

Caleidoscopio

Italiano



A cura di
Anna Di Lonardo, Corrado Fagnani,
Simonetta Pulciani

Applicazioni dei microarray (2)

Direttore Responsabile
Sergio Rassu

223

... il futuro ha il cuore antico  MEDICAL SYSTEMS SpA

Caleidoscopio

Italiano



A cura di
**Anna Di Lonardo, Corrado Fagnani,
Simonetta Pulciani**

Istituto Superiore di Sanità. Roma

Applicazioni dei microarray (2)

Direttore Responsabile
Sergio Rassu

223

... il futuro ha il cuore antico  **MEDICAL SYSTEMS SpA**

ISTRUZIONI PER GLI AUTORI



INFORMAZIONI GENERALI. *Caleidoscopio* pubblica lavori di carattere monografico a scopo didattico su temi di Medicina. La rivista segue i requisiti consigliati dall'International Committee of Medical Journal Editors. Gli Autori vengono invitati dal Direttore Responsabile. La rivista pubblica anche monografie libere, proposte direttamente dagli Autori, redatte secondo le regole della Collana.

TESTO. La monografia deve essere articolata in paragrafi snelli, di rapida consultazione, completi e chiari. I contenuti riportati devono essere stati sufficientemente confermati. E' opportuno evitare di riportare proprie opinioni dando un quadro limitato delle problematiche. La lunghezza del testo può variare dalle 60 alle 70 cartelle dattiloscritte ovvero 100-130.000 caratteri (spazi inclusi). Si invita a dattilografare su una sola facciata del foglio formato A4 con margini di almeno 25 mm. Usare dovunque doppi spazi e numerare consecutivamente. Ogni sezione dovrebbe iniziare con una nuova pagina.

FRONTESPIZIO. Deve riportare il nome e cognome dell'Autore(i) -non più di cinque- il titolo del volume, conciso ma informativo, la Clinica o Istituto cui dovrebbe essere attribuito il lavoro, l'indirizzo, il nome e l'indirizzo dell'Autore (compreso telefono, fax ed indirizzo di E-mail) responsabile della corrispondenza.

BIBLIOGRAFIA. Deve essere scritta su fogli a parte secondo ordine alfabetico seguendo le abbreviazioni per le Riviste dell'*Index Medicus* e lo stile illustrato negli esempi:

1) Björklund B., Björklund V.: Proliferation marker concept with TPS as a model. A preliminary report. *J. Nucl. Med. Allied. Sci* 1990 Oct-Dec, VOL: 34 (4 Suppl), P: 203.

2) Jeffcoate S.L. e Hutchinson J.S.M. (Eds): *The Endocrine Hypothalamus*. London. Academic Press, 1978.

Le citazioni bibliografiche vanno individuate nel testo, nelle tabelle e nelle legende con numeri arabi tra parentesi.

TABELLE E FIGURE. Si consiglia una ricca documentazione iconografica (in bianco e nero eccetto casi particolare da concordare). Figure e tabelle devono essere numerate consecutivamente (secondo l'ordine di citazione nel testo) e separatamente; sul retro delle figure deve essere indicato l'orientamento, il nome dell'Autore ed il numero. Le figure realizzate professionalmente; è inaccettabile la riproduzione di caratteri scritti a mano libera. Lettere, numeri e simboli dovrebbero essere chiari ovunque e di dimensioni tali che, se ridotti, risultino ancora leggibili. Le fotografie devono essere stampe lucide, di buona qualità. Gli Autori sono responsabili di quanto riportato nel lavoro e dell'autorizzazione alla pubblicazione di figure o altro. Titoli e spiegazioni dettagliate appartengono alle legende, non alle figure stesse. Su fogli a parte devono essere riportate le legende per le figure e le tabelle.

UNITÀ DI MISURA. Per le unità di misura utilizzare il sistema metrico decimale o loro multipli e nei termini dell'International system of units (SI).

ABBREVIAZIONI. Utilizzare solo abbreviazioni standard. Il termine completo dovrebbe precedere nel testo la sua abbreviazione, a meno che non sia un'unità di misura standard.

PRESENTAZIONE DELLA MONOGRAFIA. Riporre il dattiloscritto, le fotografie, una copia del testo in formato .doc oppure .rtf, ed copia di grafici e figure in formato Tiff con una risoluzione di almeno 240 dpi, archiviati su CD in buste separate.

Il dattiloscritto originale, le figure, le tabelle, il dischetto, posti in busta di carta pesante, devono essere spediti al Direttore Responsabile con lettera di accompagnamento. L'autore dovrebbe conservare una copia a proprio uso. Dopo la valutazione espressa dal Direttore Responsabile, la decisione sulla eventuale accettazione del lavoro sarà tempestivamente comunicata all'Autore. Il Direttore responsabile deciderà sul tempo della pubblicazione e conserverà il diritto usuale di modificare lo stile del contributo; più importanti modifiche verranno eventualmente fatte in accordo con l'Autore. I manoscritti e le fotografie se non pubblicati non si restituiscono.

L'Autore riceverà le bozze di stampa per la correzione e sarà Sua cura restituirle al Direttore Responsabile entro cinque giorni, dopo averne fatto fotocopia. Le spese di stampa, ristampa e distribuzione sono a totale carico della Medical Systems che provvederà a spedire all'Autore cinquanta copie della monografia. Inoltre l'Autore avrà l'opportunità di presentare la monografia nella propria città o in altra sede nel corso di una serata speciale.

L'Autore della monografia cede tutti i pieni ed esclusivi diritti sulla Sua opera, così come previsti dagli artt. 12 e segg. capo III sez. I L. 22/4/1941 N. 633, alla Rivista *Caleidoscopio* rinunciando agli stessi diritti d'autore (ed acconsentendone il trasferimento ex art. 132 L. 633/41).

Tutta la corrispondenza deve essere indirizzata al seguente indirizzo:

Restless Architect of Human Possibilities sas
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari

Caleidoscopio

Italiano

Editoriale

Il numero rilevante di coloro che hanno collaborato alla realizzazione di questa splendida monografia ci induce a presentarli per poter dedicare loro tutto lo spazio che meritano.

Il Dottor Romano Arcieri è laureato in Medicina e Chirurgia e specializzato in Ematologia clinica e di laboratorio. Il Dottor Arcieri si interessa di farmacoepidemiologia delle malattie cardiovascolari, di psicostimolanti nell'ADHD, di farmaci ipocolesterolemizzanti e statine. Ha svolto attività di coordinatore, a livello nazionale, di ricerche su malattie a trasmissione virale. Dal 2004 è coordinatore delle attività del Reparto di Ricerca Clinica e Farmacologia Sperimentale presso il Dipartimento del Farmaco dell'Istituto Superiore di Sanità. E' autore di numerose pubblicazioni scientifiche su riviste nazionali ed internazionali.

La Dottoressa Barbara Brunetto ha conseguito la laurea in Scienze Biologiche ed è dottoranda in Immunologia. Dal 2003 svolge la propria attività come collaboratore di ricerca presso il Centro per la Ricerca e Valutazione dei Farmaci Immunobiologici dell'Istituto Superiore di Sanità ed è coinvolta in studi su estratti allergenici. E' autrice di pubblicazioni su riviste scientifiche nazionali e internazionali.

Il Dottor Roberto Bruni è laureato in Scienze Biologiche. Dal 1991 svolge attività di ricerca sulle infezioni da virus dell'epatite B (HBV) e C (HCV) presso il Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate dell'Istituto Superiore di Sanità. E' autore di varie pubblicazioni su riviste scientifiche internazionali.

La Dottoressa Francesca Carlini, ha conseguito la laurea in Scienze Biologiche e la Specializzazione in Patologia generale. Nel corso della sua carriera scientifica ha svolto attività di ricerca presso il Laboratorio di Virologia dell'Istituto Superiore di Sanità, occupandosi di infezione da HIV e lotta all'AIDS. Attualmente lavora presso il Dipartimento del Farmaco del medesimo Istituto, e si interessa di farmacogenomica. E' autrice di diverse pubblicazioni scientifiche in ambito internazionale.

La Dottoressa Anna Rita Ciccaglione ha conseguito la Laurea in Scienze Biologiche e il Dottorato di Ricerca in Microbiologia ed Epidemiologia. Dal 1986 svolge attività di ricerca sulle Epatiti virali presso il Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate dell'Istituto Superiore di Sanità. Attualmente è coinvolta in studi sulla biologia, patogenesi e terapia delle infezioni da virus Epatitici. E' autore di varie pubblicazioni su riviste scientifiche internazionali.

La Dottoressa Angela Costantino è laureata in Scienze Biologiche e dal 1994 svolge attività di ricerca presso il Dipartimento Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate dell'Istituto Superiore di Sanità occupandosi di infezione da virus dell'Epatite C (HCV). I suoi studi sono stati rivolti principalmente analisi delle proteine E1 ed E2 mutate dell'HCV in vari sistemi di espressione. E' autore di varie pubblicazioni su riviste scientifiche internazionali.

La Dottoressa Anna Di Lonardo, laureata in Scienze biologiche e specializzata in Patologia clinica si è occupata di Virologia oncologica in particolare di papillomavirus, affrontando sia ricerche di base che traslazionali/cliniche. Più recentemente si è interessata alle infezioni da enterovirus, e alla tecnologia dei microarray. Attualmente è ricercatore presso il Centro per la Ricerca e la Valutazione di prodotti Immunobiologici dell'Istituto Superiore di Sanità e qui svolge attività di carattere istituzionale relativa al controllo del vaccino antipoliomielitico. E' autore di diverse pubblicazioni su riviste scientifiche nazionali ed internazionali.

Il Dottor Corrado Fagnani, matematico, ha una posizione di ricercatore presso il Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute (CNESPS) dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) di Roma, e fa parte del gruppo di ricerca che gestisce il Registro Nazionale Gemelli. E' coinvolto in numerosi progetti di epidemiologia genetica, alcuni dei quali in collaborazione con i Registri Gemelli di altri Paesi europei. E' autore di diverse pubblicazioni su riviste scientifiche nazionali ed internazionali.

