

DISCUSSIONE

Le valutazioni condotte nella popolazione di pazienti con IBS e di volontari sani esaminati nel presente studio suggeriscono l'assenza di differenze significative sia in merito alla frequenza di distribuzione dei genotipi del polimorfismo 5HTTLPR tra i due gruppi, che in relazione alla frequenza di distribuzione di questi genotipi nei tre sottogruppi di pazienti con IBS (stratificazione per alvo) rispetto al gruppo dei volontari sani. Il polimorfismo 5HTTLPR non sembra inoltre essere correlato agli indici di frequenza e gravità clinica della sindrome.

Queste osservazioni suggeriscono che il polimorfismo 5HTTLPR potrebbe non essere significativamente coinvolto come fattore di rischio indipendente nei meccanismi patogenetici che sottendono l'insorgenza dell'IBS o delle sue varianti cliniche. Questa conclusione avvalorava l'ipotesi di una patogenesi multifattoriale della sindrome: è possibile infatti che l'eventuale modificazione del processo di ricaptazione della 5-HT non rappresenti un fattore di per sé determinante, o potrebbe rivestire un ruolo più importante in particolari sottogruppi di pazienti (es.: eziologia post-infettiva, prevalenza di disturbi psicologici, etc.) per i quali non sono attualmente disponibili marcatori biologici o clinici attendibili.

Malgrado l'assenza di significatività statistica, nel gruppo dei pazienti con predominanza di costipazione il genotipo S/S, che è stato associato a una ridotta espressione cellulare di SERT, e quindi a una minore efficienza di ricaptazione di 5-HT, tende ad essere rappresentato con una frequenza più bassa (-5,8%) rispetto al gruppo di controllo, mentre il genotipo L/L, che sembra invece promuovere una maggiore espressione cellulare di SERT, e

quindi una buona efficienza di ricaptazione di 5-HT, tende ad essere rappresentato con una frequenza più elevata rispetto ai volontari sani (+8,1%). Risultati simili sono stati ottenuti quando le frequenze del genotipo L/L è stata confrontata con quella L/S+S/S (pazienti costipati: L/L +8.2%; L/S+S/S -7.2%). Il polimorfismo 5HTTLPR potrebbe quindi contribuire, probabilmente in concorso con altri fattori per il momento non noti, a determinare l'espressione della sindrome dal punto di vista del fenotipo clinico (ovvero, predominanza di diarrea o costipazione). Dal punto di vista fisiopatologico, i pazienti nei quali predomina la costipazione, caratterizzati da una frequenza di genotipo S/S relativamente bassa e da una frequenza del genotipo L/L più elevata, potrebbero essere connotati da una maggiore efficienza di ricaptazione cellulare di 5-HT e, conseguentemente, da una minore disponibilità, in termini di tempo e/o concentrazione, della quota di 5-HT biologicamente attiva e coinvolta nel determinismo delle manifestazioni cliniche associate alla sindrome (alterazioni dell'alvo e disfunzione della sensibilità viscerale).

La letteratura riporta altri studi sulla ricerca di un'associazione tra IBS e polimorfismo 5HTTLPR. Alcuni studi sono stati eseguiti su popolazioni caucasiche, come nel caso del presente lavoro, altri invece sono stati condotti su popolazioni asiatiche. Le frequenze di distribuzione degli alleli L ed S è diversa nelle popolazioni caucasiche ed asiatiche, e i confronti tra studi condotti sul polimorfismo 5HTTLPR in pazienti appartenenti ad etnie diverse richiedono quindi notevole cautela a causa della possibilità di errori statistici (Van Kerkhoven et al., 2007, Colucci et al., 2008).

Tra i lavori che non hanno evidenziato correlazioni tra il polimorfismo 5HTTLPR e l'IBS, lo studio di Kim et al. (2004) si colloca tra quelli di maggior importanza per la numerosità del campione analizzato. In questo studio sono stati esaminati 276 pazienti (97% caucasici) e 120 controlli (89% caucasici). Lo studio includeva sia pazienti affetti dalle diverse manifestazioni cliniche dell'IBS che 20 casi di dolore cronico addominale. Successivamente il gruppo di Saito (2007) ha genotipizzato 50 pazienti (96% caucasici) e 53 controlli (98% caucasici), e anche in questo caso l'analisi statistica non ha evidenziato correlazioni tra l'IBS e il polimorfismo 5HTTLPR. Tra gli studi eseguiti su popolazioni asiatiche, Lee et al. (2004) hanno analizzato la distribuzione del polimorfismo 5HTTLPR in 33 pazienti affetti da IBS e 56 individui sani. Questo studio non ha evidenziato associazioni significative tra i genotipi 5HTTLPR e l'IBS, anche se la scarsa numerosità del campione esaminato solleva dubbi sulla potenza dell'analisi statistica.

