ruolo fondamentale catalizzando la deaminazione della gliadina. Questo processo genera epitopi con una maggiore affinità di

legame per le molecole HLA-DQ2 e DQ8 espresse dalle cellule presentanti l'antigene, innescando così una risposta immunitaria adattativa contro sia le tTG che la gliadina. Contemporaneamente, l'attivazione della risposta innata provoca alterazioni istologiche a livello dell'intestino tenue, tra cui atrofia reversibile dei villi nella parte superiore del digiuno, iperplasia delle cripte e un'elevata linfocitosi intraepiteliale [9]. La diagnosi della celiachia inizia generalmente con test sierologici, che rappresentano uno strumento di screening non invasivo. Tali esami sono indicati in presenza di sintomi quali diarrea cronica (con o senza malassorbimento), gonfiore o disturbi addominali inspiegabili (simili alla sindrome dell'intestino irritabile, IBS), alterazioni ematochimiche suggestive di malassorbimento (come anemia sideropenica, carenza di folati, ipovitaminosi D e osteoporosi) e in soggetti affetti da patologie autoimmuni associate (ad esempio, tiroidite autoimmune e diabete mellito di tipo 1) o sindromi genetiche come la sindrome di Down. I test sierologici più affidabili per la diagnosi della celiachia sono gli anticorpi di classe IgA, in particolare:

- anticorpi anti-gliadina (AGA IgA),
- anticorpi anti-transglutaminasi (anti-tTG IgA),
- anticorpi anti-endomisio (EMA IgA).

Più recentemente, sono stati introdotti gli anticorpi diretti contro i peptidi deaminati della gliadina (anti-DGP IgA), che mostrano una sensibilità e specificità superiori rispetto ai classici AGA IgA. Al contrario, gli anticorpi di classe IgG (AGA IgG, anti-tTG IgG, EMA IgG e anti-DGP IgG) risultano meno sensibili e specifici. Tra tutti i test sierologici, la misurazione degli EMA IgA rappresenta il metodo con la massima specificità (prossima al 100%), anche se la sua sensibilità è inferiore rispetto agli anti-tTG IgA e agli AGA IgA. L'individuazione degli EMA avviene mediante immunofluorescenza indiretta su sezioni di esofago di scimmia. Questo

metodo, pur avendo un'elevata specificità e una buona sensibilità, presenta lo svantaggio di essere operatore-dipendente. Nel dettaglio, la reazione immunofluorescente prevede che la sezione tissutale venga colorata con un cromogeno, il quale, in presenza dell'anticorpo, si lega all'antigene presente nella sezione stessa. Successivamente, vengono applicati fluorocromi, che emettono fluorescenza quando eccitati da una determinata lunghezza d'onda di luce. Attraverso il microscopio a fluorescenza è possibile visualizzare il complesso antigene-anticorpo. Il segnale tipico di positività per gli EMA ha un aspetto reticolare o a "nido d'ape", poiché l'endomysio circonda le fibre muscolari e può presentare o meno questi anticorpi. Tuttavia, nei tessuti negativi, si può osservare una fluorescenza debole, il cui riconoscimento può variare tra operatori, rendendo l'interpretazione del test soggettiva. Nei soggetti con deficit di IgA, gli anticorpi di classe IgA (AGA IgA, anti-tTG IgA, EMA IgA e anti-DGP IgA) risultano assenti o non elevati. In questi casi, è necessario effettuare test sierologici basati sugli anticorpi di classe IgG [10]. Dal punto di vista laboratoristico, si parla di deficit di IgA quando i livelli sierici risultano inferiori a 10 mg/dL, indipendentemente dal valore di riferimento adottato per la popolazione generale.

2.1.3. Dermatite Erpetiforme

La dermatite erpetiforme è un'inflammazione cutanea di origine autoimmune, scatenata dall'ingestione di glutine. Sebbene in passato fosse considerata una manifestazione cutanea della celiachia, oggi è riconosciuta come una patologia distinta. Tuttavia, condivide con la celiachia alcuni elementi chiave, tra cui la predisposizione genetica legata agli alleli HLA DQ2/DQ8 e la remissione clinica in seguito alla completa e permanente esclusione del glutine dalla dieta [11]. La maggior parte dei pazienti affetti da dermatite erpetiforme presenta anche alterazioni tipiche della celiachia a livello dell'intestino tenue, come l'atrofia dei villi, un aumento dei linfociti intraepiteliali e la presenza di autoanticorpi diretti contro la

transglutaminasi tissutale (tTG). Dal punto di vista clinico, la malattia si manifesta con lesioni cutanee di varia natura, tra cui papule, vescicole e piccole bolle, che tendono a distribuirsi simmetricamente in aree specifiche del corpo, come le estremità di braccia e gambe, i gomiti, la regione sacrale e i glutei (Figura 3).



Figura 3. *Presentazione clinica della dermatite erpetiforme (DH): papule e vescicole eritematose raggruppate associate a escoriazioni e croste sul dorso (A), sulla regione sacrale e sui glutei (B). Raramente, la DH può interessare anche l'inguine e il pube (freccia) (C).*

Il prurito intenso e la comparsa di eritema rappresentano sintomi comuni nella dermatite erpetiforme. Oltre alle manifestazioni cutanee, i pazienti possono presentare segni tipici della celiachia, tra cui anemia, diarrea, perdita di peso, meteorismo e, nei casi più gravi, atrofia gastrica e atassia. Nei bambini, la patologia può essere associata a un ritardo nella crescita, bassa statura e stomatite erosiva. La diagnosi si basa su una valutazione approfondita dell'anamnesi, sull'esame obiettivo e sulla conferma istologica mediante biopsia cutanea, utile per rilevare la presenza di depositi di IgA nella pelle. Inoltre, viene eseguito il test per la celiachia per determinare un'eventuale coesistenza della malattia. Si stima che il 5-10% dei pazienti con dermatite erpetiforme abbia un parente di primo grado affetto dalla stessa condizione o dalla celiachia [12], suggerendo un ruolo significativo dei fattori genetici nella patogenesi. Studi precedenti hanno evidenziato un'associazione tra la malattia e specifiche molecole HLA di

classe I e II, tra cui HLA A1, B8, DR3 e DPB1 [13]. L'associazione più rilevante è con HLA-DQ2 (costituito dagli alleli *DQA10501* e *DQB102*) e HLA-DQ8 (*DQA103* e *DQB10302*), presenti rispettivamente nell'85% e nel 15% dei pazienti [14].

2.1.4. Atassia da Glutine

L'atassia cerebellare da glutine è una forma di atassia cerebellare legata alla sensibilità al glutine in soggetti geneticamente predisposti. La patologia colpisce prevalentemente le donne tra i 40 e i 50 anni e si manifesta con un decorso cronico o insidioso, spesso accompagnato da neuropatia assonale sensomotrice, mioclono focale e tremore palatale [15]. La causa principale è un processo autoimmune che provoca danni alle cellule di Purkinje nel cervelletto. La maggior parte dei pazienti con atassia da glutine ha una diagnosi pregressa di celiachia o sensibilità al glutine non celiaca (NCGS), spesso associata a sintomi gastrointestinali [16]. Un possibile fattore che contribuisce allo sviluppo della malattia è il malassorbimento della vitamina E, con conseguente degenerazione spinocerebellare [17]. Inoltre, il malassorbimento potrebbe influire negativamente sui neuroni serotoninergici del cervelletto e del tronco encefalico. Anche i processi infiammatori e immunologici sembrano avere un ruolo nell'eziologia della malattia. Secondo Hadjivassiliou et al., l'atassia da glutine rappresenta circa il 15% di tutte le forme di atassia e il 40% delle atassie cerebellari sporadiche idiopatiche [18]. La sintomatologia è simile a quella di altre atassie e include anomalie oculari come il nistagmo (84%), disartria (66%), difficoltà nei movimenti degli arti superiori (75%), atassia motoria agli arti inferiori (90%) e andatura instabile (100%). Possono manifestarsi anche altre alterazioni del movimento, come mioclono (contrazioni muscolari involontarie), corea (movimenti rapidi e involontari), tremore palatale e mioclono opsoclonico [18]. L'andatura instabile è spesso accompagnata da neuropatia periferica. In alcuni casi rari, la progressione della patologia può essere rapida e somigliare alla degenerazione cerebellare paraneoplastica [19]. La diagnosi si basa su un insieme di valutazioni,

tra cui la risonanza magnetica cerebrale, l'esame neurologico e il dosaggio degli anticorpi anti-gliadina e anti-transglutaminasi. Studi di imaging hanno evidenziato una moderata atrofia cerebellare in circa il 60% dei pazienti con atassia da glutine [20]. Inoltre, gli autoanticorpi diretti contro la transglutaminasi 6 (TG6) sono considerati un biomarcatore utile per l'identificazione della patologia. La dieta priva di glutine si è dimostrata efficace nel migliorare i sintomi. L'atassia da glutine è frequentemente associata ad altre malattie autoimmuni, tra cui la tiroidite autoimmune, il diabete mellito di tipo 1 e l'anemia perniciosa [21]. Il trattamento principale consiste nell'eliminazione del glutine dalla dieta, affiancata in alcuni casi da terapie immunomodulanti. Studi recenti suggeriscono che l'immunoterapia, inclusa la somministrazione di steroidi e immunoglobuline endovenose (IVIG), possa offrire benefici ai pazienti affetti da questa patologia [22]. Tali strategie terapeutiche sono finalizzate a rallentare o arrestare la progressione della malattia.

2.2. Non-Celiac Gluten Sensitivity

2.2.1. Definizione

La sensibilità al glutine non celiaca (NCGS) è una sindrome caratterizzata dalla comparsa di sintomi intestinali ed extraintestinali in seguito all'ingestione di alimenti contenenti glutine, in soggetti che non presentano celiachia o allergia al grano [23]. A differenza di queste condizioni, tuttavia, la NCGS non provoca alterazioni specifiche a livello intestinale né comporta un'aumentata sensibilità alle proteine del glutine. Attualmente, non è stata identificata una chiara base genetica per questa condizione. Le evidenze disponibili indicano che gli allotipi HLA-DQ2 e/o HLA-DQ8, associati alla predisposizione alla celiachia, non svolgono alcun ruolo nello sviluppo della NCGS. Inoltre, alcuni studi suggeriscono che altri componenti del grano, distinti dal glutine, come i FODMAP e gli inibitori dell'amilasi e della tripsina (ATI), possano

contribuire alla manifestazione di sintomi sia intestinali che extraintestinali in alcuni pazienti con NCGS [24].

2.2.2. Epidemiologia

La reale prevalenza della NCGS rimane ancora sconosciuta in molte parti del mondo, principalmente a causa della recente identificazione di questa condizione e della mancanza di strumenti diagnostici affidabili. La maggior parte degli studi si è basata su indagini trasversali per stimare la diffusione della NCGS, utilizzando criteri di auto-riferimento, come la percezione di reazioni avverse al glutine, l'assenza di diagnosi di celiachia o allergia al grano e l'adozione spontanea di una dieta priva di glutine [25]. Tuttavia, questi approcci non si avvalgono di test diagnostici oggettivi, limitandone l'affidabilità. Le discrepanze nei risultati degli studi possono essere attribuite alla diversità degli strumenti utilizzati per la raccolta dati (ad esempio, questionari), alla variabilità della popolazione esaminata e ai differenti metodi impiegati nelle ricerche (Tabella 1). È fondamentale definire criteri diagnostici standardizzati e uniformare i parametri di auto-riferimento per una migliore identificazione dei casi di NCGS. Inoltre, fattori socioeconomici, abitudini alimentari e aspetti culturali possono influenzare la prevalenza della condizione. Alcuni studi riconosciuti dalla comunità scientifica hanno evidenziato una possibile correlazione tra il consumo di grano e la diffusione dei disturbi legati al glutine, sebbene non sia stata ancora dimostrata una relazione diretta. Le analisi statistiche disponibili indicano che la prevalenza della NCGS varia tra lo 0,49% e il 14,9%, superando la maggior parte delle stime relative alla celiachia o all'allergia al grano [26]. Un esempio significativo proviene dall'Australia, dove la NCGS è stata riscontrata nel 14,9% della popolazione adulta. Tuttavia, i criteri e gli strumenti impiegati per questa stima differivano da quelli adottati in America Latina [27]. Questo evidenzia la necessità di stabilire un unico parametro di riferimento per definire la

condizione e individuare i possibili casi di NCGS basandosi su un approccio standardizzato di auto-riferimento.

In Tabella 1 è indicata la prevalenza della NCGS in accordo ai diversi studi riportati in letteratura.