Il Dottor Alessandro Ferraris è laureato in Medicina e Chirurgia e specializzato in Genetica Medica. Attualmente è dottorando in Genetica Medica. Collabora da anni con le Unità di Neurogenetica e di Genetica Clinica dell'Istituto CSS Mendel di Roma, con particolare interesse per la definizione clinica e molecolare dei parkinsonismi ereditari e di altri disturbi del movimento. Svolge inoltre attività di consulenza genetica, in particolare in correlazione all'esecuzione di test genetici (pre- e post-test). E' autore di numerose pubblicazioni di interesse internazionale.

La Dottoressa Simona Gaudi ha conseguito la laurea in Scienze Biologiche e il Dottorato di Ricerca in Biotecnologie presso l'Università degli Studi di Milano. Dopo la laurea ha svolto attività di ricerca presso l'Università degli Studi di Milano. Nel corso della sua carriera professionale ha soggiornato per lunghi periodi all'estero. Dall'anno 2002 è ricercatrice presso il Dipartimento del Farmaco dell'Istituto Superiore di Sanità. Le sue principali aree d'interesse sono: HIV-AIDS, fisiologia del miocardio in risposta a farmaci, ricerca di nuovi farmaci in campo oncologico, farmacogenomica. E' autore di diverse pubblicazioni scientifiche su riviste a carattere internazionale.

Il Dottor Leonardo Geraci è laureato in Medicina e Chirurgia ed è specializzato in Ematologia, Oncologia e Medicina Interna. E' stato Dirigente Medico presso il Servizio di Ematologia dell'Ospedale di Pescara e Responsabile del Centro Trasfusionale e del Servizio di Ematologia dell'Ospedale di Sulmona. Fa parte del Centro Regionale per lo studio e il follow-up della malattia celiaca. E' autore di numerose pubblicazioni scientifiche in ambito ematologico.

Il Dottor Germano Gerosolimo è laureato in Scienze Biologiche e specializzato in Biochimica. È stato ricercatore presso il Consorzio Mario Negri Sud. Dal 2000 lavora presso il Centro Trasfusionale dell'Ospedale di Sulmona dove si interessa di patologie genetiche, autoimmuni, infettive e virali. Fa parte del Centro Regionale per lo studio e il follow-up della malattia celiaca. È autore di diverse pubblicazioni scientifiche.

Il Professor Fabio Macciardi è laureato in Medicina e Chirurgia e specializzato in Epidemiologia e Statistica Medica. Nel corso della sua carriera ha ottenuto molteplici incarichi di docenza, in ambito internazionale e nazionale. Attualmente è professore Associato di Genetica Medica presso il Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche dell'Università degli Studi di Milano. Le sue principali aree di ricerca sono la genetica epidemiologica, la genetica medica e la farmacogenetica. E' autore di numerose pubblicazioni su riviste scientifiche nazionali ed internazionali.

La Dottoressa Cinzia Marcantonio è laureata in Scienze Biologiche e specializzata in Patologia Clinica. Dal 1994 svolge attività di ricerca sul virus dell'Epatite C (HCV) presso il Dipartimento Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate dell'Istituto Superiore di Sanità. Attualmente è coinvolta in studi riguardanti: meccanismi di immunità innata e analisi dell'espressione genica nelle infezioni da virus dell'HCV; processi molecolari di cancerogenesi nel linfoma da HCV. E' autore di varie pubblicazioni su riviste scientifiche internazionali.

La Dottoressa Patrizia Iacovacci è laureata in Scienze Biologiche. Dal 1998 svolge attività di ricerca presso l'Istituto Superiore di Sanità. Attualmente è ricercatore presso il Centro per la Ricerca e Valutazione dei Farmaci Immunobiologici dell'Istituto Superiore di Sanità, e si interessa principalmente alla valutazione qualitativa degli estratti allergenici commerciali per diagnosi e terapia delle patologie allergiche. E' autrice di numerose pubblicazioni su riviste scientifiche nazionali e internazionali.

Il Dottor Carlo Pini è laureato in Scienze Biologiche e specializzato in Patologia Generale. Dopo la laurea ha iniziato la sua carriera scientifica presso l'Istituto Superiore di Sanità ed è stato docente presso la Facoltà di Medicina dell'Università degli Studi di Perugia. Ha trascorso un periodo di studio presso il Dipartimento di Microbiologia e Immunologia dell'Università "Western Ontario". Attualmente è Direttore del Centro Nazionale per la Ricerca e la Valutazione dei Prodotti Immunobiologici. Ha molteplici incarichi a livello nazionale ed internazionale nel campo degli allergeni e dei prodotti farmaceutici e biologici. E' autore di numerose pubblicazioni su riviste scientifiche nazionali ed internazionali.

La Dottoressa Simonetta Pulciani, laureata in Fisica, si è sempre interessata dei meccanismi di trasformazione cellulari e di retrovirus. Più recentemente si è interessata di microarray, epidemiologia genetica e malattie rare. Attualmente svolge la sua attività a carattere istituzionale, presso il Centro per la Ricerca e la Valutazione dei prodotti Immunobiologici, occupandosi di problematiche legate all'uso dei farmaci ricombinanti. E' autore di diverse pubblicazioni su riviste scientifiche nazionali ed internazionali.

La Dottoressa Maria Rapicetta è Dirigente di Ricerca e Direttore del Reparto Epatiti Virali presso il Dipartimento Malattie Infettive Parassitarie ed Immunomediate dell'Istituto Superiore di Sanità. E' membro di gruppi e commissioni EU, esperto dell'AIFA e del Consiglio Superiore di Sanità nel settore dei vaccini virali, diagnostici in vitro e sicurezza virale dei prodotti biologici. E' autore di numerose pubblicazioni nazionali ed internazionali.

La Dottoressa Paola Tataseo è laureata in Scienze Biologiche, ha conseguito il Dottorato di Ricerca in "Biologia Cellulare e Molecolare" e si è specializzata in Applicazioni Biotecnologiche, Patologia Clinica e Genetica Medica. È stata ricercatrice presso l'Università "Tor Vergata" di Roma. Dal 1993 dirige il laboratorio di Biologia Molecolare presso il Centro Trasfusionale dell'Ospedale di Sulmona. Fa parte del Centro Regionale per lo studio e il follow-up della malattia celiaca. Svolge attività di docente ed è autrice di numerose pubblicazioni scientifiche.

La Dottoressa Raffaella Tinghino è laureata in Scienze Biologiche. Dal 1991 svolge la sua attività di ricerca presso l'Istituto Superiore di Sanità, principalmente nel campo degli allergeni. Attualmente è ricercatore presso il Centro Ricerca e Valutazione dei farmaci Immunobiologici dell'Istituto Superiore di Sanità. E' co-responsabile della banca dati sulle sostanze sensibilizzanti dell'Istituto Superiore di Sanità. E' autore di numerose pubblicazioni scientifiche su riviste nazionali ed internazionali.

La Dottoressa Elena Tritarelli è laureata in Scienze Biologiche. Dal 1988 svolge attività di ricerca all'Istituto Superiore di Sanità interessandosi principalmente dell'interazione dell'HCV con la cellula ospite. E' autore di varie pubblicazioni su riviste scientifiche internazionali.

Il Dottor Stefano Vella è laureato in Medicina e Chirurgia e specializzato in Malattie Infettive e Medicina Interna. E' stato medico interno e ricercatore presso l'Università degli Studi di Roma "La Sapienza" ed ha svolto docenze in varie università italiane. Nel 1992 è divenuto dirigente di ricerca presso l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) con l'incarico di direttore del Reparto HIV/AIDS. Attualmente è Direttore del Dipartimento del Farmaco presso l'Istituto Superiore di Sanità e ricopre innumerevoli incarichi di carattere scientifico ed istituzionale. E' autore di numerose pubblicazioni scientifiche su riviste nazionali ed internazionali.

Sergio Rassa

Microarray e Virus dell'Epatite C

Anna Rita Ciccaglione¹, Cinzia Marcantonio¹, Elena Tritarelli¹, Paola Tataseo², Alessandro Ferraris³, Roberto Bruni¹, Germano Gerosolimo², Angela Costantino¹, Leonardo Geraci², Maria Rapicetta¹

¹Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Roma; ²ASL Avezzano-Sulmona, Laboratorio di Medicina Trasfusionale e Biologia Molecolare, Sulmona; ³IRCCS CSS-Mendel Institute, and Dept. of Experimental Medicine and Pathology, Università La Sapienza, Roma

L'infezione da HCV: epidemiologia e storia naturale

L'infezione da virus dell'Epatite C (HCV) è la causa principale nel mondo di malattie croniche epatiche, quali cirrosi ed epatocarcinoma, ed è una delle cause primarie di trapianto del fegato nei paesi occidentali. La terapia attuale con Interferone è efficace solo nel 50%-60 % dei pazienti infettati con virus di genotipo 1b, la cui distribuzione è prevalente nei paesi occidentali. Inoltre, non esiste attualmente un vaccino in grado di prevenire la trasmissione dell'infezione.

Negli ultimi anni, la diffusione della tecnologia del microarray ha evidenziato la complessità dei processi molecolari coinvolti nel fenomeno di persistenza dell'infezione virale e nella risposta alla terapia con Interferone. La valutazione simultanea dell'espressione di migliaia di geni rappresenta quindi una risorsa potenziale che potrà essere utile sia per una migliore comprensione dei meccanismi di patogenesi virale che per lo sviluppo di trattamenti terapeutici più efficaci.

L'infezione da HCV ha una diffusione globale con una prevalenza pari al 3% e 170 milioni di portatori cronici nel mondo. In Italia, la prevalenza dell'infezione varia dal 3 al 26% con un aumento progressivo con l'età (soggetti nati prima del 1950) e valori di prevalenza più alti nelle regioni del sud e nelle isole rispetto alle regioni centrali e del nord (Mele A. et al., 2006).

L'epatite C è una malattia con diversi gradi d'evoluzione (Fig. 1). Circa il 15% dei soggetti che contrae l'infezione guarisce spontaneamente. L'infezione ha però un'elevata tendenza ad evolvere verso la cronicità (80-85%). La persistenza dell'infezione è in gran parte dovuta alla variabilità genetica del virus che gli consente di sfuggire al controllo del sistema immunitario. Convenzionalmente, l'infezione da HCV viene definita acuta se la durata non supera i 6 mesi, quando la malattia si prolunga oltre questo periodo di tempo, l'infezione viene definita cronica.