Alcuni studi hanno evidenziato associazioni significative tra IBS e polimorfismo 5HTTLPR. Lo studio di Pata et al. (2002), condotto su 54 pazienti affetti da IBS e su 91 controlli, tutti caucasici, ha evidenziato che il genotipo L/S è maggiormente frequente nei pazienti con predominanza di diarrea mentre il genotipo S/S è stato riscontrato più frequentemente nei pazienti con predominanza di costipazione. Gli autori hanno concluso che il numero dei soggetti analizzati fosse comunque troppo basso perché i risultati potessero avere una valenza statistica consistente. Gli studi più importanti dal punto di vista della numerosità del campione sono quelli condotti dal gruppo di Yeo (2004) e dal gruppo di Park (2006). Lo studio di Yeo et al. (2004) è stato

condotto su una popolazione di 194 donne caucasiche affette solo dalla variante diarroica di IBS e su 448 controlli di sesso femminile. I risultati hanno indicato che il genotipo S/S è più frequente nei pazienti rispetto ai controlli. Questi risultati sono in linea con quelli ottenuti da Park et al. (2006) i quali hanno esaminato una popolazione di etnia asiatica (190 pazienti con IBS, 437 controlli). Anche in questo caso l'analisi statistica ha evidenziato una frequenza maggiore del genotipo S/S nei pazienti con predominanza di diarrea.

I risultati ottenuti da Yeo et al. (2004) e Park et al. (2006) sono coerenti con le evidenze riportate da Atkinson et al. (2006) i quali, analizzando le concentrazioni plasmatiche post-prandiali di 5-HT nei pazienti con D-IBS e C-IBS, hanno registrato livelli più elevati di 5-HT nei pazienti diarroici rispetto a quelli costipati. Questi risultati concordano con l'ipotesi che i pazienti con predominanza di diarrea siano caratterizzati da una ridotta capacità di ricaptazione della 5-HT dovuta ad una ridotta espressione di SERT, e che livelli plasmatici elevati di 5-HT possano stimolare in maniera abnorme la motilità intestinale e la sensibilità viscerale. In linea con questa ipotesi, uno studio di Bellini et al. (2003) ha evidenziato una bassa densità di espressione del SERT e un basso grado di affinità della paroxetina radiomarcata per il SERT nelle piastrine isolate da 12 pazienti di sesso femminile affette da IBS con predominanza di diarrea, rispetto a 12 volontarie sane. Questo studio ha suggerito una possibile associazione tra la diminuita capacità di ricaptazione di 5-HT e la gravità della sintomatologia nella variante diarroica dell'IBS.

Altri due studi hanno evidenziato invece una frequenza più elevata del genotipo L/L nei pazienti con predominanza di costipazione. Wang et al. (2004)

ha analizzato 81 pazienti con IBS e 48 controlli di etnia Asiatica; Li et al. (2007) hanno esaminato 87 pazienti con IBS e 96 controlli anch'essi di etnia Asiatica. I risultati di questi due studi sono in linea con l'ipotesi che il genotipo L/L, associato a una normale funzione del SERT, e quindi ad una buona efficienza di ricaptazione di 5-HT, sia coinvolto soprattutto nel determinismo della variante clinica caratterizzata da costipazione.