<i>Studio Paese</i>	<i>Impostazioni</i>	<i>Approccio</i>	<i>Criteri per definire NCGS</i>	<i>Numero partecipanti</i>	<i>Esito</i>
<i>Aziz et al., 2013</i> <i>Regno Unito</i>	A livello di popolazione	Questionario autosomministrato	- Assenza di SRPD di CD, Reazioni avverse al frumento almeno una volta alla settimana - Sintomi correlati alla NCGS.	1002	13%
<i>Volta et al., 2014</i> <i>Italia</i>		Questionario e test diagnostici oggettivi	- Esclusione di CD e WA mediante test analitici, - Valutazioni cliniche in regime di GFD e dopo un challenge al glutine.	12,255	3,19%
<i>Ontiveros et al., 2015</i> <i>Messico</i>	A livello di popolazione	Questionario autosomministrato	- Reazioni avverse al grano/glutine, - Assenza di SRPD di CD e WA, - WA negativa auto - riferita, - Aderenza a una GFD.	1238	0,97%
<i>Cabrera-Chávez et al., 2016</i> <i>Colombia</i>	A livello di popolazione	Questionario autosomministrato	- Reazioni avverse al grano/glutine, - Assenza di SRPD di CD e WA, - WA negativa auto - riferita, - Aderenza a una GFD.	1207	4,50%
<i>Cabrera-Chávez et al., 2017</i> <i>Argentina</i>	A livello di popolazione	Questionario autosomministrato	- Reazioni avverse al grano/glutine, - Assenza di SRPD di CD e WA, - WA negativa auto - riferita, - aderenza a una GFD.	1209	6.28%
<i>Carroccio et al., 2017</i> <i>Italia</i>	Studenti scuola superiore	Questionario autosomministrato	Reazioni avverse al frumento almeno una volta alla settimana	555	12.20%
<i>Potter et al., 2018</i> <i>Australia</i>	Partecipanti in follow-up da un'indagine precedente	Questionario autosomministrato	- Reazioni avverse agli alimenti a base di grano, - Assenza di SRPD di CD, IBS e cancro del colon.	3542	14.90%

<i>Ontiveros et al., 2018</i> <i>El Salvador</i>	A livello di popolazione	Questionario autosomministrato	• Reazioni avverse al grano/glutine, • Assenza di SRPD di CD e WA, • WA negativa auto - riferita, • Aderenza a una GFD.	1326	0.98%
<i>Potter et al., 2020</i> <i>Australia</i>	Partecipanti in follow-up da un'indagine precedente	Questionario autosomministrato	• Reazioni avverse agli alimenti a base di grano, • Assenza di SRPD di CD, IBS e cancro del colon.	1322	13.90%
<i>Arámburo-Gálvez et al., 2020</i> <i>Brasile</i>	A livello di popolazione	Questionario autosomministrato	• Reazioni avverse al grano/glutine, • Assenza di SRPD di CD e WA, • WA negativa auto – riferita.	1654	1.71%
<i>Araya et al., 2020</i> <i>Cile</i>	A livello di popolazione	Questionario autosomministrato	• Reazioni avverse al grano/glutine, • Assenza di SRPD di CD e WA, • WA negativa auto – riferita.	1203	0.49%
<i>Ontiveros et al., 2021</i> <i>Paraguay</i>	Sondaggio online	Questionario autosomministrato	• Reazioni avverse al grano/glutine, • Assenza di SRPD di CD e WA, • WA negativa auto – riferita.	1058	5.19%

Tabella 1. Prevalenza di NCGS in accordo ai diversi studi riportati in letteratura.

CD: celiachia, GFD: dieta senza glutine, NCGS: sensibilità al glutine non celiaca, SRPD: autodiagnosi medica, WA: allergia al grano.

2.2.3. Fattori di rischio

I fattori di rischio associati alla NCGS non sono ancora completamente noti e rappresentano un campo di studio in continua evoluzione. Oltre al glutine, tra i possibili elementi responsabili dei sintomi della NCGS vi sono gli inibitori dell'amilasi e della tripsina (ATI) e i FODMAP (Fermentable Oligosaccharides, Disaccharides, Monosaccharides, And Polyols), che possono agire singolarmente o in combinazione [28].

Gli ATI sono proteine presenti nei semi di diversi cereali, tra cui grano, orzo, segale, mais, miglio e riso. In particolare, nell'albumina del grano si trovano in quantità elevate e svolgono un ruolo naturale di difesa contro parassiti e patogeni. Queste proteine risultano resistenti alla digestione

da parte delle proteasi intestinali e, nei soggetti con CD o NCGS, possono stimolare il sistema immunitario innato attraverso l'attivazione del recettore Toll-like 4 [29]. Tale meccanismo può innescare una risposta infiammatoria nella mucosa intestinale, coinvolgendo cellule immunitarie come macrofagi, monociti e cellule dendritiche.

Gli ATI, inoltre, interferiscono con la digestione degli alimenti poiché inibiscono l'attività di due enzimi fondamentali: l' α -amilasi, coinvolta nella degradazione degli amidi, e la tripsina, responsabile della scomposizione delle proteine. Se questa inibizione fosse rilevante, si potrebbe ipotizzare che la ridotta attività delle amilasi comprometta la digestione degli amidi, favorendo il passaggio di frammenti di carboidrati nel colon, dove subiscono fermentazione, causando gonfiore e disturbi addominali nei soggetti predisposti. Analogamente, l'inibizione delle proteasi potrebbe ostacolare la corretta digestione delle proteine, aumentando il loro potenziale allergenico. Anche se il ruolo degli ATI nella NCGS non è ancora del tutto chiarito, si ritiene che la loro capacità di attivare specifici recettori di membrana possa contribuire alla risposta immunitaria innata [30]. Un altro fattore coinvolto nei disturbi gastrointestinali associati alla NCGS è rappresentato dai FODMAP, una categoria di carboidrati a catena corta, tra cui lattosio e fruttosio. Alimenti particolarmente ricchi di questi zuccheri possono scatenare sintomi gastrointestinali poiché i FODMAP non vengono adeguatamente assorbiti a livello intestinale. La loro permanenza nel lume intestinale provoca un effetto osmotico che richiama acqua, determinando diarrea e altri disturbi digestivi. Uno studio condotto da Skodje et al. ha evidenziato che 59 pazienti con NCGS hanno manifestato un peggioramento significativo dei sintomi dopo l'assunzione di fruttani, rispetto a una challenge con glutine o con placebo [31]. Inoltre, molti pazienti hanno riportato un miglioramento della sintomatologia dopo aver seguito una dieta a basso contenuto di FODMAP. Per questo motivo, si consiglia un follow-up dopo 4-6 settimane di regime alimentare a ridotto apporto di FODMAP, al fine di valutare l'andamento

dei sintomi e, se necessario, reintrodurre gradualmente alimenti ad alto contenuto di questi carboidrati [32].

2.2.4. Patogenesi

Sebbene la patogenesi della NCGS non sia ancora del tutto chiarita, le evidenze disponibili suggeriscono un coinvolgimento predominante del sistema immunitario innato. Studi hanno riportato un'aumentata espressione del recettore Toll-like-2 e una ridotta espressione del fattore marcatore delle cellule T regolatorie forkhead box P3 (FOXP3) nelle biopsie intestinali di pazienti con NCGS, rispetto sia ai soggetti sani che a quelli affetti da celiachia [33]. Numerose ricerche indicano che i pazienti con NCGS presentano alterazioni intestinali, con l'infiammazione che sembra giocare un ruolo chiave nella patogenesi della condizione. È stato riscontrato un aumento di specifiche popolazioni cellulari, come eosinofili, cellule T CD3+ e cellule CD45+ nella lamina propria, sia a livello duodenale che rettale [34]. Sebbene l'architettura della mucosa intestinale nei pazienti con NCGS non sia compromessa come nella celiachia, è stata osservata un'elevata presenza di linfociti intraepiteliali (IEL) [35]. Inoltre, un incremento dei mastociti nel duodeno è stato associato a sintomi come dolore addominale e gonfiore [36]. Un altro aspetto rilevante nella patogenesi della NCGS riguarda la disfunzione della barriera intestinale. Secondo uno studio di Uhde et al., i pazienti con NCGS mostrano livelli sierici elevati di CD14 solubile [37], una proteina che lega il lipopolisaccaride (LPS), insieme a una maggiore reattività anticorpale verso prodotti microbici come LPS e flagellina. Questi biomarcatori sono stati correlati con livelli aumentati di proteina intestinale legante gli acidi grassi (FABP2), indicativa di danno intestinale. Si ipotizza che la traslocazione di prodotti microbici attraverso una barriera intestinale compromessa possa contribuire all'attivazione sia del sistema immunitario innato che di quello adattativo, scatenando una risposta immunitaria sistemica [37]. Ulteriori dati confermano una compromissione della funzione di barriera nei

pazienti con NCGS: la resistenza elettrica transepiteliale nei loro campioni intestinali risulta inferiore rispetto a quella dei pazienti celiaci in remissione. Inoltre, la disbiosi intestinale è stata frequentemente riportata nei pazienti con NCGS e, secondo alcuni autori, potrebbe essere un fattore chiave nella compromissione della barriera intestinale [38].

Le cellule epiteliali, le cellule dendritiche, i linfociti intraepiteliali e le cellule Natural Killer (NK) rappresentano componenti fondamentali della risposta immunitaria innata a livello intestinale. L'interazione tra queste cellule della lamina propria è regolata da un complesso network di citochine e chemochine. In conclusione, le evidenze scientifiche suggeriscono che la NCGS sia caratterizzata da un insieme di alterazioni intestinali, tra cui infiammazione, disbiosi e compromissione della barriera intestinale, che facilitano la traslocazione di prodotti microbici e alimentari, contribuendo all'attivazione delle risposte immunitarie innata e adattativa.

2.2.5. Diagnosi

Attualmente, non sono disponibili biomarcatori affidabili e specifici per la diagnosi della sensibilità al glutine non celiaca (NCGS) [24]. Di conseguenza, la diagnosi viene formulata per esclusione, dopo aver scartato la celiachia e l'allergia al grano, e attraverso la valutazione clinica del paziente mediante una challenge al glutine, eseguita in doppio o singolo cieco con controllo placebo. I criteri definiti dalla Commissione di Salerno forniscono un protocollo standardizzato per la diagnosi della NCGS. Questo approccio prevede che il paziente segua una dieta priva di glutine per almeno sei settimane, seguita da un test del glutine con metodologia crossover in doppio cieco, che consiste in un periodo di esposizione al glutine e uno al placebo, entrambi della durata di una settimana. Nella pratica clinica, può essere adottata anche una challenge in singolo cieco con controllo placebo [22]. Durante l'esecuzione del test, si raccomanda di

somministrare il glutine attraverso alimenti di consumo comune anziché sotto forma di capsule, poiché la presenza di amilasi-tripsina inibitori (ATI) e FODMAP nei cereali può interferire con i risultati del test in doppio cieco [39]. Inoltre, è stato osservato che quasi due terzi dei pazienti con sintomi simili alla sindrome dell'intestino irritabile (IBS) sperimentano un effetto nocebo dopo la fase di eliminazione del glutine. Questo fenomeno si manifesta in soggetti particolarmente suggestionabili, che sviluppano sintomi per timore della loro insorgenza. La diagnosi della NCGS è resa ulteriormente complessa dalla sovrapposizione dei sintomi con quelli della sindrome dell'intestino irritabile, della malattia di Crohn e della malattia da reflusso gastroesofageo (GRD), che possono includere gonfiore addominale, dolore e diarrea. Inoltre, l'approccio diagnostico risulta difficoltoso nella pratica clinica, poiché molti pazienti si auto-diagnosticano la condizione ed evitano spontaneamente il glutine, rifiutando di reintrodurlo per eseguire la challenge. La Task Force della Società Tedesca di Allergologia e Immunologia Clinica ha evidenziato le criticità dell'attuale iter diagnostico per la NCGS, sottolineando la mancanza di criteri validati, la diffusa auto-diagnosi e auto-trattamento con una dieta priva di glutine, la difficoltà nel determinare con certezza il ruolo del glutine come fattore scatenante e la presenza di numerose variabili che complicano la valutazione clinica [40]. Nonostante tali limitazioni, i criteri di Salerno si sono dimostrati utili per l'identificazione della NCGS, specialmente nei pazienti che si auto-diagnosticano la condizione. Secondo Skodje et al. (2017), l'applicazione di questi criteri ha permesso di formulare la diagnosi con una sensibilità inferiore rispetto alla valutazione clinica tradizionale (63% contro 85%) [41]. Inoltre, i criteri hanno confermato una correlazione diretta tra l'ingestione di glutine e l'insorgenza dei sintomi nel 40% dei pazienti con auto-diagnosi di NCGS. La già citata sovrapposizione sintomatologica con altre patologie gastrointestinali rende il percorso diagnostico ancora più complesso. A tal proposito, sono stati descritti casi clinici di pazienti con NCGS associata a malattie infiammatorie croniche intestinali. Un caso riportato da Vojdani e Perlmutter riguarda una donna di 49 anni

precedentemente diagnosticata con sindrome dell'intestino irritabile, che lamentava dolore addominale, costipazione, reflusso e cefalea. Le ipotesi diagnostiche includevano disturbi autoimmuni, alterazioni ormonali tiroidee e infezione da *Helicobacter pylori* [42]. La paziente ha mostrato un miglioramento temporaneo con la somministrazione di corticosteroidi, inizialmente confondendo il quadro clinico. Solo in seguito, attraverso una dieta priva di glutine, è stata confermata la diagnosi di NCGS, sebbene la complessità della sintomatologia non escludesse una possibile coesistenza con altre condizioni. Un altro caso documentato riguarda un paziente con NCGS sovrapposta alla malattia di Crohn.