L'evoluzione a lungo termine dell'infezione è molto variabile. Complessivamente, il 10-20% dei soggetti con epatite cronica da HCV potrà sviluppare, in un periodo di 20-30 anni, la cirrosi epatica (Fig. 1). Nei pazienti con cirrosi epatica di grado severo si osserva una mortalità di circa il 50% in 5 anni ed il rischio di sviluppare un epatocarcinoma (HCC) è pari all'1-4%.

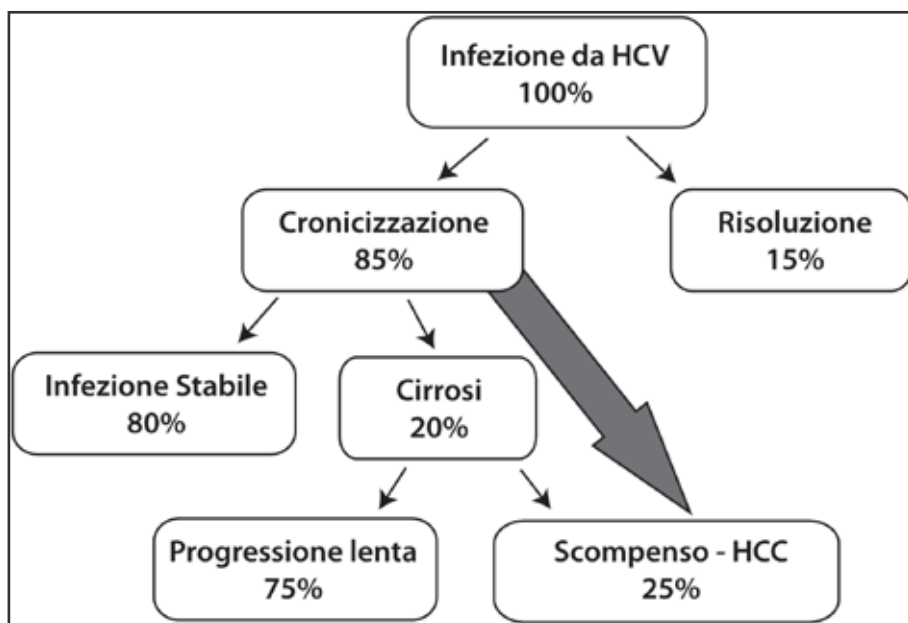


Figura 1. Storia naturale dell'infezione da HCV.

La progressione della malattia epatica nei pazienti con infezione cronica.

L'epatite cronica virale, che può presentarsi in maniera più o meno estesa, è caratterizzata dal punto di vista anatomopatologico dalla presenza di fenomeni litici e degenerativi delle cellule epatiche. I meccanismi attraverso i quali si realizza la lisi epatocitaria non sono ancora ben noti. Negli ultimi anni si è diffusa l'idea che sia fattori virali sia l'intervento della risposta immune possano contribuire alla patogenesi dell'infezione.

In molti casi, l'infezione persistente dell'HCV si associa alla steatosi epatica, una condizione cronica in cui si verifica un accumulo di lipidi nelle cellule del fegato. Tuttavia, la conseguenza primaria dell'infezione è rappresentata dalla fibrosi epatica, dovuta all'accumulo di tessuto di tipo "cicatriziale" che si può osservare in quasi tutte le condizioni di danno

cronico. La persistenza nel tempo dell'infiammazione cronica, della fibrosi e della rigenerazione parenchimale determinano una progressiva alterazione della struttura lobulare fino a trasformazione significativa del danno epatico in cirrosi vera e propria.

La cirrosi epatica è una malattia cronica del fegato ad andamento lento e progressivo, caratterizzata da cicatrici fibrose, da noduli parenchimali e da una conseguente perdita dei normali rapporti tra le cellule, i vasi sanguigni e le vie biliari. Le alterazioni della cirrosi sono irreversibili e progressive, per quanto con andamento variabile nel tempo.

Il virus dell'Epatite C

L'HCV è un piccolo virus appartenente alla famiglia dei Flavivirus. La particella virale di circa 50 nm è composta da un involucro membranoso esterno (envelope) che contiene due glicoproteine virali chiamate E1 ed E2 ed un capside interno formato dalla proteina core (C). Il capside racchiude l'acido nucleico, o genoma, virale (Fig. 2).

Il genoma dell'HCV è costituito da un singolo filamento di RNA di lunghezza pari a circa 9600 nucleotidi, organizzato in modo tale che un quarto all'estremità 5' codifica per le proteine strutturali (C, E1, E2, p7) ed il resto codifica per le proteine non strutturali (NS2, NS3, NS4A, 4B, NS5A, 5B) (Fig. 3).

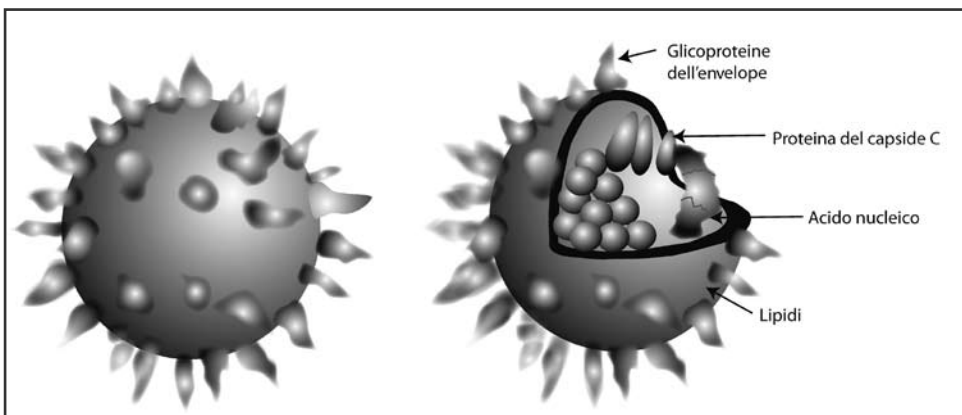


Figura 2. Modello tridimensionale del virus dell'epatite C (visione intera e parziale). Sono mostrate schematicamente le componenti strutturali del virus.

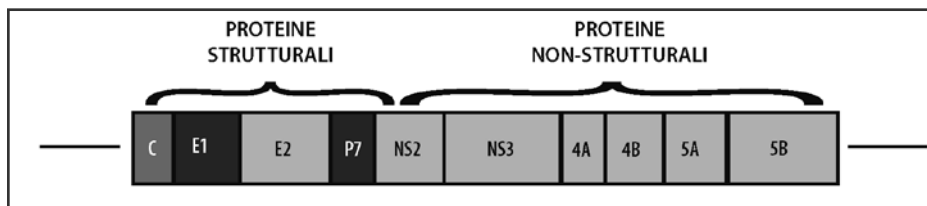


Figura 3. Il genoma dell' HCV.

Microarray e virus dell'Epatite C

Profili di espressione genica nel modello animale dello scimpanzè infettato con l'HCV

Studi di microarray, condotti su scimpanzè infettati con l'HCV, hanno evidenziato che l'esordio e la diffusione dell'infezione sono associati a profili specifici di espressione genica, rilevabili nelle cellule epatiche (Bigger C.B. et al., 2004, Su A.I. et al., 2002). In particolare, è stato osservato che durante la fase acuta dell'infezione si verifica una vigorosa attivazione di geni che rispondono all'Interferone α/β (IFN α/β), le cui funzioni sono importanti per il controllo delle infezioni virali. L'attivazione di questi geni correla con la quantità di HCV RNA nel sangue (marcatore del virus circolante) e la durata della viremia. Tuttavia, questo fenomeno si osserva sia negli scimpanzè che eliminano l'HCV RNA e guariscono dall'infezione che in quelli che mantengono livelli di HCV RNA rilevabili anche dopo sei mesi e sviluppano l'infezione persistente. Sulla base di tali osservazioni è possibile quindi ipotizzare che negli epatociti infettati dall'HCV si verifichi una cospicua trascrizione di geni regolati dall'IFN α/β ad azione antivirale. Tuttavia, questa risposta sembra avere uno scarso effetto sul virus circolante o sull'andamento dell'infezione, probabilmente a causa di meccanismi virali che reprimono la capacità dell'Interferone di bloccare la replicazione del virus.

Un meccanismo di attivazione completamente diverso è stato osservato per i geni coinvolti nella risposta immune adattativa. In questo caso infatti, l'induzione di geni coinvolti nella risposta all'IFN γ e di geni che regolano il processamento e la presentazione degli antigeni è rilevabile solo negli animali che eliminano il virus. Tale risultato suggerisce che la risposta immune adattativa abbia un ruolo di rilievo nel processo di guarigione dall'infezione epatica (Bigger C.B. et al., 2004, Su A.I. et al., 2002).

Un aspetto importante, emerso da questi studi, riguarda l'attivazione, durante la fase acuta dell'infezione, di geni coinvolti nel metabolismo dei lipidi epatici (Bigger C.B. et al., 2004, Su A.I. et al., 2002). L'infezione degli epatociti da parte dell'HCV sembra infatti sia strettamente legata all'induzione di alcune vie del metabolismo lipidico probabilmente necessarie sia per la replicazione dell'HCV RNA che per l'ingresso e/o l'uscita del virus dalla cellula epatica. L'attivazione dei geni del metabolismo dei lipidi nell'epatite C ha implicazioni patogenetiche rilevanti poiché l'infezione causa nel 40% dei casi fenomeni di steatosi (accumulo di lipidi nel fegato) che rappresentano un fattore di rischio per la progressione della malattia epatica.

Profili di espressione genica in pazienti con infezione cronica da HCV

Studi condotti su pazienti con infezione cronica indicano che la maggior parte degli RNA messaggeri trascritti nel fegato corrisponde a geni regolati dall'IFN α/β (Helbig K.J. et al., 2003, 2004). Quindi, come si osserva nello scimpanzè, negli epatociti si verifica una risposta trascrizionale all'Interferone endogeno che tuttavia non riesce ad eliminare il virus. La caratterizzazione molecolare di alcuni dei geni identificati con microarray ha permesso di chiarire alcuni aspetti patogenetici. In particolare, tra i geni indotti è presente il gene I-TAC, membro della famiglia di ligandi delle chemochine CXCR3 che hanno il compito di reclutare cellule T attivate nei siti di infiammazione. L'identificazione di questo gene ha aggiunto quindi un'informazione importante per la comprensione del meccanismo di reclutamento di cellule T nel fegato infetto (Helbig K.J. et al., 2003). Un altro esempio di gene identificato tramite microarray è il gene chiamato viperin. La funzione di questo gene sembra essere importante per la replicazione virale. Infatti, l'espressione ad alto livello della proteina corrispondente è in grado di inibire la replicazione dell'HCV RNA in esperimenti condotti in vitro (Helbig K.J. et al., 2004). Questo tipo di sperimentazione dimostra che la tecnologia del microarray può essere utile per l'identificazione di meccanismi molecolari potenzialmente importanti per lo sviluppo di nuove terapie antivirali.