Alcuni degli studi presenti in letteratura sono stati selezionati e valutati globalmente in una recente meta-analisi di Van Kerkhoven et al. (2007), che ha esaminato una popolazione complessiva di 1034 pazienti con IBS e 1377 controlli. Sulla base della meta-analisi gli autori hanno concluso che il polimorfismo 5HTTLPR non costituisce un fattore di rischio per lo sviluppo dell'IBS, sia che la popolazione venga esaminata globalmente, sia nel caso in cui vengano esaminati separatamente gli studi eseguiti su popolazioni Caucasiche o Asiatiche, o che vengano confrontati i soggetti con genotipo S/S vs L/L+L/S o L/L vs S/S+L/S. Tuttavia, l'analisi di Van Kerkhoven et al. (2007) non ha potuto tenere conto dei dati emergenti dai singoli studi, i quali suggeriscono possibili associazioni tra i genotipi 5HTTLPR e le varianti cliniche dell'IBS. In particolare, la maggior parte dei dati disponibili in letteratura, considerati insieme a quelli prodotti nel presente studio, suggeriscono che i pazienti IBS con predominanza di diarrea tendono a presentare una frequenza più elevata di genotipo S/S e più bassa di genotipo L/L, mentre i pazienti con predominanza di costipazione tendono a presentare una frequenza più elevata di genotipo L/L e più bassa di genotipo S/S. Il fatto che alcuni studi non sostengano, su base statistica, questa ipotesi, può dipendere da fattori limitanti

di natura metodologica, quali, per esempio, l'eterogeneità delle popolazioni esaminate, il numero esiguo di soggetti arruolati in alcuni studi, o l'utilizzo di criteri differenti per la diagnosi di IBS e/o per l'inclusione dei soggetti nello studio.

A parte le problematiche di ordine metodologico nella conduzione degli studi di associazione tra polimorfismo 5HTTLPR e IBS, alcuni aspetti riguardanti i meccanismi di trascrizione del gene SERT e la sua struttura molecolare meritano di essere reconsiderati alla luce dei recenti avanzamenti delle conoscenze sulla genetica del SERT (Murphy et al., 2008; Colucci et al., 2008). In particolare, le sequenze ripetute del polimorfismo 5HTTLPR possono dare origine a 4 sottovarianti dell'allele S (14 ripetizioni) e a 6 sottovarianti dell'allele L (16 ripetizioni), insieme ad un certo numero di varianti alleliche meno frequenti con numero di ripetizioni diverso da 14 o 16 (Colucci et al., 2008). Inoltre due gruppi di Autori, Hu et al. e Kraft et al., nel 2005 hanno individuato in maniera indipendente uno SNP (A/G), oggi denominato rs25531, all'interno della sequenza di 43 bp che differenzia L da S. E' stato dimostrato che questo polimorfismo localizzato all'interno della regione polimorfica 5HTTLPR (in pratica, si tratta di un polimorfismo puntiforme all'interno di un polimorfismo a lunghezza variabile) possa influenzare l'attività trascrizionale del gene SERT: nel caso della variante allelica L_A la trascrizione risulta aumentata, mentre nel caso della variante L_G la trascrizione diminuisce in maniera analoga a quanto avviene per l'allele S (Hu et al., 2005). Inoltre il polimorfismo rs25531 è stato associato ad una variazione della risposta terapeutica di pazienti affetti da depressione al

trattamento con SSRI, in maniera indipendente dal polimorfismo 5HTTLPR (Kraft et al., 2005).

Un altro punto che necessita di indagini approfondite è la capacità del polimorfismo 5HTTLPR di influenzare la trascrizione e l'espressione del gene SERT secondo quanto proposto da Lesch et al. (1996). Infatti studi sperimentali eseguiti da Sakai et al. (2002) su linee cellulari trasfettate non hanno confermato le variazioni della trascrizione del gene SERT in presenza delle varianti alleliche S e L originate dal polimorfismo 5HTTLPR. Inoltre, studi condotti sull'uomo non hanno evidenziato correlazioni significative tra i genotipi 5HTTLPR e l'espressione di SERT nel tessuto cerebrale (Shioe et al. 2003; Lim et al., 2006). Sulla base di queste informazioni, è possibile che il polimorfismo 5HTTLPR possa contribuire alla regolazione della trascrizione del gene SERT in "cooperazione" con altri polimorfismi, che potrebbero trovarsi in una condizione di *linkage disequilibrium* con la regione 5HTTLPR.