Il soggetto, con una forma refrattaria della malattia da 14 anni, presentava livelli elevati di anticorpi IgG contro la gliadina nativa (AGA), suggerendo una possibile sensibilità al glutine. L'adozione di una dieta senza glutine ha determinato la risoluzione della diarrea e un aumento di peso. È interessante notare che i pazienti con NCGS hanno il doppio delle probabilità di risultare positivi agli AGA rispetto alla popolazione generale [43].

2.2.6. Trattamento

La dieta priva di glutine (GFD) rappresenta il trattamento raccomandato per i pazienti con sensibilità al glutine non celiaca (NCGS). Tuttavia, non è ancora stato stabilito se, a differenza della celiachia, tale regime alimentare debba essere seguito in modo permanente. Uno studio condotto da Carroccio et al. ha evidenziato che, dopo otto anni dalla diagnosi, il 74% dei pazienti con NCGS continuava a seguire una dieta priva di glutine e che la reintroduzione del glutine era ancora in grado di scatenare sintomi [44]. Nonostante la GFD possa contribuire ad alleviare i sintomi della NCGS, la sua adozione presenta alcune criticità. Questo regime alimentare è stato associato a un aumento del consumo di grassi saturi, lipidi, zuccheri e calorie, oltre che a una ridotta assunzione di micronutrienti essenziali, come ferro, folati e zinco [45]. Inoltre, è stato osservato che i pazienti con NCGS in GFD tendono a consumare più grassi saturi e quantità

inferiori di fibre e micronutrienti rispetto a coloro che seguono una dieta standard. Altri studi hanno evidenziato un ridotto apporto di fibre, proteine, carboidrati e acidi grassi polinsaturi nei pazienti con NCGS rispetto ai controlli sani. Oltre agli aspetti nutrizionali, la GFD comporta anche un onere economico significativo, poiché i prodotti senza glutine sono generalmente più costosi. Ricerche recenti suggeriscono che la soglia di tolleranza al glutine varia da paziente a paziente, rendendo necessaria una valutazione clinica per determinare se sia indispensabile seguire una GFD rigorosa [46]. Alcuni autori propongono di effettuare una rechallenge al glutine dopo 1-2 anni di dieta per stabilire la quantità di glutine che il paziente può tollerare senza sviluppare sintomi [47]. Sebbene la GFD contribuisca in modo significativo alla riduzione dei sintomi, vi sono pazienti che, nonostante il rispetto rigoroso della dieta per anni, continuano a manifestare disturbi [48].

Un'alternativa alla GFD potrebbe essere rappresentata da una dieta a basso contenuto di FODMAP, la quale si è dimostrata efficace nel ridurre i sintomi nei pazienti con NCGS. Tuttavia, questa strategia dietetica deve essere adottata con cautela, poiché è stata associata a un ridotto apporto di antiossidanti naturali e micronutrienti. Per questo motivo, si raccomanda di valutare un'eventuale integrazione con prebiotici e vitamine [49], oltre a garantire un attento monitoraggio da parte di un professionista esperto per assicurare un adeguato bilancio nutrizionale.

3. Biologia delle cellule Natural Killer e Geni KIR

Le cellule Natural Killer (NK) sono fondamentali per la difesa dell'organismo contro le infezioni, grazie alla loro capacità di eliminare le cellule bersaglio senza necessitare del riconoscimento di un antigene specifico o di una precedente attivazione. Questa caratteristica le rende un componente essenziale dell'immunità innata. Nel sangue periferico, le cellule NK rappresentano circa il 15% del totale dei linfociti e possono essere identificate attraverso la

presenza degli antigeni di superficie CD56 (NKH-1, Leu-19) e CD16 (Fc R III), mentre sono prive del co-recettore CD3. Il CD56, una variante della molecola di adesione cellulare neuronale (NCAM), gioca un ruolo chiave nell'interazione delle cellule NK con i loro bersagli, mentre il CD16, un recettore a bassa affinità per la porzione Fc delle immunoglobuline G, è coinvolto nella citotossicità mediata dagli anticorpi [50]. Le cellule NK si suddividono in due sottogruppi principali in base all'intensità di espressione degli antigeni CD56 e CD16. Il sottotipo più abbondante, le cellule CD56^{dim}, costituisce circa il 90% del totale e si distingue per una bassa espressione di CD56 e un'elevata espressione di CD16. Queste cellule svolgono prevalentemente una funzione citotossica. Al contrario, le cellule CD56^{bright}, che rappresentano circa il 10% del totale, esprimono il CD56 in modo marcato ma presentano una scarsa o assente espressione del CD16. La loro funzione principale è la secrezione di citochine. Le cellule NK possiedono inoltre recettori per l'interleuchina 2 (IL-2), un fattore di crescita essenziale per il sistema immunitario. L'IL-2 favorisce la proliferazione delle cellule CD56^{bright} e potenzia l'attività citotossica delle CD56^{dim}, contribuendo così a modulare la risposta immunitaria.

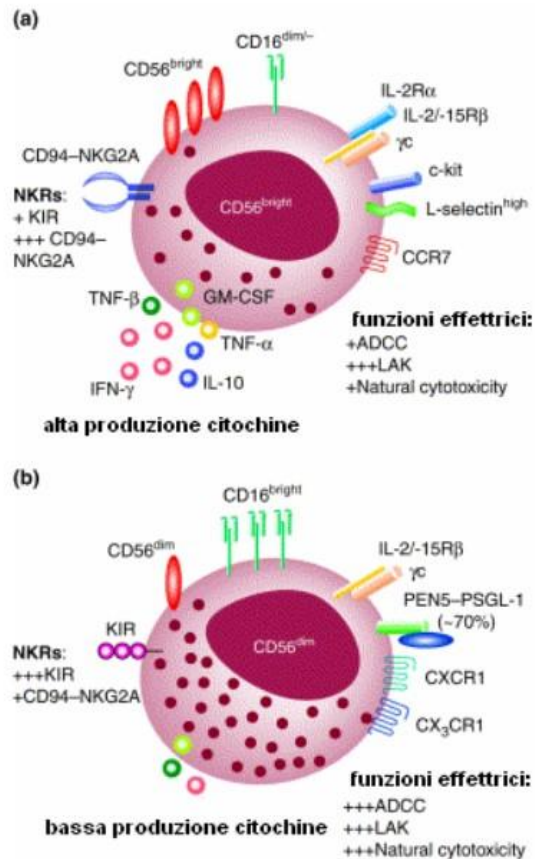


Figura 4. (a) cellula NK CD56^{bright}, (b) cellula NK CD56^{dim}

3.1 Origine e Differenziamento

Le cellule Natural Killer (NK) sono una componente essenziale del sistema immunitario, specializzata nella distruzione di cellule tumorali e di cellule infettate da virus. La loro maturazione inizia a partire da precursori cellulari identificati come CD34⁺/Lin⁻/Flt3⁺/c-kit⁺, che si sviluppano all'interno del midollo osseo. Il microambiente midollare svolge un ruolo determinante nel processo di maturazione delle cellule NK, fornendo fattori di crescita essenziali come FL e KL, che favoriscono la transizione del progenitore iniziale verso uno stadio intermedio. L'interleuchina 15 (IL-15) è invece cruciale per il completamento della maturazione, portando alla formazione di cellule NK CD56^{bright} completamente funzionali. L'origine delle

cellule NK CD56^{dim} non è ancora stata completamente chiarita, ma si ipotizza che possano derivare dalla popolazione CD56^{bright}. Una volta completato lo sviluppo nel midollo osseo, la maggior parte delle cellule NK entra nella circolazione sanguigna o si localizza nella milza, mentre solo una minima percentuale si trova nel timo e nei linfonodi [51].

3.2 Ruolo fisiologico

Le cellule NK partecipano a tre principali meccanismi di risposta nell'ambito dell'immunità innata:

1. **Citotossicità:** Le cellule NK eliminano le cellule infette da virus o quelle tumorali attraverso recettori di membrana o mediante il processo di citotossicità anticorpo-mediata (ADCC), che coinvolge anticorpi diretti contro le cellule bersaglio.
2. **Secrezione di citochine:** Le cellule NK rilasciano citochine che svolgono un ruolo fondamentale nella risposta infiammatoria, nell'attivazione dell'immunità adattativa e nella regolazione dell'emopoiesi.
3. **Proliferazione:** Le cellule NK, sia nel sottotipo CD56^{bright} che in quello CD56^{dim}, sono in grado di proliferare per rispondere a segnali infettivi o tumorali, aumentando la loro capacità di attivare la risposta immunitaria.

3.3 Attività citotossica

L'attività citotossica delle cellule NK è regolata dal bilanciamento tra recettori inibitori e attivatori sulla loro superficie, nonché dalla presenza di molecole di adesione e co-stimolatorie. Esistono diversi meccanismi attraverso i quali le cellule NK distruggono le cellule bersaglio: le cellule NK immature fanno affidamento sul TRAIL (tumor necrosis-related apoptosis-inducing ligand), mentre quelle mature preferiscono utilizzare le vie di granulo-esocitosi, mediata da granzima e perforina, o il sistema Fas-Fas ligand [52,53,54]. Un'altra modalità di attivazione

della citotossicità è quella anticorpo-mediata (ADCC), che coinvolge il recettore CD16. In ogni caso, il risultato finale di questi meccanismi è l'induzione dell'apoptosi della cellula bersaglio.

3.4 Produzione di citochine

Le cellule NK svolgono un ruolo cruciale nel collegare la risposta immunitaria innata a quella adattativa, grazie alla secrezione di citochine. La produzione di interferone-gamma (IFN- γ) da parte delle cellule NK favorisce la polarizzazione dei linfociti verso una risposta Th1, stimola l'attivazione e la maturazione delle cellule dendritiche, e esercita effetti antivirali e antiproliferativi sulle cellule trasformate (Figura 5). Inoltre, le cellule NK rilasciano il tumor necrosis factor (TNF- α), che potenzia la produzione di IFN- γ , e il granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), che stimola la proliferazione e la capacità fagocitica delle cellule. A differenza dei linfociti T e B, l'attivazione delle cellule NK non richiede necessariamente fattori di costimolazione, riflettendo così la loro funzione precoce e aspecifica. Le cellule NK CD56bright sono capaci di proliferare in risposta a basse concentrazioni di IL-2 o IL-15 in vitro, mentre le cellule CD56dim necessitano di stimoli più intensi per avviare la proliferazione.

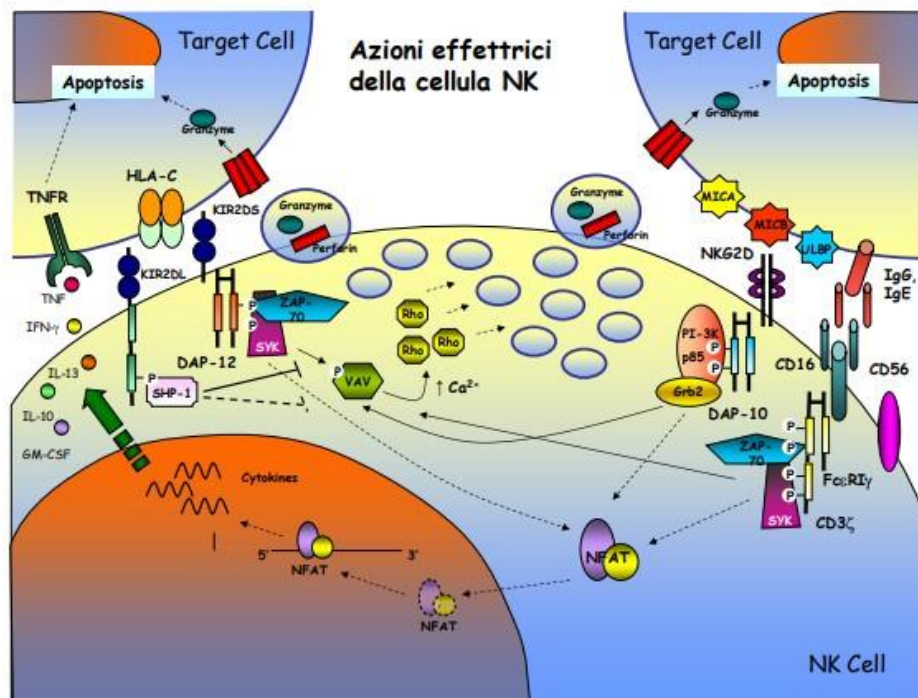


Figura 5. Azioni effettrici delle cellule NK.