L'analisi dell'espressione genica ha contribuito a chiarire alcuni aspetti rilevanti che riguardano la progressione della malattia epatica in fibrosi (Lau D.T. et al., 2005, Smith M.W. et al., 2003). A questo proposito è stato osservato che nei pazienti che si trovano in uno stadio iniziale di fibrosi epatica si verifica l'induzione di geni del metabolismo lipidico e di geni che regolano la proliferazione delle cellule epatiche stellate. In accordo con questi dati, sia l'accumulo di lipidi nel fegato che l'attivazione delle cellule stellate sono processi importanti per lo sviluppo iniziale del fenomeno di fibrosi. Negli stadi più avanzati di fibrosi si osserva invece l'induzione di geni coinvolti nei pro-

cessi di stress ossidativo, apoptosi, infiammazione, proliferazione cellulare e fibrogenesi. Gli stadi finali sono inoltre caratterizzati da alti livelli di espressione di oncogeni. Tale osservazione potrebbe giustificare la predisposizione a sviluppare il carcinoma epatocellulare nei pazienti cirrotici.

Uno studio di microarray condotto su un numero elevato di pazienti (53 campioni di tessuto epatico da pazienti HCV e 23 campioni di controllo da soggetti non infetti) ha confermato che l'induzione nel fegato dei geni del sistema dell'IFN α/β e di quelli coinvolti nella risposta immune, è tipica dei pazienti infettati con l'HCV (Smith M.W. et al., 2006). Tuttavia, l'attivazione di questi geni è soppressa o ridotta nel fegato di pazienti trapiantati che sviluppano una fibrosi precoce (entro il primo anno dal trapianto in seguito all'infezione dell'organo trapiantato). Ciò suggerisce che una risposta non adeguata all'infezione può contribuire alla progressione della malattia. Questo studio ha permesso inoltre di selezionare una serie di marcatori genici che vengono indotti durante la fase iniziale di progressione a fibrosi. Sulla base dei dati ottenuti, gli Autori suggeriscono la possibilità futura di utilizzare questi marcatori per identificare i pazienti trapiantati che sono a rischio di fibrosi, eseguendo un microarray su biopsie epatiche in una fase precoce dopo il trapianto (Smith M.W. et al., 2006).

Una lavoro di microarray di recente pubblicazione ha evidenziato alcuni meccanismi che influenzano il tipo di risposta alla terapia con Interferone (Sarasin-Filipowicz M et al., 2008). La terapia attuale, che consiste in una combinazione di IFN α peghilato (pegIFN α) e ribavirina, determina l'eliminazione del virus solo nel 50-60 % dei pazienti infettati con HCV di genotipo 1b. Lo studio di microarray ha rilevato che pazienti cronici con una forte induzione a livello epatico di geni regolati dall'Interferone se sottoposti alla terapia non rispondono efficacemente. Quindi, l'espressione di questi geni non solo risulta inefficace per l'eliminazione del virus (si tratta infatti di pazienti con infezione cronica) ma è anche refrattaria ad un'ulteriore stimolazione dopo trattamento con Interferone terapeutico (pegIFN α). Questo meccanismo di pre-attivazione dei geni dell'IFN sembra quindi ostacolare la risposta alla terapia.

Profili di espressione genica in sistemi cellulari di replicazione dell'HCV RNA

Negli ultimi anni la tecnologia del microarray è stata impiegata per analizzare, in opportuni sistemi cellulari, l'effetto che la replicazione dell'HCV RNA produce sull'espressione dei geni cellulari. In particolare, in uno studio pubblicato di recente (Ciccaglione A.R. et al., 2008) e realizzato dal nostro gruppo di lavoro, abbiamo eseguito esperimenti di microarray su linee cellulari di origine epatica (cellule Huh-7) contenenti molecole di HCV RNA in grado di replicare

in maniera autonoma e di esprimere tutte le proteine virali. Questo sistema sperimentale è noto con il nome di replicone HCV. La tecnologia impiegata ci ha permesso di rilevare geni cellulari modulati dall'HCV, la cui identificazione si è dimostrata interessante sia per la comprensione di alcuni meccanismi patogenetici che per il potenziale sviluppo di nuove terapie antivirali.

Nel lavoro descritto abbiamo paragonato il profilo di espressione del replicone HCV, in particolare del clone cellulare 21-5, con quello delle cellule parentali Huh-7 e con quello delle stesse cellule 21-5 trattate con Interferone α per eliminare l'HCV RNA (cellule 21-5 curate). Per lo studio è stata utilizzata una piattaforma di microarray che permette di rilevare l'espressione di 31,700 probes che corrispondono a 27,868 geni umani. Il disegno sperimentale, illustrato nella Fig. 4., ha previsto l'analisi di due repliche biologiche (piastre di cellule) per ogni linea cellulare e di due repliche tecniche (vetrini di microarray) per ogni replica biologica, per un totale di 12 microarray. Il numero di geni differenzialmente espressi è stato calcolato filtrando i dati di espressione genica basandosi su un rapporto segnale/fondo (S/N) > 3 nel 75% delle repliche e un valore di $p \leq 0.05$.

Come mostrato nella Tabella 1, il numero di geni differenzialmente espressi che abbiamo ottenuto confrontando le cellule del replicone con le cellule curate (21-5 vs. 21-5c: dataset 1) o con le cellule parentali (21-5 vs. Huh-7: dataset 2) è di 690 ed 810 rispettivamente. Nei due confronti esaminati, 288 e 352 geni presentano rispettivamente un livello di espressione (FC: Fold Changes) maggiore o uguale a 2 rispetto al controllo. I risultati ottenuti dimostrano che la tecnologia del microarray è in grado di mettere in evidenza un programma trascrizionale specifico indotto dall'HCV nelle cellule contenenti il replicone.

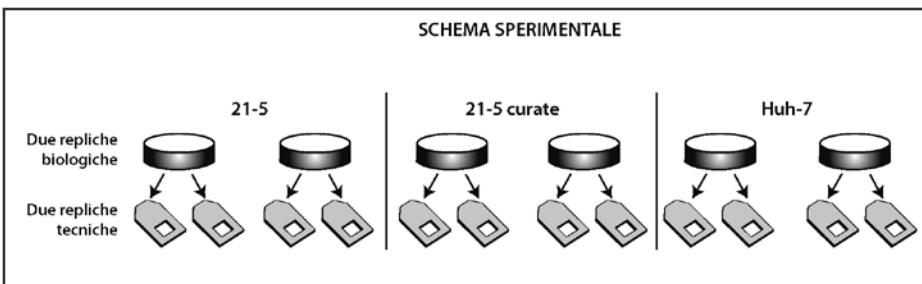


Figura 4. Microarray in sistemi cellulari di replicazione dell'HCV RNA. Disegno sperimentale: 21-5, clone di cellule Huh-7 contenente il replicone HCV; 21-5 curate, clone 21-5 pre-trattato con Interferone- α per eliminare l' HCV-RNA; Huh-7, linea parentale.

Geni	Confronto	
	21-5 vs. 21-5c (dataset 1)	21-5 vs. Huh-7 (dataset 2)
Totale	733	865
Correnti*	690	810
FC** ≥ 2	288	352
FC ≥ 2 (attivati)	112	250
FC ≥ 2 (inibiti)	176	102

*Numero di geni dopo l'esclusione di pseudogeni e geni obsoleti.
** Fold Changes

Tabella 1. Numero di geni differenzialmente espressi ($p \leq 0.05$).

Nel tentativo di valutare l'espressione dei geni identificati in cloni di replicone differenti, abbiamo eseguito una seconda analisi di microarray. In questo caso sono stati considerati i profili di espressione provenienti sia dal clone 21-5 che dai cloni 22-6 e 21-7, e dalle cellule parentali Huh-7. L'analisi ha indicato che 725 geni vengono modulati dall'HCV in tutti i cloni di replicone rispetto alle cellule Huh-7 (confronto cloni HCV vs. Huh-7: dataset 3, nella Fig. 5, pannello B).

Infine, allo scopo di ottenere una lista il più possibile affidabile di geni regolati dall'HCV, abbiamo deciso di selezionare solo i geni modulati in tutti i cloni che risultassero sia dal confronto con le cellule parentali che dal confronto con le cellule curate. Come mostrato nella Fig. 5, abbiamo utilizzato per la procedura di selezione una serie di diagrammi di Venn che sono stati applicati ai tre datasets di geni a disposizione. Questa procedura ha portato all'identificazione di 104 geni comuni e con espressione concorde (cioè attivati o inibiti in entrambi i gruppi) nei datasets 1 e 2 (Fig. 5, pannello A). Per i datasets 1 e 3 il numero di geni comuni e con espressione concorde è risultato pari a 58 geni (Fig. 5, pannello B). Infine, la sovrapposizione dei 104 e 58 geni ci ha consentito di selezionare 39 geni comuni che rappresentano la lista finale di geni modulati dall'HCV in tutti i cloni di replicone e rispetto ad entrambi i controlli negativi (Fig. 5, pannello C).

