



FARMACOGENOMICA E INFERTILITÀ

La farmacogenetica, termine coniato da Vogel nel 1959, è la disciplina che studia come l'assetto genetico degli individui influenzi l'azione dei farmaci ad essi somministrati, con l'obiettivo ultimo di predire e quindi prevenire reazioni avverse e fallimenti terapeutici, ma anche di favorire l'identificazione del farmaco giusto e del suo corretto dosaggio per ogni singolo paziente.

Primi esempi di farmacogenetica sono stati introdotti anche nella pratica dell'infertilità

INFERTILITÀ

L'aumento del tasso d'infertilità ha migliorato le tecniche di riproduzione assistita, rendendo disponibili diverse strategie terapeutiche. Quante più coppie accedono alle tecniche di fecondazione assistita tanto più devono essere disponibili protocolli più efficienti e meno pericolosi. Nonostante i numerosi progressi delle tecniche, la probabilità di gravidanza per ogni ciclo di stimolazione ovarica rimane ancora intorno al 30%. Il problema più grande nei trattamenti di fecondazione in vitro è rappresentato dalla variabilità nella risposta alla iperstimolazione ovarica controllata che varia da scarsa ad ottimale, provocando il fallimento della fecondazione in vitro o complicazioni come la sindrome da iperstimolazione ovarica. Il fallimento dell'impianto embrionario può essere causato da molti fattori differenti come un'inappropriata stimolazione ovarica oppure fattori esogeni ed endogeni come l'età, la riserva ovarica e fattori immunologici. Nel corso degli anni sono stati proposti diversi marcatori genetici per stimare l'efficacia dell'iperstimolazione ovarica controllata e del successivo impianto. Il seguente progetto mira alla determinazione contemporanea di marcatori genetici, quali i polimorfismi dei geni HLA-G, FSHR ed LHB, che sono quelli attualmente utilizzati di routine prima dell'esecuzione dei cicli di iperstimolazione ovarica controllata e per i quali esiste una letteratura ed una prassi ormai consolidata, e di altri marcatori proposti in letteratura per i quali ancora non esiste un consensus unanime da parte dei clinici sul loro utilizzo. Il loro numero è tale da sconsigliare l'utilizzo di tecniche di biologia molecolare classica (PCR, Sequenziamento diretto, ARMS, RFLP) perché troppo numerosi ma non così numerosi da suggerire una soluzione di tipo Next Generation Sequencing che risulterebbe decisamente sovradimensionata e troppo costosa. Di conseguenza, un approccio di tipo DNA microarray risulta quello più adeguato allo scopo.

Di seguito si analizzano i marcatori polimorfici da inserire nel microarray che s'intende realizzare.

FSHR E LHB

L'ormone FSH ha un ruolo fondamentale nel reclutamento dei follicoli secondari e nella selezione del follicolo dominante (Endocr Rev. 1997;18:71–106). La sua azione è mediata dal recettore FSHR. Nel gene FSHR sono descritti oltre 900 polimorfismi; due di questi, p.A307T e p.S680N (rs6165 e rs6166), sono stati ampiamente studiati nella risposta ovarica. I due polimorfismi sono in linkage disequilibrium quasi completo, per cui la variante A307 viaggia con la variante S680 e la variante T307 viaggia con la variante N680.



Nelle tecniche di fecondazione assistita, i genotipi A307-S680/A307-S680 richiedono quantitativi più alti di FSH per indurre la iperstimolazione ovarica rispetto ai genotipi A307-S680/T307-N680 che, a loro volta, richiedono livelli più alti rispetto ai genotipi T307-N680/T307-N680. In accordo con questo modello, le donne con genotipo T307-N680/T307-N680 hanno un tasso di successo alle tecniche FIV significativamente più alto rispetto alle donne con genotipo A307-S680/A307-S680.

Le donne con genotipo A307-S680/A307-S680 rappresentano il 60-75% delle donne che si sottopongono a tecniche di FIV e sono caratterizzate da più alti livelli basali di FSH, la necessità di somministrazioni più elevate di FSH esogeno e un più alto rischio di ipo- iper- risposta. Quindi, la caratterizzazione dei polimorfismi del gene FSHR può essere un utile mezzo per individuare le donne che risponderanno poco alla stimolazione prima che essa abbia luogo. In questo modo, possono essere messi in atto protocolli di stimolazione disegnati per superare la parziale resistenza alla stimolazione con FSH in modo da aumentare significativamente il successo della FIV in queste donne.