3.5 Recettori delle cellule NK

Le cellule NK possiedono un ampio repertorio di recettori, che possono essere classificati in attivatori e inibitori in base all'effetto che esercitano sulla loro capacità citotossica. Questi recettori si suddividono in due principali categorie: i recettori "Killer-cell Immunoglobulin-like receptors" (KIR) e quelli eterodimerici con domini lectinici di tipo "C" sulla membrana cellulare, come il CD94/NKG2 e Ly49. Tali recettori si legano alle molecole MHC di classe I, che sono espresse in modo costitutivo su molte cellule del nostro organismo, incluse le classiche HLA-A, -B e -C, e le non classiche HLA-E, -G ed -F, sebbene con differenti livelli di espressione. La grande variabilità degli allotipi KIR, che potrebbero creare un continuum da una forte inibizione a una forte attivazione, suggerisce un ruolo complesso di KIR in diverse patologie. In pratica, alcuni profili genotipici KIR possono offrire protezione contro una malattia, ma allo stesso tempo predisporre a svilupparne un'altra non correlata [55,56]. Nel

1990, Ljunggren e Karre [57] mostrarono, attraverso un modello tumorale in vivo e in vitro, che la perdita dell'antigene self MHC di classe I sulla cellula bersaglio attiva le cellule NK. Fondamentalmente, le cellule NK riconoscono la cellula target attraverso l'interazione dei loro recettori, attivatori e inibitori, con i ligandi presenti sulla superficie della cellula bersaglio, e l'integrazione dei segnali trasmessi porta all'attivazione o all'inibizione della loro attività citotossica (Figura 6).

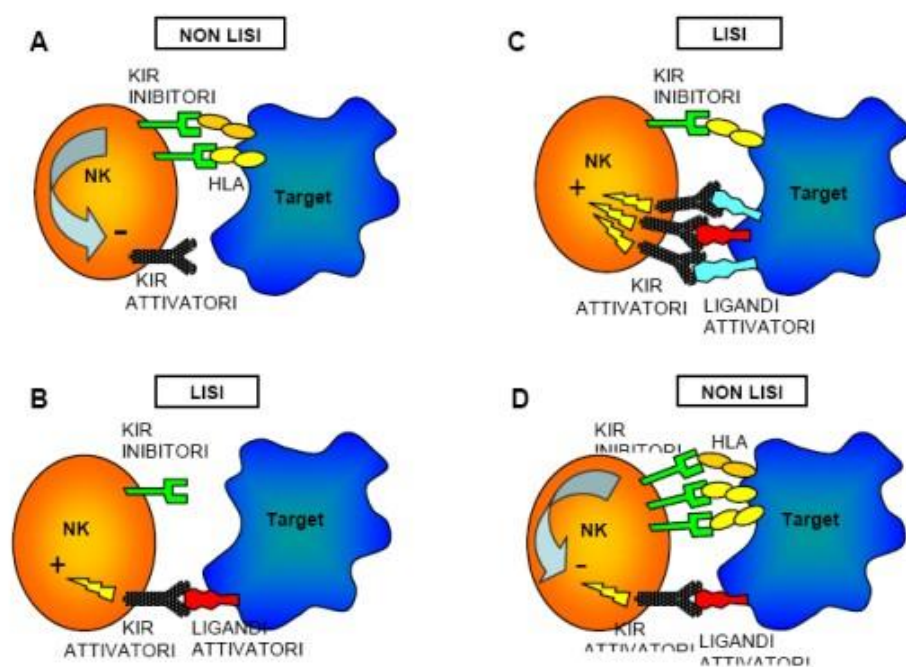


Figura 6. Regolazione dell'attività delle cellule NK attraverso i recettori KIR di tipo attivatorio e di tipo inibitorio.

I KIR inibitori riconoscono come ligandi le molecole MHC di classe I (HLA) sulla superficie delle cellule e trasmettono un segnale di inibizione dell'attività citolitica delle cellule NK. I KIR attivatori in seguito al riconoscimento dei propri ligandi, mediano un segnale attivatorio che innesca l'azione citolitica delle cellule NK.

A) Quando i recettori inibitori legano gli HLA, in assenza dell'interazione tra il recettore attivatorio e il proprio ligando, è generato un netto segnale negativo che blocca l'azione citolitica contro la cellula bersaglio. B) Al contrario, l'impegno del recettore attivatorio in assenza dell'interazione tra i KIR inibitori e i propri ligandi genera un netto segnale d'attivazione che innesca la lisi della cellula bersaglio. C) In questo caso, le interazioni tra ligandi

e KIR attivatori predominano sulla debole interazione tra ligando e KIR inibitore con il netto risultato dell'attivazione della cellula NK e la lisi della cellula target.

3.6 Geni KIR

A seguito dell'aumento dell'interesse per il ruolo dei geni KIR nella funzione delle cellule NK, la Commissione per la nomenclatura del Sistema HLA ha istituito una sottocommissione durante il 13° Workshop di Immunogenetica a Seattle nel 2002. L'obiettivo principale di questa iniziativa era quello di sviluppare una nomenclatura universale, condivisa e riconosciuta dalla comunità scientifica per il Sistema KIR. Ad oggi, sono stati identificati circa 17 geni KIR, e sono stati creati due sistemi per l'assegnazione dei nomi. Il sistema più comunemente utilizzato si basa sulla struttura proteica, e prevede quattro categorie principali, determinate da due caratteristiche: il numero di domini extracellulari (2D o 3D) e le peculiarità del dominio citoplasmatico.

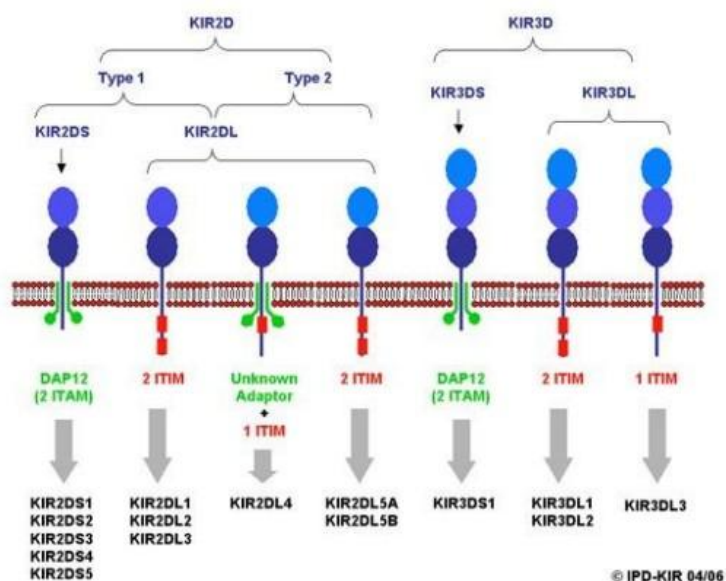


Figura 7. Struttura delle proteine KIR.

I geni KIR sono anche classificati secondo la nomenclatura CD, che si basa sull'ordine centrotelomerico dei geni sul cromosoma 19. Tuttavia, questa classificazione non tiene conto della struttura, della funzione, dell'espressione o della localizzazione dei recettori. In generale, i recettori attivatori presentano un dominio citoplasmatico corto, che contiene un motivo attivatorio basato su tirosina (ITAM), e sono contrassegnati con la lettera S (corto). Al contrario, i recettori inibitori possiedono un dominio citoplasmatico lungo, che termina con un motivo inibitorio basato su tirosina (ITIM), e sono contrassegnati con la lettera L (lungo). L'unico recettore che può trasmettere sia segnali di attivazione che inibitori è il KIR2DL4.

3.7 Struttura del gene

I geni KIR sono composti da 9 esoni (Figura 8), che presentano una straordinaria omologia nucleotidica superiore al 98%. Gli esoni 1 e 2 sono responsabili della codifica della regione coinvolta nel riconoscimento del peptide. I domini extracellulari D0, D1 e D2 sono codificati rispettivamente dagli esoni 3, 4 e 5, mentre l'esone 6 ha una funzione strutturale. L'esone 7 codifica per la regione transmembrana, e infine, gli esoni 8 e 9 sono coinvolti nella codifica della porzione intracellulare. I geni con due domini (2D) sono tutti funzionali, e la loro struttura è composta dagli esoni 1, 2, 4 e 9. Una mutazione nell'esone 3 può impedire la trascrizione del dominio D0 della proteina di superficie. Ogni cellula NK presenta almeno un gene con due domini. Nei geni KIR con due domini, come KIR2DL4, KIR2DL5A e KIR2DL5B, la codifica degli esoni avviene dagli esoni 1 al 3 e dai 5 ai 9, mentre l'esone 4 è assente, impedendo la formazione del dominio D1. Negli pseudogeni KIR2DP1, l'esone 3 non è codificato, causando un codone di stop sul 4° esone. Nel caso di KIR3DP1, si verifica una delezione del 2° esone [58,59].

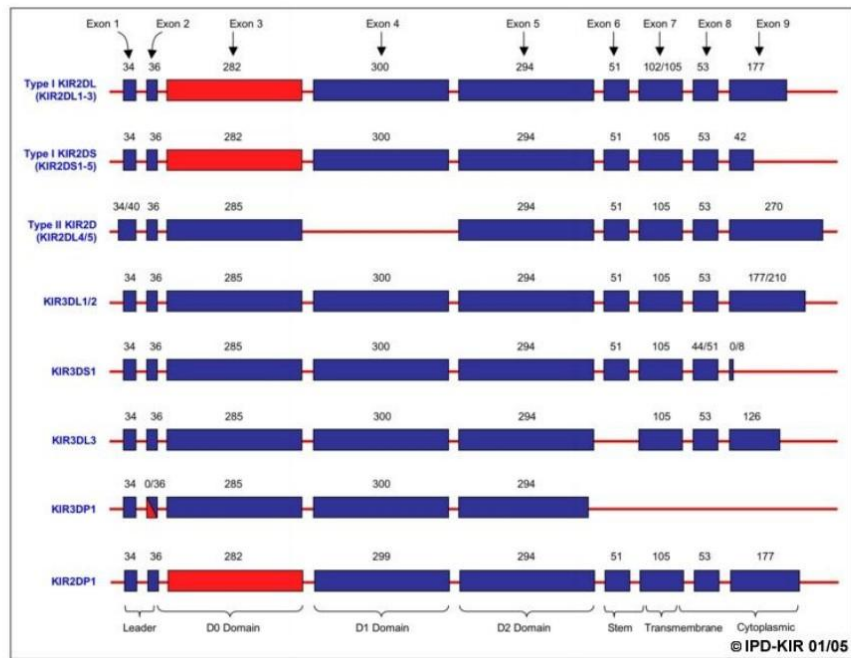


Figura 8. Struttura del gene KIR.

3.8 Aplotipi

Diversi studi hanno evidenziato l'esistenza di due principali gruppi di aplotipi, definiti aplotipo A e aplotipo B (Figura 9). L'aplotipo A è generalmente associato ai geni KIR3DL3, 2DL3, 2DL1, 2DL4, 3DL1, 2DS4 e 3DL2. Inoltre, presenta un solo gene KIR attivatore, ovvero KIR2DS4. L'aplotipo A può essere ulteriormente suddiviso in due sotto-tipi: aplotipo A-1D, che si riscontra nel 38% della popolazione caucasica, e aplotipo A2DS4, presente nell'11,8%. La scoperta dell'aplotipo A-1D è particolarmente interessante, poiché indica che l'aplotipo più comune nella popolazione caucasica non possiede recettori KIR attivatori funzionali, ad eccezione del gene centrale KIR2DL4, che può mediare segnali sia attivatori che inibitori. Al contrario, l'aplotipo B mostra una maggiore variabilità ed è caratterizzato dalla presenza di più di un gene KIR attivatore.