La classificazione ontologica attraverso il sistema di classificazione delle proteine Panther (Mi H. et al., 2005), ci ha permesso di raggruppare i 39 geni in una serie di categorie funzionali. Dal confronto con la lista di referenza del genoma umano dell'NCBI, la lista dei 39 geni contiene una maggiore proporzione di geni che codificano per proteine capaci di legare gli acidi nucleici, quali istoni e proteine ribosomiali, oltre a geni coinvolti nella segregazione dei cromosomi e nella trascrizione dell'RNA messaggero. Inoltre, sono rap-

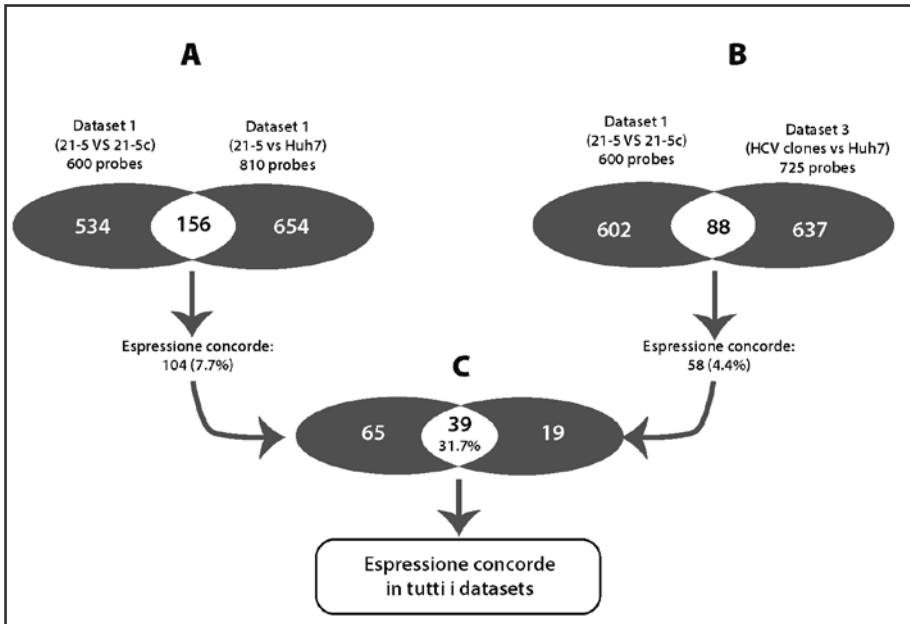


Figura 5. Procedura di selezione dei geni modulati dall' HCV nei differenti cloni di replicone.

presentati in maniera significativa in questa lista anche geni coinvolti nella formazione della matrice extracellulare e nel traffico proteico intracellulare (Ciccaglione A.R. et al., 2008).

In sintesi, la nostra analisi ha fornito una visione globale dei cambiamenti indotti dall'HCV sul profilo di espressione dei geni cellulari. La classificazione ontologica dei geni ha permesso di identificare categorie funzionali rilevanti sia per la biologia che per la patogenesi virale. Un altro aspetto importante del nostro studio riguarda le possibili applicazioni in campo terapeutico. L'identificazione tramite microarray di un numero definito di geni modulati dall'HCV rappresenta infatti una risorsa potenziale per lo sviluppo di nuove terapie antivirali. A questo proposito, è possibile disegnare opportune molecole di RNA interferenti (siRNA) che, legandosi a specifici RNA messaggeri (quelli up-regolati dal virus) ne bloccano la traduzione e permettono di valutare il ruolo svolto dal gene corrispondente nella regolazione della replicazione dell'HCV. Quindi, l'impiego del microarray ed il successivo allestimento di sistemi sperimentali per la valutazione funzionale dei geni modulati, può rappresentare un punto di partenza fondamentale per la selezione di nuove molecole ad azione antivirale.

Conclusioni e prospettive future

Lo sviluppo della tecnologia del microarray ha consentito negli ultimi anni di valutare simultaneamente l'espressione di migliaia di geni, aprendo il campo ad una nuova e più complessa interpretazione dei fenomeni patologici. Nel settore delle malattie infettive l'applicazione crescente di queste tecniche porterà ad una vera e propria esplosione di nuovi marcatori biologici per l'identificazione precoce del tipo di risposta ad un dato trattamento terapeutico e per lo screening della malattia. In conclusione, il microarray è un nuovo strumento di indagine che offre un enorme potenziale sia per il miglioramento del trattamento terapeutico che per la comprensione dei meccanismi molecolari di patogenesi nelle infezioni virali

Bibliografia

- Bigger C.B., Guerra B., Brasky K.M., Hubbard G., Beard M.R., Luxon B.A., Lemon S.M., Lanford R.E.: Intrahepatic gene expression during chronic hepatitis C virus infection in chimpanzees. *J Virol* 2004, VOL:78(24), P:13779.
- Ciccaglione A.R., Marcantonio C., Tritarelli E., Tataseo P., Ferraris A., Bruni R., Dallapiccola B., Gerosolimo G., Costantino A., Rapicetta M.: Microarray analysis identifies a common set of cellular genes modulated by different HCV replicon clones. *BMC Genomics* 2008 Jun, VOL:9(1), P:309.
- Helbig K.J., Ruzskiewicz A., Semendric L., Harley H.A., McColl S.R., Beard M.R.: Expression of the CXCR3 ligand I-TAC by hepatocytes in chronic hepatitis C and its correlation with hepatic inflammation. *Hepatology* 2004, VOL:39(5), P:1220.
- Helbig K.J., Lau D.T., Semendric L., Harley H.A., Beard M.R.: Analysis of ISG expression in chronic hepatitis C identifies viperin as a potential antiviral effector. *Hepatology* 2005 Sep, VOL: 42(3), P:702.
- Lau D.T., Luxon B.A., Xiao S.Y., Beard M.R., Lemon S.M.: Intrahepatic gene expression profiles and alpha-smooth muscle actin patterns in hepatitis C virus induced fibrosis. *Hepatology* 2005 Aug, VOL: 42(2), P:273.
- Mele A., Tosti M.E., Spada E., Mariano A., Bianco E., and SEIEVA Collaborative Group.: Epidemiology of acute viral hepatitis: twenty years of surveillance through SEIEVA in Italy and a review of the literature. *Rapporti ISTISAN* 2006, 06/12

- Mi H., Lazareva-Ulitsky B., Loo R., Kejariwal A., Vandergriff J., Rabkin S., Guo N., Muruganujan A., Doremieux O., Campbell M.J., Kitano H., Thomas P.D.: The PANTHER database of protein families, subfamilies, functions and pathways. *Nucleic Acids Res* 2005, VOL:33, P:D284.
- Sarasin-Filipowicz M., Oakeley E.J., Duong F.H., Christen V., Terracciano L., Filipowicz W., Heim M.H.: Interferon signaling and treatment outcome in chronic hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 May, VOL:105(19), P:7034.
- Smith M.W., Yue Z.N., Korth M.J., Do H.A., Boix L., Fausto N., Bruix J., Carithers R.L. Jr, Katze M.G.: Hepatitis C virus and liver disease: global transcriptional profiling and identification of potential markers. *Hepatology* 2003 Dec, VOL:38(6), P:1458.
- Smith M.W., Walters K.A., Korth M.J., Fitzgibbon M., Proll S., Thompson J.C., Yeh M.M., Shuhart M.C., Furlong J.C., Cox P.P., Thomas D.L., Phillips J.D., Kushner J.P., Fausto N., Carithers R.L. Jr, Katze M.G.: Gene expression patterns that correlate with hepatitis C and early progression to fibrosis in liver transplant recipients. *Gastroenterology* 2006 Jan, VOL:130(1), P:179.
- Su A.I., Pezacki J.P., Wodicka L., Brideau A.D., Supekova L., Thimme R., Wieland S., Bukh J., Purcell R.H., Schultz P.G., Chisari F.V.: Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 Nov, VOL:99(24), P:15669.

Farmacogenomica: dal progetto genoma umano alla terapia personalizzata

Simona Gaudi¹, Fabio Macchiardi², Francesca Carlini¹, Romano Arcieri¹
e Stefano Vella¹

¹Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, ²Dipartimento di Scienze e tecnologie biomediche, Università degli Studi di Milano

Farmacogenetica e Farmacogenomica

La farmacogenomica è lo studio della predizione alla risposta ai farmaci in funzione del genotipo del paziente e rappresenta una delle applicazioni più recenti e attuali del Progetto Genoma Umano (Human Genome Project, HPG).

Il concetto di variazione interindividuale in risposta a un farmaco fu proposta per la prima volta nel 1909 da Garrod nel suo libro "The inborn errors of metabolism" (Garrod A.E., 1908). Nel 1959 il genetista tedesco Vogel coniò il termine farmacogenetica per indicare la scienza che si occupa delle basi ereditarie delle differenze interindividuali nell'azione dei farmaci (Vogel F., 1959). Verso la fine degli anni 60 fu osservato che alcuni pazienti che hanno il gene della 6-fostato deidrogenasi mutato, andavano incontro ad una severa emolisi dopo assunzione di un farmaco antimalarico. Questa scoperta fu in grado di spiegare come mai la gran parte degli Afro-americani, nei quali la mutazione di questo enzima è molto frequente, presentassero emolisi severa mentre i Caucasic discendenti degli abitanti del nord, est e ovest Europa non presentavano nessuna reazione avversa al medicinale (adverse drug reaction=ADR).

La farmacogenetica classica si è sempre concentrata sullo studio della variabilità genetica di alcuni geni responsabili di tale risposta. Le tecnologie disponibili, prima dello sviluppo del Progetto Genoma Umano, consentivano l'identificazione e l'analisi di solo alcuni geni coinvolti nei vari processi metabolici dei farmaci. Il sequenziamento completo del genoma umano e le tecnologie di analisi funzionale del genoma stesso, tra cui i microarray, hanno consentito lo studio dei polimorfismi (Single Nucleotide Polymorphism, SNP), dell'intero trascrittoma (tutto ciò che l'intero genoma trascrive, RNA) e proteoma (proteine) al fine di individuare tutte le componenti molecolari che dipendono dal genoma e che influenzano la risposta ai farmaci.

Dal 2001, quando per la prima volta è stato annunciato il sequenziamento del genoma umano, la ricerca farmacologica si è notevolmente evoluta.

L'avanzamento delle conoscenze molecolari di varie patologie ha permesso di identificare anche i "target" farmacologici genetici.

Ad oggi si conoscono circa 30.000 diverse patologie, di cui 100 - 150 sono le più comuni e conosciute, e per la maggior parte di esse non è ancora disponibile una cura o le terapie in uso presentano severi effetti collaterali e quindi l'esigenza di un trattamento farmacologico più adeguato è sempre più all'ordine del giorno.