Gli studi di associazione tra 5HTTLPR e IBS si basano sul presupposto che l'espressione del SERT nel SNC e nei sistemi periferici sia regolata dallo stesso promotore. Tuttavia l'identificazione di diverse varianti di splicing di mRNA individuate nel cervello e nell'intestino dei roditori insieme alla recente identificazione di tre varianti di splicing di mRNA del SERT nell'intestino umano (Gill et al., 2008), permettono di ipotizzare che il promotore contenente il polimorfismo 5HTTLPR potrebbe non essere coinvolto nel controllo dell'espressione della proteina SERT a livello del sistema gastrointestinale. In uno studio recente di Kerckhoffs et al. (2008) è stato osservato che l'espressione di SERT mRNA nell'intestino di pazienti con IBS risulta più elevata

rispetto a quella di individui sani. La caratterizzazione delle varianti di splicing di SERT mRNA nell'intestino di pazienti con IBS potrebbe quindi fornire le basi per la corretta interpretazione del ruolo dei determinanti genetici e/o dei fattori ambientali (epigenetici) che regolano l'espressione del gene SERT in questi soggetti.

Lo studio dei meccanismi epigenetici alla base della disfunzione del SERT nell'intestino è rilevante per la comprensione dell'IBS, poiché il sistema immunitario potrebbe esercitare un ruolo importante in particolari sottogruppi di pazienti con IBS, soprattutto quelli con IBS post-infettiva. Infatti sono state osservate alterazioni dell'espressione intestinale del SERT in condizioni sperimentali o cliniche di infiammazione enterica (Coates et al. 2004; Linden et al., 2005). Inoltre, dovrebbero essere condotti studi sui determinanti genetici dell'IBS che prendano in considerazione meccanismi poligenici (analisi di più polimorfismi) poiché, a causa dell'eterogeneità eziopatogenetica e clinica dell'IBS, polimorfismi genetici diversi potrebbero influire sulla sindrome non singolarmente ma in maniera combinata. Per esempio nello studio di Kim et al. (2004) i genotipi S/S+L/S in associazione alle varianti mutate del polimorfismo Del(322-325) del recettore adrenergico α_{2C} correlano significativamente con valori elevati degli indici di gravità clinica dell'IBS (per esempio, insonnia, affaticamento, depressione) suggerendo che il polimorfismo 5HTTLPR insieme ad altri fattori genetici, ma non da solo, possa essere coinvolto nella risposta allo stress nei pazienti con IBS.

Dal momento che gli SSRI sono utilizzati nella terapia dell'IBS (Videlock e Chang, 2007) e dimostrano una certa efficacia (Ford et al., 2008), è

necessario stabilire se il polimorfismo 5HTTLPR possa influenzare l'attività terapeutica di questi farmaci nell'IBS. In particolare, è importante determinare se il ruolo svolto dai determinanti genetici possa influenzare maggiormente la sintomatologia addominale o le condizioni di comorbidità psichiatrica che sono piuttosto frequenti nei pazienti con IBS (Pae et al., 2007; Colucci et al., 2008). Rimane quindi da chiarire se il polimorfismo 5HTTLPR possa influire sulle concentrazioni plasmatiche di 5-HT, sulle manifestazioni cliniche dell'IBS e sulla risposta al trattamento farmacologico con SSRI. Inoltre, dal momento che alcuni studi hanno evidenziato una correlazione tra IBS e polimorfismo 5HTTLPR quando i pazienti sono stati stratificati in base alla manifestazione clinica predominante della sindrome, gli studi futuri dovrebbero essere pianificati in modo da poter analizzare numeri elevati di pazienti e di soggetti di controllo, avendo cura di classificare il fenotipo clinico della patologia, la familiarità ed eventualmente la comorbidità psichiatrica.

Conclusioni

- ✓ Il presente studio non evidenzia differenze significative nella frequenza di distribuzione dei genotipi del polimorfismo 5HTTLPR tra i pazienti con IBS e i volontari sani, anche quando viene eseguita una stratificazione dei soggetti in base al sesso e/o all'alvo
- ✓ L'analisi dei dati mostra una tendenza del genotipo S/S ad essere meno rappresentato nel gruppo con variante costipata (C-IBS) e ad essere più rappresentato nella variante diarroica (D-IBS)
- ✓ Gli indici di gravità e frequenza dei sintomi di IBS non sono significativamente influenzati dai genotipi del polimorfismo 5HTTLPR
- ✓ Il grado di insoddisfazione dell'alvo e la gravità del meteorismo risultano significativamente più elevati nei pazienti con alvo costipato