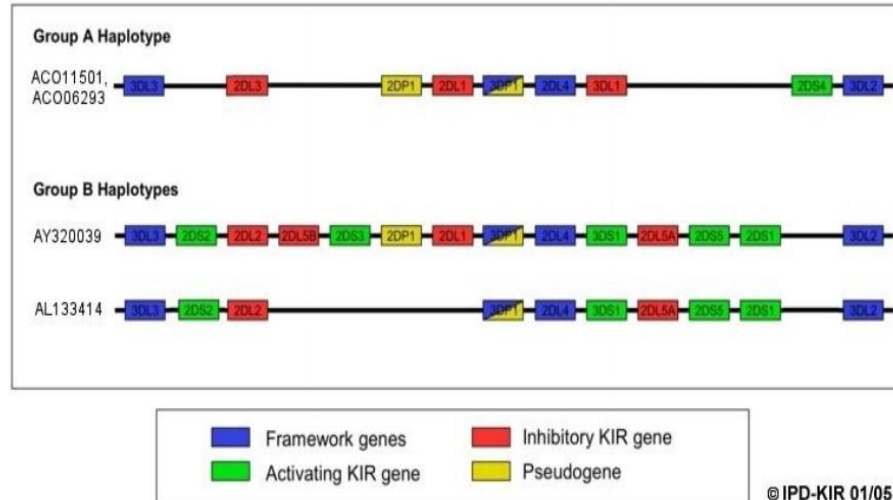


Figura 9. Struttura aplotipo A e B.

Nel contesto dei geni KIR, esistono alcuni geni definiti "geni di struttura", come KIR2DL4, KIR3DP1, KIR3DL2 e KIR3DL3, che sono presenti in entrambi gli aplotipi. L'aplotipo B è caratterizzato da un numero variabile di geni, che va da 9 a 12, e comprende una maggiore varietà di sottotipi rispetto all'aplotipo A (Figura 10). Attualmente sono noti oltre 100 profili genotipici, alcuni dei quali sono più comuni in specifiche popolazioni, mentre altri sono più rari o addirittura unici. La frequenza degli aplotipi A e B è simile nella popolazione caucasica, ma gli aplotipi B mostrano una maggiore variabilità nei sottotipi, dovuta alla diversità del loro contenuto genetico [58].

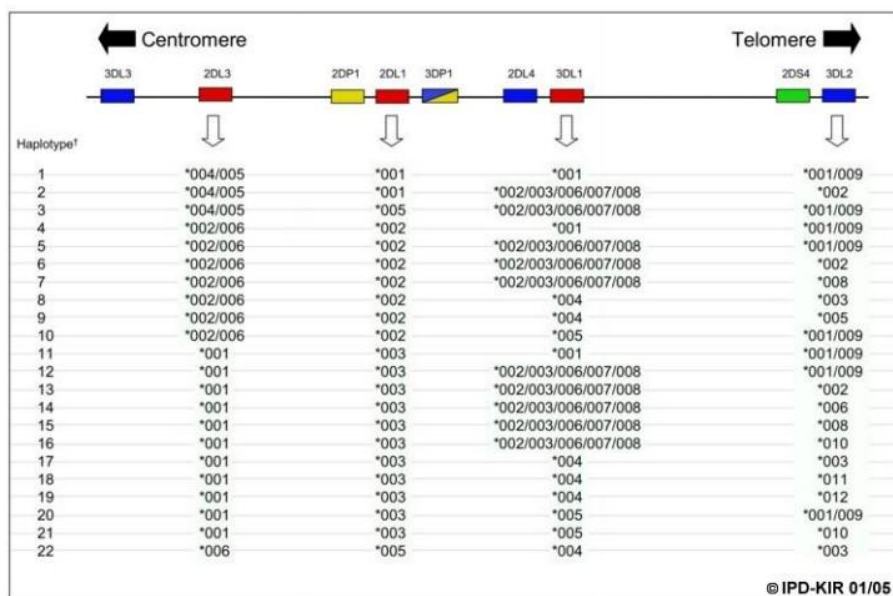


Figura 10. Varianti alleliche dell'aplotipo A (da Shilling et al, 2002).

L'analisi dei profili genetici di individui non correlati ha fornito informazioni significative sui legami tra i geni KIR, evidenziando l'esistenza di disequilibri di linkage sia positivi che negativi tra alcuni geni presenti negli aplotipi B. Ad esempio, se un individuo possiede il gene KIR2DS1, generalmente non avrà il gene KIR2DS4, e viceversa. In modo simile, l'assenza del gene KIR3DS1 è sempre associata alla presenza del gene KIR3DL1. Sono stati inoltre riscontrati disequilibri di linkage positivi, come nel caso in cui la presenza del gene KIR2DL1 sia frequentemente accompagnata dalla presenza del pseudogene KIR2DP1. Complessivamente, il sistema KIR mostra un certo grado di polimorfismo nella sua composizione genetica. A differenza del sistema HLA, dove il polimorfismo è concentrato sul 2° esone per la classe II e sui 2°, 3° e 4° esoni per la classe I, nel sistema KIR il polimorfismo allelico è distribuito su tutti gli esoni. Alcuni geni presentano peculiarità specifiche: per esempio, si ritiene che i geni KIR2DS4 e KIR2DS1 possano essere varianti dello stesso locus, mentre i geni KIR3DL1 e KIR3DS1 potrebbero derivare da un crossing-over tra un gene ancestrale non inibitore e un gene

ancestrale KIR3DL1. Un'eccezione a questa tendenza è rappresentata dal gene KIR2DL4, che ha un dominio citoplasmatico lungo ma possiede un solo recettore per le tirosinchinasi, e svolge sia funzioni inibitorie che attivatorie.

4. Obiettivi dello studio

La NCGS (Sensibilità al Glutine Non Celiaca) è una condizione caratterizzata da sintomi gastrointestinali ed extraintestinali scatenati dall'ingestione di glutine, ma in assenza di celiachia (CD) e allergia al grano. Nonostante l'interesse crescente per la NCGS, la sua patogenesi resta ancora poco chiara. Alcuni studi suggeriscono che componenti del grano diversi dal glutine, come gli ATI, possano essere responsabili dell'insorgenza dei sintomi. Per questo motivo, è stato proposto il termine "sensibilità al grano non celiaca" (NCWS) come definizione più appropriata. La patogenesi della NCGS potrebbe coinvolgere meccanismi diversi, tra cui l'immunità innata o adattativa, una digestione incompleta o un assorbimento anomalo di oligosaccaridi, disaccaridi, monosaccaridi e polioli, oltre a fattori psicologici. Sebbene la NCGS condivida alcune caratteristiche cliniche con la celiachia, non sono ancora disponibili dati sui geni che potrebbero predisporre geneticamente alla malattia. A differenza della celiachia, i pazienti con NCGS non presentano un genotipo o fenotipo HLA specifico, anche se gli alleli HLA DQ2/DQ8 sono presenti nel 40-50% dei pazienti, una percentuale superiore rispetto alla popolazione generale (30%). Numerosi studi hanno sottolineato l'importanza dell'immunità innata e delle cellule NK nella patogenesi della NCGS. I recettori KIR regolano l'attivazione delle cellule NK tramite la loro interazione con HLA, e entrambi i loci KIR e HLA sono altamente polimorfici. Nel caso dei KIR, sono stati identificati due principali aplotipi: A e B. L'aplotipo A, più semplice, si associa principalmente con l'inibizione delle cellule NK, mentre l'aplotipo B, con un numero variabile di geni, attiva maggiormente le cellule NK. Studi hanno dimostrato che gli aplotipi

con una predominanza di geni attivatori possono conferire protezione contro infezioni virali, ma anche una maggiore suscettibilità a malattie autoimmuni e neoplastiche. Nella celiachia, le cellule NK sono fondamentali per l'immunità innata, contribuendo alla distruzione delle cellule epiteliali, e la loro attività citotossica dipende fortemente dal funzionamento dei KIR. La nostra ipotesi è che le varianti genetiche dei KIR, che definiscono gli aplotipi "inibitori" o "attivatori", possano influenzare anche lo sviluppo e il decorso della NCGS. Gli obiettivi di questa tesi di laurea sono: 1) identificare possibili varianti genetiche KIR nei pazienti con NCGS rispetto a un gruppo di controllo di donatori di sangue; 2) valutare la possibile associazione tra queste varianti genetiche KIR e specifiche manifestazioni cliniche nei pazienti con NCGS.

5. Materiali e metodi

5.1. Pazienti

Abbiamo condotto uno studio retrospettivo caso-controllo che ha coinvolto 40 pazienti con diagnosi confermata di NCGS e 32 soggetti sani, donatori di sangue. La diagnosi di NCGS è stata effettuata attraverso una DBPC wheat challenge tra gennaio 2010 e giugno 2022, in tre centri terziari specializzati in "disturbi correlati al glutine" (Dipartimento di Medicina Interna, Ospedale Universitario di Palermo, Italia; Dipartimento di Medicina Interna, Ospedale "Cervello" di Palermo, Italia; Dipartimento di Medicina Interna, Ospedale di Sciacca, Agrigento, Italia).

I pazienti con NCGS sono stati selezionati in base ai seguenti criteri di inclusione:

- Età superiore ai 18 anni;
- Origine caucasica;
- Cartella clinica completa.

I criteri di esclusione per i pazienti con NCGS erano i seguenti:

- Età superiore ai 65 anni;
- Abuso di alcol e/o droghe;
- Cartelle cliniche incomplete;
- Gravidanza;
- Diagnosi di malattia infiammatoria cronica intestinale o altre patologie organiche che colpiscono l'apparato digerente, malattie neurologiche, disturbi psichiatrici maggiori, malattie infettive, deficit immunologici e condizioni che limitano l'attività fisica.

5.2. Analisi genetica dei KIR

5.2.1 Estrazione del DNA genomico

Tutti i pazienti inclusi nello studio sono stati sottoposti a prelievo di sangue, dal quale è stato estratto il DNA genomico utilizzando il MagNA Pure 24 Total Nucleic Acid Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germania) con l'ausilio dell'estrattore automatico MagNA Pure 96 system. Il processo di isolamento del DNA impiega particelle magnetiche e reagenti specifici. In presenza di isopropanolo e sali caotropici a pH superiore a 7.0, il DNA si lega alla superficie di silicio delle particelle magnetiche (MPGs - Magnetic Glass Particles). L'isopropanolo e i sali caotropici rimuovono l'acqua dalle molecole di DNA, mentre altre sostanze come polisaccaridi e proteine non aderiscono alle particelle e vengono eliminate durante i lavaggi. Dopo che il DNA si è legato alle particelle, esso viene separato dal resto della soluzione tramite un magnete e successivamente eluato in un ambiente con bassa concentrazione salina e a temperatura elevata (70°C).

A partire da 200 µl di sangue intero, è stata estratta una quantità di DNA genomico variabile tra 100 e 400 ng/µl.

5.3.2 KIR SSO Genotyping test-Luminex®

La tipizzazione dei geni KIR è stata eseguita utilizzando il kit KIR SSO Genotyping Test (One Lambda, Inc. Canoga Park, CA, USA), che permette di identificare la presenza o l'assenza di diversi geni: 2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 3DS1, 2DP1 e 3DP1, incluse le varianti comuni di 2DL5, 2DS4 e 3DP1.

Il test KIR SSO si basa sull'uso di sonde oligonucleotidiche immobilizzate su microsfere per la genotipizzazione del DNA genomico amplificato. La procedura prevede una reazione di ibridazione DNA-DNA, seguita dall'analisi in flusso mediante l'analizzatore LABScan™ 100 (Luminex Corporation, Texas, USA) (Figura 11).

Il sistema comprende diversi componenti:

- una miscela pre-ottimizzata di microsfere con sonde covalentemente legate;
- tamponi per facilitare l'ibridazione del DNA target;
- un tampone di lavaggio per rimuovere il DNA non legato;
- tampone SAPE per diluire la soluzione stock SAPE;
- reagenti per l'amplificazione del DNA (primer loci-specifici pre-ottimizzati);
- D-mix per l'amplificazione ottimizzata.

Le microsfere sono marcate fluorescentemente e contengono sonde oligonucleotidiche specifiche per ciascun allele target. Ogni miscela di microsfere include sia una sonda di controllo negativa che una positiva, per eliminare i segnali di fondo non specifici e normalizzare i dati grezzi, compensando eventuali variazioni nella quantità di campione o nell'efficienza della reazione.

Il metodo si basa sulla tecnica di PCR-SSO reverse [60], in cui l'immobilizzazione degli oligonucleotidi avviene sulle microsfere anziché su una membrana. Il DNA bersaglio viene amplificato tramite PCR utilizzando primer specifici: il primer KIR-1 amplifica l'esone 3, il KIR-2 amplifica l'esone 5 e il primer KIR-3 amplifica gli esoni 7, 8 e 9.

Il prodotto amplificato viene denaturato e quindi incubato con la miscela di microsfere, ognuna delle quali è legata a un oligonucleotide specifico. Durante l'ibridizzazione, gli oligonucleotidi si legano alla sequenza complementare nel DNA amplificato. L'aggiunta di un complesso streptavidina-ficoeritrina (SAPE) consente di legare avidamente le microsfere che contengono l'oligonucleotide legato al filamento biotinilato dell'amplificato. Il segnale emesso dalle microsfere viene acquisito dal Luminex3D e rappresentato su una mappa che evidenzia le aree corrispondenti all'emissione di luce di ciascun set di microsfere nella miscela.