Le ADRs, quali l'epatotossicità e le aritmie indotte, rappresentano uno dei problemi più significativi per lo sviluppo di nuovi farmaci. Le ADRs sono responsabili di oltre 63.000 morti all'anno negli USA in pazienti ospedalizzati e di oltre 43.000 morti l'anno in pazienti extraospedalieri (Lazarou J. et al., 1998). In Europa le ADRs sono responsabili del 4.2-6.0% di tutti i ricoveri ospedalieri (Muehlberger N. et al., 1997).

I fattori genetici costituiscono un ruolo molto importante nella patogenesi delle ADRs, la maggior parte degli enzimi coinvolti nel metabolismo dei farmaci più comuni sono altamente polimorfici: a varianti alleliche diverse si può associare una diversa funzionalità metabolica che può essere alta, normale o bassa.

La risposta ai farmaci è un fenomeno complesso che non si può ricondurre solo all'associazione di un polimorfismo di un enzima, ma è la risultante di più fattori genetici, epigenetici e ambientali.

La variabilità genetica tra un individuo ed un altro è stata stimata intorno allo 0.1%, e tale differenza è responsabile in associazione ad altri fattori nel determinare il successo o il fallimento di una terapia. La presenza di polimorfismi a base singola, SNPs, è la forma più comune di variabilità genetica tra gli individui. Evidenze sperimentali sempre più numerose associano la presenza di SNPs alla variabilità delle risposte farmacocinetiche e farmacodinamiche di un farmaco.

Soggetti con un particolare genotipo possono non essere in grado di metabolizzare particolari farmaci e quindi presentano un maggior rischio di reazioni avverse oppure di interazioni con altri farmaci. In altri casi la somministrazione di un farmaco può risultare inefficace se il paziente possiede un metabolismo troppo elevato.

Personal Genome Project

Dopo il sequenziamento del genoma umano, sono stati avviati numerosi progetti tra questi possiamo ricordare il progetto HapMap per l'identificazione dei polimorfismi responsabili della variabilità del DNA e il progetto ENCODE

(ENCYclopedia Of DNA Elements) con l'obiettivo di annotare l'intero genoma umano per spiegarne la funzionalità.

Queste conoscenze potrebbero condurre a definire percorsi terapeutici personalizzati sulla base dell'assetto genetico di ciascun individuo. La promessa di una medicina personalizzata ha fatto in modo che si istituisse alla Harvard University il "Personal Genome Project"[PGP (www.personalgenomes.org)].

Farmacogenomica e Genoma Implicito

Uno dei risultati più sorprendenti e inattesi ottenuti dal progetto di sequenziamento del genoma umano è stato proprio quello di constatare che il numero totale dei geni è decisamente inferiore a quello atteso e sorprendentemente simile a quello di organismi molto diversi (Lander E. et al., 2001, Venter J.C. et al., 2001): un semplice nematode come il *C. elegans* ha un numero di geni codificanti (~19,300) quasi uguale a quello umano (~20,000). Questo ha suggerito che il grado di complessità biologica di un organismo non può essere semplicemente il risultato del numero dei geni presenti nel suo DNA, ma, piuttosto, dal grado di complessità dei meccanismi che ne regolano l'espressione (Copley R., 2008, Stumpf M.P.H. et al., 2008). Nel genoma umano le sequenze codificanti occupano solo circa l'1.2% del genoma totale, devono dunque esistere un gran numero di informazioni addizionali che ne regolano l'espressione.

Lo sviluppo della farmacogenomica non può prescindere dallo studio del genoma in tutta la sua complessità: se infatti solo il 2% codifica per geni strutturali, è d'altronde vero che tutto il DNA è trascritto, quindi è verosimile che sia gli elementi regolatori sia quelli codificanti siano responsabili della variabilità genetica interindividuale e della variabilità nella risposta ai farmaci.

E' auspicabile che dai dati del sequenziamento completo del genoma umano e da quelli che si otterranno dal PGP (Personal Genome Project), sarà possibile disegnare terapie mirate in funzione della risposta farmacologica, individuale o di popolazione.

La ricerca oggi mira a caratterizzare non solo la variabilità dei singoli individui, ma anche componenti sovraindividuali che sono correlate al diverso sviluppo evolutivo delle popolazioni. Infatti, è stato determinato che la diversa frequenza di polimorfismi in alcuni geni è correlata anche ad un diverso rischio di malattia e ad una diversa risposta ai farmaci in popolazioni che hanno origini ancestrali differenti.

Ad esempio, un recente studio sull'efficacia e possibili effetti collaterali di alcuni farmaci antipsicotici in soggetti con diagnosi di schizofrenia, ha dimostrato una correlazione tra variazioni alleliche nel gene RGS4 e la risposta a tali farmaci. E' importante sottolineare che il prodotto del gene RGS4 è coinvolto nella regolazione di importanti recettori del Sistema Nervoso Centrale e studi su pazienti di origine Afroamericana e Caucasica hanno dimostrato una differente risposta al trattamento con farmaci antipsicotici (Campbell D.B. et al. 2008).

La Farmacoepigenomica

La ricerca sul cancro e sulle cellule staminali ha gradualmente focalizzato l'attenzione sulle mutazioni o modificazioni epigenetiche.

In sintesi: enzimi, fattori di trascrizione e frammenti di RNA possono convergere su particolari sequenze del DNA, modificandone chimicamente la struttura.

Le modificazioni epigenetiche producono un rimodellamento della struttura della cromatina e modulano l'espressione dei geni adiacenti. Tali meccanismi vengono definiti epigenetici in quanto, pur non producendo alterazioni stabili nel codice del DNA, sono ugualmente in grado di indurre modificazioni trasmissibili del fenotipo sia per via mitotica che meiotica (Weinhold B., 2006).

Molti sono i processi epigenetici finora identificati che determinano modificazioni della cromatina. Il più studiato è la metilazione del DNA, che avviene nelle zone ricche in residui di citosina (CpG-islands). La metilazione reprime la trascrizione sia direttamente, inibendo il legame dei fattori di trascrizione, sia indirettamente, reclutando proteine che legano le sequenze CpG-metilate.

Altri meccanismi di controllo epigenetico comportano modificazioni covalenti della coda degli istoni, come l'acetilazione, la fosforilazione, l'ubiquitinazione. Queste modificazioni alterano la struttura degli istoni, influenzando l'organizzazione dei complessi cromatinici e quindi l'accessibilità all'informazione genetica (Gopalakrishnan S. et al. 2008, Hadnagy A. et al., 2008). In generale, si può dire che quanto più la cromatina è condensata tanto più la trascrizione risulta repressa.

Un altro meccanismo epigenetico è costituito da alcune forme di RNA, come i miRNA (micro RNA) e i siRNA (small interfering RNAs). Si tratta di piccole molecole di 21-25 nucleotidi che agiscono come "reostati cellulari" (*modulatori*) nella regolazione fine dell'espressione genica durante

lo sviluppo e la differenziazione che hanno come bersaglio il 3' UTR degli mRNA, (untranslated region) regioni coinvolte nell'espressione, stabilizzazione, localizzazione ed efficienza traduzionale degli RNA messaggeri (Wang Y. et al. 2008, Kim D. e Rossi 2008).

I meccanismi epigenetici regolano dunque i "pattern" di espressione che sono alla base dello sviluppo embrionale, del differenziamento cellulare, della risposta delle cellule a segnali ambientali come ormoni, nutrienti, stress, invecchiamento e danno cellulare.

L'innovazione tecnologica di questi ultimi anni ha trasformato ed ampliato le conoscenze nel campo dell'epigenetica. Tecniche quali i *microarrays*, *ultra-high-throughput sequencing*, e altre ancora, sono state utilizzate per mappare nel genoma le modificazioni della cromatina, la metilazione delle cisteine e gli RNA non codificanti, con una risoluzione al livello di proteosoma, dell'ordine di poche centinaia di basi. Questa alta capacità di risoluzione sta già permettendo di identificare differenze tra l'epigenoma di tessuti primari normali e campioni patologici, così come fra le diverse popolazioni cellulari che compongono un organismo.

Alterazioni della regolazione epigenetica sono state correlate ad un gran numero di patologie umane. Le prove che legano il cancro a processi epigenetici sono sempre più convincenti infatti è stato dimostrato che i tumori umani sono spesso caratterizzati da uno "sbilanciamento" del pattern di metilazione, dove l'ipometilazione del genoma è accompagnata da zone ipermetilate in corrispondenza dei geni oncosoppressori. Lo stato complessivo di metilazione in una cellula sembra essere anche un fattore accelerante della carcinogenesi, come suggerisce l'evidenza che l'ipometilazione genomica può portare ad instabilità cromosomica e ad un aumento del tasso di mutazione (Zhong S. et al. 2007, Zheng Y.G. et al., 2008): inoltre lo stato di metilazione di alcuni geni può essere usata come "biomarker" per la tumorigenesi (Dario L.S. et al., 2008).

Alterazioni dell'epigenoma sono state associate ad un gran numero di altre patologie quali diabete, malattie cardiovascolari, disordini neurologici e patologie di tipo auto-immune (Connor C.M. e Akbarian S., 2008, Abel T. e Zukin R.S., 2008).

Il fatto che molte delle maggiori patologie umane possano avere una origine epigenetica ha fornito il razionale per lo studio e la sperimentazione di farmaci in grado di rimodellare la cromatina, aprendo la strada ad un nuovo approccio terapeutico di tipo epigenetico. Diversi inibitori degli enzimi responsabili delle modificazioni della cromatina, quali gli inibitori delle istone-deacetilasi e delle DNA metil-transferasi, hanno dato risultati interessanti nella regressione dei tumori e sono già in fase di sperimentazione clinica (Oki Y. e Issa J.P., 2006), così come sono in aumento gli studi sul potenziale terapeutico dei miRNA (Lawrie C.H., 2008).