L'ormone LH è essenziale nella stimolazione della crescita dei follicoli e nella maturazione degli ovociti, stimolando le ovaie a produrre steroidi (Endocr Rev 1990;11:177-99). Anche nel gene LHB sono state descritte numerose varianti polimorfiche e due di esse formano un aplotipo in linkage disequilibrium completo: W28R e I35T (rs1800447 e rs34349826). La variante I35T introduce un nuovo sito di glicosilazione il cui effetto è quello di aumentare la potenza dell'ormone ma di ridurre drasticamente l'emivita dell'ormone, abbassando i livelli sierici dell'ormone al di sotto della soglia efficace per la stimolazione. Le donne con aplotipo R28-T35 consumano molto più FSH esogeno e producono meno ovociti.

FSHB

Nei maschi, l'ormone FSH, attraverso il legame con il suo recettore FSHR, stimola la proliferazione delle cellule di Sertoli durante il periodo fetale, neonatale e prepuberale e, nel periodo adulto, è cruciale per il mantenimento di una normale spermatogenesi. Quindi i due geni FSHB e FSHR sono i primi candidati nello studio della spermatogenesi. Recentemente, il polimorfismo -211G>T nel gene FSHB (rs10835638) è associato con minori livelli sierici di FSH. Inoltre l'allele T è più frequente in pazienti con oligozoospermia e in vitro dimostra una riduzione del 50% dei livelli trascrizionale del gene. Questo polimorfismo agisce in maniera molto forte sulla fitness riproduttiva dei maschi, mentre i due polimorfismi del gene FSHR hanno un effetto 2-3 volte più piccolo. Clinicamente i pazienti oligozoospermici portatori dei polimorfismi dei geni FSHB e FSHR possono beneficiare del trattamento con FSH esogeno.



INIBINA A

Le cause dell'insufficienza ovarica primaria (POF) sono di difficile individuazione a causa dell'eterogeneità della condizione. L'inibina è un gene candidato per la POF sulla base della sua duplice azione sulla secrezione dell'FSH da parte della ghiandola pituitaria e sulla gametogenesi nelle gonadi. Una mutazione missense nel gene della subunità alfa (rs12720062) diminuisce la bioattività dell'inibina ed è associato alla POF in diverse popolazioni, anche se sembra esserci una penetranza incompleta e/o una causa multifattoriale.

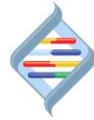
HLA E POLIABORTIVITÀ

HLA-G

L'aborto è una delle più comuni complicanze della gravidanza. L'aborto ricorrente colpisce lo 0.5-1% delle coppie che tenta di avere figli (J Reprod Med. 1993;38:250–259). Non c'è un giudizio uniforme sul numero di aborti richiesti per definire un'abortività ricorrente. Nel 2011, il Royal College of Obstetricians and Gynaecologists ha definito abortività ricorrente la perdita di tre o più gravidanze consecutive (Green-top Guideline N°17), mentre la American Society for Reproductive Medicine (ASRM) nel 2012 la definisce come la perdita di due o più gravidanze (Fertil Steril. 2012; 98:1103–1111). L'embrione, essendo un tessuto semi-allogenico, è in grado di indurre la risposta immunitaria della madre. Di conseguenza, il processo di impianto uterino include meccanismi per evitare un rigetto allogenico, ma se la tolleranza immunologica non funziona correttamente, le gravidanze patologiche come un'abortività ricorrente possono manifestarsi (Nat Immunol. 2006;7:241–246).

Una molecola interessante è l'antigene leucocitario HLA-G che gioca un ruolo fondamentale nella immuno soppressione sui linfociti NK, linfociti T CD4⁺ e CD8⁺, linfociti B, macrofagi e cellule dendritiche (Placenta. 2007;21:S57–S63). Questa molecola viene sintetizzata in 7 forme diverse: 4 di queste sono legate alla membrana delle cellule fetali e 3 sono circolanti. Sebbene ci sono molte controversie, il quadro emergente è che la ridotta o aberrante espressione della forma circolante di HLA-G sembra associata a complicazioni della gravidanza, come l'abortività ricorrente, il fallimento dell'impianto nelle FIV e la pre-eclampsia.

Nella regione di controllo terminale del gene HLA-G è descritto un polimorfismo d'inserzione di 14 basi (rs66554220 - Immunogenetics. 2004;56:135–141). La presenza dell'inserzione diminuisce la stabilità del mRNA e la produzione della proteina. Il polimorfismo INS ha carattere dominante e le coppie portatrici di questo carattere hanno un rischio 1.52 volte più elevato di sperimentare 3 o più aborti ricorrenti (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0061796/>).



MeriGen

Diagnostica Clinica e Biologia Molecolare

MeriGen Research srl – Ricerca e Sviluppo Diagnostico

**Laboratorio “Cesare Pandolfi & C.” sas – Centro
Diagnostico Accreditato SSN Settori Specialistici A1,
A2, A3, A4, A6, R**

Traversa Michele Pietravalle, 11 – 80131 – Napoli

Tel. 0815465026

email: info@merigen.it

sito web: www.merigen.it