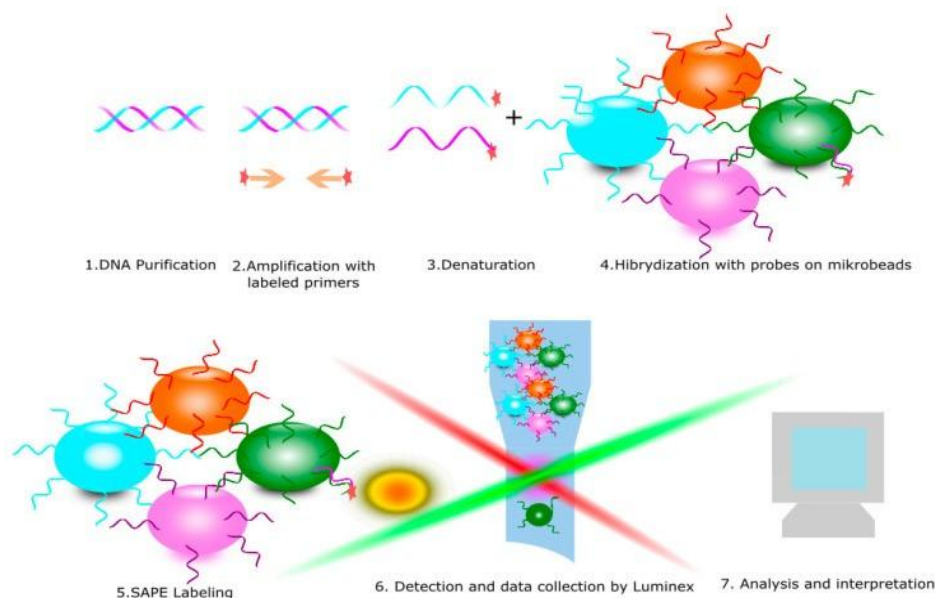


Figura 11. La reazione a catena della polimerasi sequenza-specifica di oligonucleotidi (PCR SSO) è un metodo diagnostico per la tipizzazione dei recettori KIR.

La PCR consiste nelle seguenti fasi: 1. Purificazione del DNA; 2. Amplificazione con primer specifici marcati, 3. Denaturazione per ottenere un singolo filamento di DNA; 4. Ibridazione con microsfere con sonde specifiche; 5. Lettura e raccolta dei dati. *Cells*. 2021 Jul; 10(7): 1777.

5.4 Analisi statistica

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il software GraphPad Prism (San Diego, CA, USA). Per confrontare le frequenze dei geni KIR e degli aplotipi tra i gruppi di caso e controllo, sono state applicate tabelle di contingenza (test χ^2), al fine di valutare le differenze statistiche tra i due gruppi. Inoltre, i dati sono stati sottoposti a un test di bontà dell'adattamento (goodness of fit) per verificare la congruenza tra i genotipi e gli aplotipi osservati e quelli previsti, nonché la conformità all'equilibrio di Hardy-Weinberg. Le associazioni di rischio sono state espresse in termini di odds ratio (OR) e intervalli di confidenza (95% CI). È stato stabilito un valore di $p = 0,05$ come soglia di significatività. Inoltre, è stato sviluppato un modello di regressione logistica per ottenere una versione semplificata e facilmente interpretabile, utile per la previsione dell'insorgenza. Per l'analisi di due variabili quantitative non parametriche, è stato applicato il test t di Student con correzione di Welch per dati non accoppiati.

6. Risultati

Nel nostro studio, abbiamo esaminato 40 pazienti caucasici (36 femmine e 4 maschi) con diagnosi confermata di NCGS, di età compresa tra i 18 e i 65 anni, provenienti dal centro per i "disturbi correlati al glutine" del Dipartimento di Medicina Interna dell'Ospedale Universitario Policlinico Paolo Giaccone di Palermo e dal Dipartimento di Medicina Interna dell'Ospedale "Cervello" di Palermo. Il gruppo di controllo è stato costituito da 32 soggetti sani (13 maschi e 19 femmine), con un'età variabile tra i 21 e i 63 anni, privi di malattie autoimmuni. Per indagare il possibile ruolo delle varianti genetiche dei KIR nella patogenesi della NCGS, abbiamo confrontato le frequenze di questi geni tra i due gruppi, come illustrato in Tabella 2. In particolare, per i geni KIR inibitori, abbiamo osservato una frequenza significativamente più

alta nei controlli sani rispetto ai pazienti con NCGS per i seguenti geni: KIR2DL1 (96,87% vs. 55%, $p = 0.0024$, OR = 25.36; 95% CI = 3.15 - 204.35), KIR2DL2 (65,62% vs. 32,5%, $p = 0.006$, OR = 3.95; 95% CI = 1.48 - 10.6), KIR2DL3 (81,25% vs. 22,5%, $p < 0.0001$, OR = 14.92; 95% CI = 4.69 - 47.47), KIR2DL5 (62,5% vs. 10%, $p < 0.0001$, OR = 15, 95% CI = 4.27 - 52.7). Questi risultati suggeriscono un possibile ruolo protettivo di questi geni nella suscettibilità alla malattia. Al contrario, i pazienti con NCGS hanno mostrato una frequenza allelica significativamente più alta del gene KIR3DL1 (75% vs. 46,87%, $p = 0.001$, OR = 3.4; 95% CI = 1.25 - 9.21), indicando un possibile ruolo di KIR3DL1 nella suscettibilità alla NCGS. Inoltre, sono emerse differenze significative anche per i geni KIR attivatori. Abbiamo riscontrato una maggiore frequenza di KIR2DS2 nei controlli sani rispetto ai pazienti con NCGS (65,62% vs. 10%, $p < 0.0001$, OR = 0.06; 95% CI = 0.01 - 0.20), KIR2DS3 (40,62% vs. 2,5%, $p = 0.0022$, OR = 0.04; 95% CI = 0.004 - 0.30), KIR2DS4 (87,5% vs. 15%, $p = 0.0001$, OR = 0.08; 95% CI = 0.025 - 0.29), KIR2DS5 (43,75% vs. 7,5%, $p = 0.001$, OR = 0.10; 95% CI = 0.02 - 0.40), e KIR3DS1 (43,75% vs. 20%, $p = 0.03$, OR = 0.32; 95% CI = 0.11 - 0.91). Non sono state rilevate differenze statisticamente significative per altri geni KIR.

	NCGS (n=40)		Controlli (n=32)			
Gene KIR	%	n	%	n	p	Odd Ratio (95% CI)
<i>Inibitori</i>						
2DL1	55	22	96.87	31	0.0024	25.36 (3.15 - 204.35)
2DL2	32.5	13	65.62	21	0.0061	3.95 (1.48 - 10.61)
2DL3	22.5	9	81.25	26	< 0.0001	14.92 (4.69 - 47.47)
2DL4	87.5	35	96.87	31	0.18	4.45 (0.49 - 40)
2DL5	10	4	62.5	20	< 0.0001	15 (4.27 - 52.7)
3DL1	75	30	46.87	15	0.016	3.4 (1.2544 - 9.2158)
3DL2	100	40	100	32	0.91	0.80 (0.015 - 41.55)
3DL3	85	34	100	32	0.09	12.2 (0.66 - 226.18)
<i>Attivatori</i>						
2DS1	50	20	50	16	1	1.0 (0.39 - 2.53)
2DS2	10	4	65.62	21	< 0.0001	0.06 (0.01 - 0.20)
2DS3	2.5	1	40.62	13	0.0022	0.04 (0.004 - 0.30)
2DS4	15	6	87.5	28	0.0001	0.08 (0.025 - 0.29)
2DS5	7.5	3	43.75	14	0.001	0.10 (0.02 - 0.40)
3DS1	20	8	43.75	14	0.03	0.32 (0.11 - 0.91)
<i>Pseudogeni</i>						
2DP1	97.5	39	96.87	31	0.87	1.25 (0.075 - 20.93)
3DP1	67.5	27	100	32	0.018	0.03 (0.001 - 0.55)

Tabella 2. Frequenze dei geni KIR nella popolazione di pazienti NCGS e donatori sani (controlli).

La distribuzione dei KIR nel nostro gruppo controllo è risultata in linea con le frequenze della popolazione italiana, come mostrato in Tabella 3.

	NCGS (n=40)	Controlli (n=32)	Studio Italiano^a
Gene KIR	%	%	%
2DL1	55	97	95
2DL2	32	66	53
2DL3	22	81	88
2DL4	87	97	100
2DL5	10	62	58
3DL1	75	47	96
3DL2	100	100	100
3DL3	85	100	100
2DS1	50	50	36
2DS2	10	66	53
2DS3	2	41	33
2DS4	15	87	92
2DS5	7	44	28
3DS1	20	44	36
2DP1	97	97	95
3DP1	67	100	100

Tabella 3. Confronto della frequenza dei geni KIR, tra gruppi caso-controllo e della popolazione italiana.

[a:Dati da Bontadini A et al.,2006].

Sulla base dei geni KIR, sono stati identificati due principali aplotipi. L'aplotipo A comprende un solo gene KIR attivante, il KIR2DS4, che si presenta come allele nullo nell'80% dei casi, insieme a 5 geni KIR inibitori (KIR2DL1, KIR2DL3, KIR3DL1, KIR3DL2 e KIR3DL3). L'aplotipo B, invece, è caratterizzato da un numero variabile di geni attivatori e inibitori (Parham, P 2005).

L'analisi descrittiva della nostra popolazione ha rivelato una differenza statisticamente significativa nella distribuzione degli aplotipi KIR, con una prevalenza dell'aplotipo B rispetto alle varianti A e AB nel gruppo NCGS rispetto al gruppo di controllo ($p < 0.0001$) (Tabella 4).

APLOTIPO KIR	NCGS (n=40)	Controlli (n=32)	P
AA	3 (7.5%)	10 (31.25%)	< 0.0001
AB	3 (7.5%)	18 (56.25%)	
BB	34 (85%)	4 (12.5%)	

Tabella 4. Frequenze degli aplotipi dei KIR nella popolazione di pazienti in studio.

7. Discussione

Questo studio ha esplorato per la prima volta il ruolo del sistema immunogenetico KIR nella modulazione dell'alloreattività NK e nella patogenesi della NCGS, cercando eventuali correlazioni tra la malattia e la presenza di specifici alleli KIR attivatori o inibitori. I recettori KIR, espressi sulla superficie delle cellule NK, regolano la loro attività bilanciando segnali inibitori e attivatori mediati dal legame con gli antigeni HLA di classe I. La citotossicità delle NK viene attivata quando le cellule bersaglio presentano un'espressione alterata o assente di HLA di classe I, come suggerito dalla teoria del "missing self" [57]. Un aspetto notevole dei geni KIR è la loro rapida evoluzione e la scarsità di conservazione tra le specie [61]. Studi

genetici su infezioni virali hanno evidenziato come l'interazione tra i geni KIR e HLA influenzi l'esito delle malattie. Ad esempio, nell'infezione da HCV, la presenza del gene KIR2DL3 è associata alla risoluzione dell'infezione [62], suggerendo che KIR2DL3, legandosi all'HLA-C, riduca l'inibizione delle NK, favorendo così la risoluzione dell'infezione [63]. Recentemente, è emerso che le NK non solo esercitano citotossicità contro cellule infette o tumorali, ma possono anche modulare la funzione di altre cellule immunitarie tramite la secrezione di citochine e chemochine [64]. Pertanto, un'iperattivazione o disfunzione delle NK potrebbe essere implicata nella patogenesi di malattie autoimmuni, incluse la NCGS. Mansueto et al. (2020) hanno dimostrato una risposta immunitaria anomala in molti pazienti con NCGS, suggerendo una predisposizione autoimmune [65]. Nel contesto delle malattie autoimmuni, la combinazione di KIR2DS1 e/o KIR2DS2 con l'omozigosi per determinati gruppi HLA-C è stata associata a una maggiore suscettibilità all'artrite psoriasica [66]. Questo potrebbe dipendere da una minore inibizione delle NK, in quanto gli individui omozigoti per HLA-C1 mancano di un ligando per KIR2DL2 e KIR2DL3, mentre quelli omozigoti per HLA-C2 non hanno un ligando per KIR2DL1. Allo stesso modo, la combinazione di KIR2DS2 e HLA-C1 è legata a un rischio aumentato di diabete di tipo I [67], e KIR2DL5B è stato implicato nella patogenesi di lupus eritematoso sistemico e sclerosi sistemica [68]. I nostri risultati di associazione genetica indicano che i geni KIR inibitori KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3 e KIR2DL5 sono più frequenti nella popolazione sana, suggerendo un ruolo protettivo rispetto alla NCGS. Al contrario, KIR3DL1 è più frequente nei pazienti con NCGS. Una possibile spiegazione è che i recettori inibitori (KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3 e KIR2DL5) agiscano come forti inibitori delle NK, mentre KIR3DL1 risulti meno efficace nell'impedire l'attivazione delle cellule NK, contribuendo così alla patogenesi della malattia attraverso la produzione di citochine. Inoltre, abbiamo osservato che i pazienti con NCGS presentano principalmente un aplotipo di tipo B, mentre i donatori sani sono maggiormente caratterizzati da aplotipi di tipo A e AB, suggerendo

differenze nel profilo immunogenetico KIR tra i due gruppi. Infine, l'87,5% dei soggetti sani presenta il KIR2DS4, l'unico recettore attivatorio dell'aplotipo A, che è in grado di mediare sia segnali attivatori che inibitori. Questo potrebbe indicare che un bilanciamento tra l'iperattivazione o disfunzione delle NK sia coinvolto nella patogenesi della NCGS. Per comprendere appieno il ruolo dei recettori KIR nell'insorgenza della NCGS, saranno necessari ulteriori studi di genotipizzazione, espressione e funzione dei recettori KIR e dei loro ligandi HLA su campioni più ampi.