La terapia epigenetica sta dunque diventando una realtà (Egger G. et al., 2004). Tuttavia per sfruttare al massimo questa nuova possibilità sarà fondamentale studiare e caratterizzare in modo approfondito i cambiamenti epigenetici che accompagnano il differenziamento e il rinnovamento cellulare, sia in condizioni normali che patologiche. Sarà insomma necessario tentare di decodificare l'epigenoma umano, così come già avvenuto per il genoma. A questo scopo sono stati avviati progetti internazionali come il progetto ENCODE, proposto nel 2003 dall'US National Human Genome Research Institute (NHGRI) di Bethesda, che ha come scopo quello di mappare le sequenze genomiche funzionali, o l'Alliance for the Human Epigenome and Disease (AHEAD) Project, il cui scopo sarà quello di fornire epigenomi di riferimento relativi a specifici stati cellulari chiave come la proliferazione, il differenziamento, la senescenza o lo stress. Usando un nucleo comune di campioni di riferimento si cercherà di sviluppare procedure sperimentali standardizzate, cercando di sviluppare un'infrastruttura informatica di supporto per la raccolta e l'analisi dei dati.

Questo permetterà in futuro una comprensione più approfondita dei normali processi di sviluppo e differenziamento, dell'invecchiamento, delle alterazioni del controllo genico nel cancro ed in altre condizioni patologiche, nonché l'influenza esercitata dai fattori ambientali sulla salute umana (The American Association for Cancer Research).

Farmacogenomica e schizofrenia

Per meglio comprendere l'importanza della farmacogenomica nella ricerca clinica, illustriamo come esempio significativo lo studio della schizofrenia in risposta al trattamento con farmaci antipsicotici.

Gli studi di farmacogenetica nel campo delle patologie psichiatriche, ed in particolare della schizofrenia, avanzano molto rapidamente. A tale riguardo l'NIH (National Institutes of Health) ha finanziato uno studio relativo alla identificazione di geni che controllano la risposta a farmaci antipsicotici.

Nello studio della schizofrenia la ricerca attuale mostra che l'applicazione congiunta di metodologie tra loro complementari offre enormi potenzialità d'indagine. L'associazione tra studi molecolari e tecniche diagnostiche convenzionali hanno permesso di evidenziare il ruolo dei meccanismi genetici nella risposta ai farmaci e ai loro effetti collaterali (Thelma B. et al. 2008, Lerer B. et al., 2002).

Nel primo lavoro storico che ha utilizzato questo approccio (Potkin S.G. et al., 2003), è stato così possibile "vedere" come lo stesso farmaco, in questo

caso la clozapina, inducesse o meno nei pazienti un miglioramento metabolico e quindi un miglioramento clinico correlato a seconda del profilo genetico dei pazienti trattati relativamente al gene che codifica per il recettore D1 della Dopamina (DRD1). I pazienti che erano omozigoti per un particolare polimorfismo funzionale del gene DRD1 presentavano una riduzione dell'attività metabolica in tutte le principali regioni corticali cerebrali. A questa si accompagnava una riduzione del 30% del punteggio secondo la scala BPRS (Brief Psychiatric Rating Scale), indicativo dell'efficacia del trattamento con clozapina.

Ovviamente, per un problema essenzialmente di costi e di complessità, non è possibile applicare un simile protocollo molecolare d'indagine a tutti quei pazienti che, per esempio, non rispondono ad un farmaco antipsicotico.

Comunque è importante giungere alla determinazione dei meccanismi funzionali legati al profilo genico poiché essa permetterà di comprendere il ruolo dei geni nelle funzioni o disfunzioni cerebrali. Quando tale traguardo sarà raggiunto, sarà allora possibile scegliere il miglior trattamento farmacologico per un dato paziente, sapendo a priori l'effetto ed i meccanismi funzionali del farmaco sul gene. Con la rapida accelerazione di conoscenze impresse dalle tecnologie attuali, questo obiettivo è potenzialmente realizzabile in tempi relativamente brevi. Bisogna però sottolineare l'esigenza di un coordinamento tra i ricercatori, dal momento che nessuna istituzione isolata sarà in grado di affrontare i costi elevati e le difficoltà di analisi imposte da tali studi (Sullivan P.F. et al., 2008)

Conclusioni

Le continue scoperte e la sorpresa che il genoma umano è costituito in gran parte da sequenze ripetute hanno complicato ulteriormente il paradigma che prevede una associazione strettissima tra genotipo e fenotipo. Per poter disegnare una terapia che si adatti il meglio possibile al genotipo di un paziente bisogna considerare non solo il suo DNA ma la sua espressione, la sua traduzione e la sua regolazione epigenetica. In aiuto alla farmacogenomica intervengono le più attuali piattaforme di genomica funzionale di cui i microarray costituiscono una realtà sempre più vicina. L'insieme di queste ricerche e metodologie potranno in futuro portare verso una terapia personalizzata tenendo conto della reale complessità dell'individuo.

Bibliografia

- Abel T., Zukin RS.: Epigenetic targets of HDAC inhibition in neurodegenerative and psychiatric disorders. *Curr Opin Pharmacol* 2008 Feb, VOL: 8(1), P:57.
- Campbell D.B., Ebert P.J., Skelly T., Stroup T.S., Lieberman J., Levitt P., Sullivan P.F.: Ethnic Stratification of the Association of RGS4 Variants with Antipsychotic Treatment Response in Schizophrenia. *Biological Psychiatry* 2008 Jan, VOL:63(1), P:32.
- Connor C.M., Akbarian S.: DNA methylation changes in schizophrenia and bipolar disorder. *Epigenetics* 2008 Mar-Apr, VOL: 3(2), P:55.
- Copley R.: The animal in the genome: comparative genomics and evolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2008 Apr 27, VOL:363(1496), P:1453.
- Dario L.S., Rosa M.A., Mariela E., Roberto G., Caterina C.: Chromatin remodeling agents for cancer therapy. *Rev Recent Clin Trials* 2008 Sep, VOL: 3(3), P:192.
- Egger G., Liang G., Aparicio A., Jones PA.: Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004 May, VOL: 429(6990), P: 457.
- Garrod AE.: *The inborn errors of metabolism*. London. Oxford University Press. 1908.
- Gopalakrishnan S., Van Emburgh B.O., Robertson KD.: DNA methylation in development and human disease. *Mutat Res* 2008 Dec, VOL: 647(1-2), P:30.
- Hadnagy A., Beaulieu R., Balicki D.: Histone tail modifications and non-canonical functions of histones: perspectives in cancer epigenetics. *Mol Cancer Ther* 2008 Apr, VOL: 7(4), P: 740.
- Kim D., Rossi J.: RNAi mechanisms and applications. *Biotechniques* 2008 Apr, VOL: 44(5), P: 613.
- Lander E., et al.: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001 Feb, VOL:409(6822), P: 860.
- Lawrie C.H.: microRNA expression in lymphoid malignancies: new hope for diagnosis and therapy?. *J Cell Mol Med* 2008 Jun 24. [Epub ahead of print]
- Lazarou J., Pomeranz B.H., Corey P.N.:Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA* 1998 Apr, VOL:279(15), P:1200.
- Lerer B., Segman R.H., Fangerau H., Daly A.K., Basile V.S., Cavallaro R., Aschauer H.N., McCreddie R.G., Ohlraun S., Ferrier N., Masellis M., Verga M., Scharfetter J., Rietschel M., Lovlie R., Levy U.H., Meltzer H.Y., Kennedy J.L., Steen V.M., Macciardi F.: Pharmacogenetics of tardive dyskinesia:

- combined analysis of 780 patients supports association with dopamine D3 receptor gene Ser9Gly polymorphism. *Neuropsychopharmacology* 2002 Jul, VOL:27(1), P:105.
- Muehlberger N., Schneeweiss S., Hasford J.: Adverse drug reaction monitoring - cost and benefit considerations, part I. Frequency of adverse drug reactions causing hospital admissions. *Pharmacoepidemiol Drug Safety* 1997 Oct, VOL: 6 (Suppl 3), P: S71.
- Oki Y., Issa J.P.: Review: recent clinical trials in epigenetic therapy. *Rev Recent Clin Trials* 2006 May, VOL: 1(2), P: 169.
- Potkin S.G., Basile V.S., Jin Y., Masellis M., Badri F., Keator D., Wu J.C., Alva G., Carreon D.T., Bunney W.E. Jr, Fallon J.H., Kennedy J.L.: D1 receptor alleles predict PET metabolic correlates of clinical response to clozapine. *Mol Psychiatry* 2003 Jan, VOL:8(1), P:109.
- Stumpf M.P., Thorne T., de Silva E., Stewart R., An H.J., Lappe M., Wiuf C.: Estimating the size of the human interactome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 May, VOL: 105(19), P: 6959.
- Sullivan P.F., Lin D., Tzeng J.Y., van den Oord E., Perkins D., Stroup T.S., Wagner M., Lee S., Wright F.A., Zou F., Liu W., Downing A.M., Lieberman J., Close S.L.: Genomewide association for schizophrenia in the CATIE study: results of stage 1. *Mol Psychiatry* 2008, VOL: 13(6), P:570.
- Thelma B., Srivastava V., Tiwari A.K.: Genetic underpinnings of tardive dyskinesia: passing the baton to pharmacogenetics. *Pharmacogenomics* 2008. VOL:9(9), P:1285.
- Venter J.C., Adams M.D., Meyers E.W., Li P.W., Mural R.J., Sutton G.G., et al.: The sequence of the human genome. *Science* 2001 Feb, VOL: 291 (5507), P: 1304.
- Vogel F.: Moderne probleme der Humangenetik. *Ergebn. Inn. Med. Kinderheilk* 1959, VOL: 12, P: 52.
- Wang Y., Liang Y., Lu Q.: MicroRNA epigenetic alterations: predicting biomarkers and therapeutic targets in human diseases. *Clin Genet* 2008 Oct, VOL:74(4), P:307.
- Weinhold B.: Epigenetics: The Science of Change. *Environ Health Perspect* 2006 March, VOL:114(3), P: A160.
- Zheng Y.G., Wu J., Chen Z., Goodman M.: Chemical regulation of epigenetic modifications: opportunities for new cancer therapy. *Med Res Rev* 2008 Sep, VOL: 28(5), P:645.
- Zhong S., Fields C.R., Su N., Pan Y.X., Robertson K.D.: Pharmacologic inhibition of epigenetic modifications, coupled with gene expression profiling, reveals novel targets of aberrant DNA methylation and histone deacetylation in lung cancer. *Oncogene* 2007 Apr, VOL: 26(18), P: 2621.