8. Bibliografia

1. Balakireva AV, Zamyatnin AA. Properties of Gluten Intolerance: Gluten Structure, Evolution, Pathogenicity and Detoxification Capabilities. *Nutrients*. 2016 Oct 18;8(10):644. doi: 10.3390/nu8100644. PMID: 27763541; PMCID: PMC5084031.
2. Sapone A, Bai JC, Ciacci C, Dolinsek J, Green PH, Hadjivassiliou M, Kaukinen K, Rostami K, Sanders DS, Schumann M, Ullrich R, Villalta D, Volta U, Catassi C, Fasano A. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Med*. 2012 Feb 7; 10:13. doi: 10.1186/1741-7015-10-13. PMID: 22313950; PMCID: PMC3292448.
3. Tatham AS, Shewry PR. Allergens to wheat and related cereals. *Clin Exp Allergy*. 2008 Nov;38(11):1712-26. doi: 10.1111/j.1365-2222.2008.03101.x. Epub 2008 Sep 24. PMID: 18823308.
4. Nilsson N, Sjölander S, Baar A, Berthold M, Pahr S, Vrtala S, Valenta R, Morita E, Hedlin G, Borres MP, Nilsson C. Wheat allergy in children evaluated with challenge and IgE antibodies to wheat components. *Pediatr Allergy Immunol*. 2015 Mar;26(2):119-25. doi: 10.1111/pai.12334. PMID: 25601168.
5. Jabri B, Sollid LM. Mechanisms of disease: immunopathogenesis of celiac disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2006 Sep;3(9):516-25. doi: 10.1038/ncpgasthep0582. PMID: 16951668.
6. Fasano A, Berti I, Gerarduzzi T, Not T, Colletti RB, Drago S, Elitsur Y, Green PH, Guandalini S, Hill ID, Pietzak M, Ventura A, Thorpe M, Kryszak D, Fornaroli F, Wasserman SS, Murray JA, Horvath K. Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. *Arch Intern Med*. 2003 Feb 10;163(3):286-92. doi: 10.1001/archinte.163.3.286. PMID: 12578508.

7. Rubio-Tapia A, Van Dyke CT, Lahr BD, Zinsmeister AR, El-Youssef M, Moore SB, Bowman M, Burgart LJ, Melton LJ 3rd, Murray JA. Predictors of family risk for celiac disease: a population-based study. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008 Sep;6(9):983-7. doi: 10.1016/j.cgh.2008.04.008. Epub 2008 Jun 30. PMID: 18585974; PMCID: PMC2830646.
8. Lionetti E, Castellaneta S, Francavilla R, Pulvirenti A, Tonutti E, Amarri S, Barbato M, Barbera C, Barera G, Bellantoni A, Castellano E, Guariso G, Limongelli MG, Pellegrino S, Polloni C, Ughi C, Zuin G, Fasano A, Catassi C; SIGENP (Italian Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition) Working Group on Weaning and CD Risk. Introduction of gluten, HLA status, and the risk of celiac disease in children. *N Engl J Med*. 2014 Oct 2;371(14):1295-303. doi: 10.1056/NEJMoa1400697. PMID: 25271602.
9. Lebowitz B, Sanders DS, Green PHR. Coeliac disease. *Lancet*. 2018 Jan 6;391(10115):70-81. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31796-8. Epub 2017 Jul 28. PMID: 28760445.
10. Rostom A, Dubé C, Cranney A, Saloojee N, Sy R, Garrity C, Sampson M, Zhang L, Yazdi F, Mamaladze V, Pan I, MacNeil J, Mack D, Patel D, Moher D. The diagnostic accuracy of serologic tests for celiac disease: a systematic review. *Gastroenterology*. 2005 Apr;128(4 Suppl 1): S38-46. doi: 10.1053/j.gastro.2005.02.028. PMID: 15825125.
11. Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A, Green PH, Hadjivassiliou M, Kaukinen K, Kelly CP, Leonard JN, Lundin KE, Murray JA, Sanders DS, Walker MM, Zingone F, Ciacci C. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut*. 2013 Jan;62(1):43-52. doi: 10.1136/gutjnl-2011-301346. Epub 2012 Feb 16. PMID: 22345659; PMCID: PMC3440559.
12. Hervonen K, Hakanen M, Kaukinen K, Collin P, Reunala T. First-degree relatives are frequently affected in coeliac disease and dermatitis herpetiformis. *Scand J Gastroenterol*. 2002 Jan;37(1):51-5. doi: 10.1080/003655202753387356. PMID: 11843035.
13. Hall MA, Lanchbury JS, Ciclitira PJ. HLA class II region genes and susceptibility to dermatitis herpetiformis: DPB1 and TAP2 associations are secondary to those of the DQ subregion. *Eur J*

- Immunogenet. 1996 Aug;23(4):285-96. doi: 10.1111/j.1744-313x.1996.tb00124.x. PMID: 8858285.
14. Spurkland A, Ingvarsson G, Falk ES, Knutsen I, Sollid LM, Thorsby E. Dermatitis herpetiformis and celiac disease are both primarily associated with the HLA-DQ (alpha 1*0501, beta 1*02) or the HLA-DQ (alpha 1*03, beta 1*0302) heterodimers. Tissue Antigens. 1997 Jan;49(1):29-34. doi: 10.1111/j.1399-0039.1997.tb02706.x. PMID: 9027962.
 15. Mitoma H, Hadjivassiliou M, Honnorat J. Guidelines for treatment of immune-mediated cerebellar ataxias. Cerebellum Ataxias. 2015 Nov 10;2:14. doi: 10.1186/s40673-015-0034-y. PMID: 26561527; PMCID: PMC4641375.
 16. Hadjivassiliou M, Sanders DD, Aeschlimann DP. Gluten-related disorders: gluten ataxia. Dig Dis. 2015;33(2):264-268. doi: 10.1159/000369509. Epub 2015 Apr 22. PMID: 25925933.
 17. Gordon N. Vitamin E deficiency and illness in childhood. Dev Med Child Neurol. 1987 Aug;29(4):546-9. doi: 10.1111/j.1469-8749.1987.tb02517.x. PMID: 3315793.
 18. Hadjivassiliou M, Grünewald R, Sharrack B, Sanders D, Lobo A, Williamson C, Woodroffe N, Wood N, Davies-Jones A. Gluten ataxia in perspective: epidemiology, genetic susceptibility and clinical characteristics. Brain. 2003 Mar;126(Pt 3):685-91. doi: 10.1093/brain/awg050. PMID: 12566288.
 19. Hadjivassiliou M, Sanders DS, Woodroffe N, Williamson C, Grünewald RA. Gluten ataxia. Cerebellum. 2008;7(3):494-8. doi: 10.1007/s12311-008-0052-x. PMID: 18787912.
 20. Ghezzi A, Filippi M, Falini A, Zaffaroni M. Cerebral involvement in celiac disease: a serial MRI study in a patient with brainstem and cerebellar symptoms. Neurology. 1997 Nov;49(5):1447-50. doi: 10.1212/wnl.49.5.1447. PMID: 9371939.
 - Balaban DV, Popp A, Vasilescu F, Haidautu D, Purcarea RM, Jinga M. Diagnostic yield of endoscopic markers for celiac disease. J Med Life. 2015 Oct-Dec;8(4):452-7. PMID: 26664469; PMCID: PMC4656951.

21. Hadjivassiliou M. Advances in Therapies of Cerebellar Disorders: Immune-mediated Ataxias. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2019;18(6):423-431. doi: 10.2174/1871527317666171221110548. PMID: 29268693.
22. Nanri K, Mitoma H, Ihara M, Tanaka N, Taguchi T, Takeguchi M, Ishiko T, Mizusawa H. Gluten ataxia in Japan. *Cerebellum*. 2014 Oct;13(5):623-7. doi: 10.1007/s12311-014-0582-3. PMID: 24997752.
23. Catassi C, Elli L, Bonaz B, Bouma G, Carroccio A, Castillejo G, Cellier C, Cristofori F, de Magistris L, Dolinsek J, Dieterich W, Francavilla R, Hadjivassiliou M, Holtmeier W, Körner U, Leffler DA, Lundin KE, Mazzarella G, Mulder CJ, Pellegrini N, Rostami K, Sanders D, Skodje GI, Schuppan D, Ullrich R, Volta U, Williams M, Zevallos VF, Zopf Y, Fasano A. Diagnosis of Non-Celiac Gluten Sensitivity (NCGS): The Salerno Experts' Criteria. *Nutrients*. 2015 Jun 18;7(6):4966-77. doi: 10.3390/nu7064966. PMID: 26096570; PMCID: PMC4488826.
24. Reig-Otero Y, Mañes J, Manyes L. Amylase-Trypsin Inhibitors in Wheat and Other Cereals as Potential Activators of the Effects of Nonceliac Gluten Sensitivity. *J Med Food*. 2018 Mar;21(3):207-214. doi: 10.1089/jmf.2017.0018. Epub 2018 Jan 9. PMID: 29315017.
25. Ierardi E, Losurdo G, Piscitelli D, Giorgio F, Amoroso A, Iannone A, Principi M, Di Leo A. Biological markers for non-celiac gluten sensitivity: a question awaiting for a convincing answer. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2018 Summer;11(3):203-208. PMID: 30013743; PMCID: PMC6040034.
26. Araya M, Bascuñán KA, Alarcón-Sajarópulos D, Cabrera-Chávez F, Oyarzún A, Fernández A, Ontiveros N. Living with Gluten and Other Food Intolerances: Self-Reported Diagnoses and Management. *Nutrients*. 2020 Jun 26;12(6):1892. doi: 10.3390/nu12061892. PMID: 32604710; PMCID: PMC7353382.
27. Potter MDE, Walker MM, Jones MP, Koloski NA, Keely S, Talley NJ. Wheat Intolerance and Chronic Gastrointestinal Symptoms in an Australian Population-based Study: Association

- Between Wheat Sensitivity, Celiac Disease and Functional Gastrointestinal Disorders. *Am J Gastroenterol*. 2018 Jul;113(7):1036-1044. doi: 10.1038/s41395-018-0095-7. Epub 2018 Jun 19. PMID: 29915405.
28. Mumolo MG, Rettura F, Melissari S, Costa F, Ricchiuti A, Ceccarelli L, de Bortoli N, Marchi S, Bellini M. Is Gluten the Only Culprit for Non-Celiac Gluten/Wheat Sensitivity? *Nutrients*. 2020 Dec 10;12(12):3785. doi: 10.3390/nu12123785. PMID: 33321805; PMCID: PMC7762999.
 29. Biesiekierski JR. What is gluten? *J Gastroenterol Hepatol*. 2017 Mar;32 Suppl 1:78-81. doi: 10.1111/jgh.13703. PMID: 28244676.
 30. Schuppan D, Gisbert-Schuppan K. *Wheat Syndromes*. Basel: Springer International Publishing; 2019. ISBN 3030190226.
 31. Skodje GI, Sarna VK, Minelle IH, Rolfsen KL, Muir JG, Gibson PR, Veierød MB, Henriksen C, Lundin KEA. Fructan, Rather Than Gluten, Induces Symptoms in Patients With Self-Reported Non-Celiac Gluten Sensitivity. *Gastroenterology*. 2018 Feb;154(3):529-539.e2. doi: 10.1053/j.gastro.2017.10.040. Epub 2017 Nov 2. PMID: 29102613.
 32. Barrett JS. How to institute the low-FODMAP diet. *J Gastroenterol Hepatol*. 2017 Mar;32 Suppl 1:8-10. doi: 10.1111/jgh.13686. PMID: 28244669.
 33. Shahbazkhani B, Fanaeian MM, Farahvash MJ, Aletaha N, Alborzi F, Elli L, Shahbazkhani A, Zebardast J, Rostami-Nejad M. Prevalence of Non-Celiac Gluten Sensitivity in Patients with Refractory Functional Dyspepsia: a Randomized Double-blind Placebo Controlled Trial. *Sci Rep*. 2020 Feb 12;10(1):2401. doi: 10.1038/s41598-020-59532-z. PMID: 32051513; PMCID: PMC7016109.
 34. Carroccio A, Giannone G, Mansueto P, Soresi M, La Blasca F, Fayer F, Iacobucci R, Porcasi R, Catalano T, Geraci G, Arini A, D'Alcamo A, Villanacci V, Florena AM. Duodenal and Rectal Mucosa Inflammation in Patients With Non-celiac Wheat Sensitivity. *Clin Gastroenterol*

- Hepatol. 2019 Mar;17(4):682-690.e3. doi: 10.1016/j.cgh.2018.08.043. Epub 2018 Aug 21. PMID: 30138736.
35. Zanini B, Villanacci V, Marullo M, Cadei M, Lanzarotto F, Bozzola A, Ricci C. Duodenal histological features in suspected non-celiac gluten sensitivity: new insights into a still undefined condition. *Virchows Arch.* 2018 Aug;473(2):229-234. doi: 10.1007/s00428-018-2346-9. Epub 2018 Apr 4. PMID: 29619556.
 36. Losurdo G, Piscitelli D, Pezzuto F, Fortarezza F, Covelli C, Marra A, Iannone A, Amoroso A, Principi M, Ierardi E, Di Leo A. T Helper Lymphocyte and Mast Cell Immunohistochemical Pattern in Nonceliac Gluten Sensitivity. *Gastroenterol Res Pract.* 2017;2017:5023680. doi: 10.1155/2017/5023680. Epub 2017 Dec 7. PMID: 29362561; PMCID: PMC5738582.
 37. Uhde M, Ajamian M, Caio G, De Giorgio R, Indart A, Green PH, Verna EC, Volta U, Alaedini A. Intestinal cell damage and systemic immune activation in individuals reporting sensitivity to wheat in the absence of coeliac disease. *Gut.* 2016 Dec;65(12):1930-1937. doi: 10.1136/gutjnl-2016-311964. Epub 2016 Jul 25. PMID: 27459152; PMCID: PMC5136710.
 38. Volta U, De Giorgio R, Caio G, Uhde M, Manfredini R, Alaedini A. Nonceliac Wheat Sensitivity: An Immune-Mediated Condition with Systemic Manifestations. *Gastroenterol Clin North Am.* 2019 Mar;48(1):165-182. doi: 10.1016/j.gtc.2018.09.012. Epub 2018 Dec 13. PMID: 30711208; PMCID: PMC6364564.
 39. Barbaro MR, Cremon C, Stanghellini V, Barbara G. Recent advances in understanding non-celiac gluten sensitivity. *F1000Res.* 2018 Oct 11;7: F1000 Faculty Rev-1631. doi: 10.12688/f1000research.15849.1. PMID: 30363819; PMCID: PMC6182669.
 40. Reese I, Schäfer C, Kleine-Tebbe J, Ahrens B, Bachmann O, Ballmer-Weber B, Beyer K, Bischoff SC, Blümchen K, Dölle S, Enck P, Enninger A, Huttegger I, Lämmel S, Lange L, Lepp U, Mahler V, Mönnikes H, Ockenga J, Otto B, Schnadt S, Szepfalusi Z, Treudler R, Wassmann-Otto A, Zuberbier T, Werfel T, Worm M. Non-celiac gluten/wheat sensitivity (NCGS)-a

- currently undefined disorder without validated diagnostic criteria and of unknown prevalence: Position statement of the task force on food allergy of the German Society of Allergology and Clinical Immunology (DGAKI). *Allergo J Int.* 2018;27(5):147-151. doi: 10.1007/s40629-018-0070-2. Epub 2018 May 28. PMID: 30294520; PMCID: PMC6153714.
41. Skodje GI, Henriksen C, Salte T, Drivenes T, Toleikyte I, Lovik AM, Veierød MB, Lundin KE. Wheat challenge in self-reported gluten sensitivity: a comparison of scoring methods. *Scand J Gastroenterol.* 2017 Feb;52(2):185-192. doi: 10.1080/00365521.2016.1244705. Epub 2016 Oct 31. PMID: 27797273.
 42. Vojdani A, Perlmutter D. Differentiation between Celiac Disease, Nonceliac Gluten Sensitivity, and Their Overlapping with Crohn's Disease: A Case Series. *Case Reports Immunol.* 2013;2013:248482. doi: 10.1155/2013/248482. Epub 2013 Jan 27. PMID: 25374738; PMCID: PMC4207593.
 43. Caio G, Volta U, Tovoli F, De Giorgio R. Effect of gluten free diet on immune response to gliadin in patients with non-celiac gluten sensitivity. *BMC Gastroenterol.* 2014 Feb 13;14:26. doi: 10.1186/1471-230X-14-26. PMID: 24524388; PMCID: PMC3926852.
 44. Carroccio A, D'Alcamo A, Iacono G, Soresi M, Iacobucci R, Arini A, Geraci G, Fayer F, Cavataio F, La Blasca F, Florena AM, Mansueto P. Persistence of Nonceliac Wheat Sensitivity, Based on Long-term Follow-up. *Gastroenterology.* 2017 Jul;153(1):56-58.e3. doi: 10.1053/j.gastro.2017.03.034. Epub 2017 Mar 30. PMID: 28365444.
 45. Naik RD, Seidner DL, Adams DW. Nutritional Consideration in Celiac Disease and Nonceliac Gluten Sensitivity. *Gastroenterol Clin North Am.* 2018 Mar;47(1):139-154. doi: 10.1016/j.gtc.2017.09.006. Epub 2017 Dec 7. PMID: 29413009.
 46. Roncoroni L, Bascuñán KA, Vecchi M, Doneda L, Bardella MT, Lombardo V, Scricciolo A, Branchi F, Elli L. Exposure to Different Amounts of Dietary Gluten in Patients with Non-Celiac

- Gluten Sensitivity (NCGS): An Exploratory Study. *Nutrients*. 2019 Jan 10;11(1):136. doi: 10.3390/nu11010136. PMID: 30634655; PMCID: PMC6356445.
47. Khan A, Suarez MG, Murray JA. Nonceliac Gluten and Wheat Sensitivity. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2020 Aug;18(9):1913-1922.e1. doi: 10.1016/j.cgh.2019.04.009. Epub 2019 Apr 10. PMID: 30978535.
 48. Tovoli F, Granito A, Negrini G, Guidetti E, Faggiano C, Bolondi L. Long term effects of gluten-free diet in non-celiac wheat sensitivity. *Clin Nutr*. 2019 Feb;38(1):357-363. doi: 10.1016/j.clnu.2017.12.017. Epub 2017 Dec 26. PMID: 29306516.
 49. Mańkowska-Wierzbicka D, Stelmach-Mardas M. Noncoeliac wheat sensitivity and diet. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2020 Sep;23(5):322-327. doi: 10.1097/MCO.0000000000000671. PMID: 32452869.
 50. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*. 2001 Nov;22(11):633-40. doi: 10.1016/s1471-4906(01)02060-9. PMID: 11698225.
 51. Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood*. 1990 Dec 15;76(12):2421-38. PMID: 2265240.
 52. Benjamin JE, Gill S, Negrin RS. Biology and clinical effects of natural killer cells in allogeneic transplantation. *Curr Opin Oncol*. 2010 Mar;22(2):130-7. doi: 10.1097/CCO.0b013e328335a559. PMID: 20010294; PMCID: PMC2880497.
 53. Zamai L, Ahmad M, Bennett IM, Azzoni L, Alnemri ES, Perussia B. Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J Exp Med*. 1998 Dec 21;188(12):2375-80. doi: 10.1084/jem.188.12.2375. PMID: 9858524; PMCID: PMC2212426.
 54. Freud AG, Caligiuri MA. Human natural killer cell development. *Immunol Rev*. 2006 Dec;214:56-72. doi: 10.1111/j.1600-065X.2006.00451.x. PMID: 17100876.

55. Baxter AG, Smyth MJ. The role of NK cells in autoimmune disease. *Autoimmunity*. 2002 Feb;35(1):1-14. doi: 10.1080/08916930290005864. PMID: 11908701.
56. Flodström M, Maday A, Balakrishna D, Cleary MM, Yoshimura A, Sarvetnick N. Target cell defense prevents the development of diabetes after viral infection. *Nat Immunol*. 2002 Apr;3(4):373-82. doi: 10.1038/ni771. Epub 2002 Mar 4. PMID: 11919579.
57. Ljunggren HG, Kärre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*. 1990 Jul;11(7):237-44. doi: 10.1016/0167-5699(90)90097-s. PMID: 2201309.
58. Uhrberg M, Parham P, Wernet P. Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. *Immunogenetics*. 2002 Jul;54(4):221-9. doi: 10.1007/s00251-002-0463-7. Epub 2002 Jun 14. PMID: 12136333.
59. Witt CS, Dewing C, Sayer DC, Uhrberg M, Parham P, Christiansen FT. Population frequencies and putative haplotypes of the killer cell immunoglobulin-like receptor sequences and evidence for recombination. *Transplantation*. 1999 Dec 15;68(11):1784-9. doi: 10.1097/00007890-199912150-00024. PMID: 10609957.
60. Crum KA, Logue SE, Curran MD, Middleton D. Development of a PCR-SSOP approach capable of defining the natural killer cell inhibitory receptor (KIR) gene sequence repertoires. *Tissue Antigens*. 2000 Oct;56(4):313-26. doi: 10.1034/j.1399-0039.2000.560403.x. PMID: 11098931.
61. Vilches C, Parham P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:217-51. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.092501.134942. Epub 2001 Oct 4. PMID: 11861603.
62. Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J, Cheng J, Goedert JJ, Vlahov D, Hilgartner M, Cox S, Little AM, Alexander GJ, Cramp ME, O'Brien SJ, Rosenberg

- WM, Thomas DL, Carrington M. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science*. 2004 Aug 6;305(5685):872-4. doi: 10.1126/science.1097670. PMID: 15297676.
63. Carrington M, Wang S, Martin MP, Gao X, Schiffman M, Cheng J, Herrero R, Rodriguez AC, Kurman R, Mortel R, Schwartz P, Glass A, Hildesheim A. Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci. *J Exp Med*. 2005 Apr 4;201(7):1069-75. doi: 10.1084/jem.20042158. PMID: 15809352; PMCID: PMC2213116.
 64. Zhang C, Tian Z. NK cell subsets in autoimmune diseases. *J Autoimmun*. 2017 Sep;83:22-30. doi: 10.1016/j.jaut.2017.02.005. Epub 2017 Mar 9. PMID: 28285736.
 65. Mansueto P, Di Liberto D, Fayer F, Soresi M, Geraci G, Giannone AG, Seidita A, D'Alcamo A, La Blasca F, Lo Pizzo M, Florena AM, Dieli F, Carroccio A. TNF- α , IL-17, and IL-22 production in the rectal mucosa of nonceliac wheat sensitivity patients: role of adaptive immunity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2020 Sep 1;319(3):G281-G288. doi: 10.1152/ajpgi.00104.2020. Epub 2020 Jul 13. PMID: 32658621.
 66. Nelson GW, Martin MP, Gladman D, Wade J, Trowsdale J, Carrington M. Cutting edge: heterozygote advantage in autoimmune disease: hierarchy of protection/susceptibility conferred by HLA and killer Ig-like receptor combinations in psoriatic arthritis. *J Immunol*. 2004 Oct 1;173(7):4273-6. doi: 10.4049/jimmunol.173.7.4273. PMID: 15383555.
 67. van der Slik AR, Koeleman BP, Verduijn W, Bruining GJ, Roep BO, Giphart MJ. KIR in type 1 diabetes: disparate distribution of activating and inhibitory natural killer cell receptors in patients versus HLA-matched control subjects. *Diabetes*. 2003 Oct;52(10):2639-42. doi: 10.2337/diabetes.52.10.2639. PMID: 14514651.
 68. Gambino CM, Di Bona D, Aiello A, Carru C, Duro G, Guggino G, Ferrante A, Zinellu A, Caruso C, Candore G, Accardi G. HLA-C1 ligands are associated with increased susceptibility to

systemic lupus erythematosus. Hum Immunol. 2018 Mar;79(3):172-177. doi:
10.1016/j.humimm.2018.01.005. Epub 2018 Feb 2. PMID: 29395276.