Impiego degli allergeni ricombinanti nello sviluppo di sistemi microarray per la diagnosi delle patologie allergiche

Barbara Brunetto, Carlo Pini, Raffaella Tinghino, Patrizia Iacovacci
*Centro per la Ricerca e Valutazione dei Prodotti Immunobiologici, Istituto
Superiore di Sanità*

Le patologie allergiche, epidemiologia e fattori coadiuvanti

Le patologie allergiche possono essere definite come un insieme di affezioni che si manifestano con quadri clinici diversi (rinite, congiuntivite, asma, dermatite, orticaria, shock anafilattico) determinate da sostanze varie, chiamate allergeni, che sono innocue per i soggetti normali ma inducono specifici sintomi nei soggetti divenuti ad esse sensibili. In particolare, l'atopia o allergia è una reazione dell'organismo diretta contro un allergene, il cui sviluppo è legato a varie cause genetiche ed ambientali e che coinvolge molteplici componenti cellulari ed umorali del sistema immunitario.

Numerosi studi epidemiologici riportano un crescente incremento nella prevalenza delle malattie allergiche nel corso degli ultimi venti anni. Infatti, in alcune aree geografiche a più intenso sviluppo economico gli studi epidemiologici disponibili riportano una prevalenza della rinite allergica stimabile intorno al 30% della popolazione adulta, mentre per l'asma i valori sono fra il 4% e l'11% [Janson et al., 2001]. Un aspetto rilevante è la rapidità con cui si è verificato questo fenomeno di espansione delle patologie allergiche, che si suppone in relazione con cambiamenti ambientali quali il clima e l'inquinamento industriale [Von Mutius and Schmid, 2006; Upham and Holt, 2005].

Le manifestazioni patologiche dell'allergia costituiscono un rilevante problema di salute pubblica, con elevati costi sociali legati sia alle spese dirette per la diagnosi, la prevenzione e la terapia, sia a quelle indirette dovute alla perdita di giornate lavorative e scolastiche [European Allergy White Paper 1997].

Allergeni e allergeni ricombinanti

Con il termine allergene si intende una sostanza in grado di indurre, in condizioni di particolare esposizione, una risposta anticorpale IgE con concomitante sensibilizzazione allergica. Le sostanze con proprietà allergeniche possono essere di origine vegetale, animale o sintetica, come pollini di numerose specie di piante, alimenti di origine vegetale ed animale, epiteli, piume, acari, veleni di imenotteri e farmaci.

Le strategie di natura biochimica per ottenere le molecole allergeniche consistono soprattutto in procedure di estrazione dalle strutture che le contengono. Gli estratti grezzi, contenenti diverse molecole sia allergeniche che non, rappresentano il materiale di partenza per le procedure di caratterizzazione e purificazione dei singoli allergeni mediante l'impiego di tecniche biochimiche ed immunochimiche.

Attualmente, per la diagnosi e l'immunoterapia specifica (ITS) delle patologie allergiche vengono impiegati estratti allergenici totali, fortemente eterogenei, in quanto le componenti allergeniche rilevanti possono essere presenti in quantità molto diverse fra differenti preparazioni, mentre alcune componenti possono essere addirittura assenti. Risulta quindi evidente l'importanza di un processo di caratterizzazione e standardizzazione di tali estratti, seguito, ove possibile dall'isolamento delle molecole allergeniche più rilevanti.

La precisa struttura di molti degli allergeni responsabili delle patologie allergiche è rimasta sconosciuta fino al momento in cui la tecnologia del DNA ricombinante è stata applicata alla produzione degli allergeni. Gli allergeni ricombinanti, prodotti grazie all'espressione del cDNA codificante per l'allergene stesso in sistemi procariotici (*Escherichia coli*) e/o eucariotici (*Pichia pastoris*), presentano generalmente le caratteristiche immunologiche dei corrispondenti allergeni nativi e per questo motivo è stato proposto il loro utilizzo in diagnosi sia *in vitro* che *in vivo*, nonché il loro potenziale impiego nella immunoterapia specifica (ITS). Di fatto l'utilizzo in diagnosi di un pannello quanto più ampio possibile di molecole allergeniche ricombinanti, permette la determinazione del profilo individuale di sensibilizzazione del paziente basato sulla singola componente ("Component Resolved Diagnosis": CRD). La CRD a sua volta consente di effettuare il trattamento immunoterapeutico desensibilizzante con le sole componenti verso cui il paziente è realmente sensibilizzato ("Component Resolved Immunotherapy": CRIT) [Valenta et al. 1999, Mothes et al. 2006]. Quest'ultimo aspetto è particolarmente interessante poiché è stato dimostrato che, in seguito al trattamento immunoterapeutico con l'estratto totale, il paziente può presentare nuove sensibilizzazioni [Móvérare et al. 2002] dovute proprio alla presenza di molteplici componenti nell'estratto totale.

Diagnosi delle patologie allergiche

Sulla base delle conoscenze dei meccanismi patogenetici delle malattie allergiche e del ruolo preminente svolto dagli anticorpi IgE, la diagnosi di queste patologie si basa su due momenti fondamentali: l'anamnesi clinica effettuata dallo specialista allergologo e la determinazione delle IgE specifiche per un determinato allergene prodotte dai soggetti sensibili, mediante saggi *in vivo* e *in vitro*.

Le metodologie diagnostiche *in vivo* comprendono le prove cutanee e i test di provocazione. Attualmente il test più impiegato è lo "Skin Prick Test" (SPT) [Malling, 1997], che si effettua deponendo una goccia di soluzione dell'allergene sulla cute del soggetto e praticando in corrispondenza una leggera abrasione. Come controllo positivo della reazione cutanea viene utilizzata una soluzione di istamina (1 mg/ml) e come controllo negativo il diluente dell'estratto allergenico. La reazione positiva si manifesta con la formazione di un pomfo e di un eritema che viene poi valutato in modo semiquantitativo in base a parametri definiti.

I test di provocazione ricoprono un ruolo fondamentale nella diagnosi delle allergie agli alimenti. Infatti in questo caso il test decisivo è identificabile con il saggio denominato "double blind, placebo-controlled food challenge" (DBPCFC). Tale procedura consiste nella somministrazione graduale in doppio cieco al paziente di quantità crescenti dell'alimento sospetto, in comparazione con una preparazione simile di una sostanza inerte (placebo) [Sicherer, 1999]. Nonostante il valore decisivo di questo saggio, alcune cautele nella sua applicazione riguardano l'impiego in pazienti con storia clinica di gravi anafilassi con pericolo di reazioni fatali, e la qualità del materiale allergenico usato, per il quale è spesso necessario migliorare i livelli di standardizzazione.

Le prove diagnostiche *in vitro* si basano, invece, sulla determinazione delle IgE sieriche specifiche verso i singoli estratti allergenici, mediante saggi immunologici disponibili in commercio basati sul principio del "Radio-Allergo-Sorbent-Test" (RAST) sviluppato agli inizi degli anni '80 [Adkinson, 1980] e delle sue varianti più recenti [Deinhofer et al. 2004].

In questa categoria di test analitici l'estratto allergenico, coniugato su diversi tipi di fasi solide ottimizzate a questo scopo, è posto a contatto con il siero in esame. Le IgE specifiche eventualmente presenti nel siero esaminato vengono successivamente evidenziate, mediante riconoscimento da parte di anticorpi anti-IgE marcati con traccianti che possono essere radioattivi, enzimatici o chemiluminescenti. La concentrazione delle IgE sieriche viene valutata grazie al confronto con uno standard internazionale (WHO 2nd IRP) ed espressa in vari sistemi di Unità con opportuni valori soglia ed eventualmente definizioni di classi di positività.

L'impiego nei saggi diagnostici *in vivo* e *in vitro* prevede, a tutt'oggi, l'uso di estratti allergenici non completamente caratterizzati e standardizzati e pone dei limiti alla validità e riproducibilità dei risultati. Tali limiti, come sottolineato nel paragrafo precedente e come vedremo in seguito, potrebbero essere superati grazie alla disponibilità dei singoli allergeni ricombinanti purificati e al loro impiego per lo sviluppo di sistemi microarray.

Applicazioni del microarray alla diagnosi delle patologie allergiche

La disponibilità degli allergeni ricombinanti ha permesso lo sviluppo di sistemi microarray per la diagnosi delle patologie allergiche. Per contraddistinguerli dagli altri tali microarray verranno, in questa rassegna, chiamati microarray-All. Questi microarray-All sono costituiti da linee ordinate di elementi microscopici disposti su un supporto, solitamente un vetrino, su cui è possibile immobilizzare, sotto forma di *spot*, sia acidi nucleici che proteine capaci di riconoscere e legare molecole complementari. Nel caso di sistemi microarray-All messi a punto per la diagnosi delle allergie, gli *spots* sono costituiti da proteine ed in particolare da allergeni ricombinanti, mentre il campione da analizzare è costituito dal siero del paziente allergico che può contenere gli anticorpi della classe IgE solitamente presenti nel siero del paziente allergico.

La tecnica consiste nel disporre il campione in esame sul vetrino e valutare il livello di legame tra il campione e gli *spots* (legame tra antigene e anticorpo specifico). Nel sistema di microarray-All la fase di coniugazione dell'allergene al supporto avviene attraverso una serie di passaggi che portano all'instaurarsi di un legame di tipo covalente tra proteina e supporto stesso. A seconda della tensione di superficie della soluzione del singolo allergene, il diametro degli *spots* può variare da 180 a 250 μm mentre, la concentrazione proteica, corrisponde a circa 1 ng di proteina per singolo *spot*. Ciascun allergene ricombinante è disposto in triplicato sul vetrino e l'intero sistema può essere conservato a temperatura ambiente fino al momento dell'uso [Deinhofer et al. 2004]. L'esecuzione del saggio è abbastanza semplice, dopo aver effettuato un lavaggio al vetrino, vanno dispensati 20 μl di siero del paziente, a questo passaggio segue un'incubazione al termine della quale verrà effettuato un ulteriore lavaggio per rimuovere gli anticorpi IgE non legati all'allergene [Harwanegg e Hiller 2005]. L'avvenuto legame delle IgE specifiche viene poi valutato tramite l'aggiunta di anticorpo fluorescente specifico per le IgE umane ed infine, dopo opportuna incubazione e lavaggio, il vetrino può essere analizzato tramite scansione con laser fluorescente collegato ad un software che analizza l'intensità della fluorescenza, stabilendo il livello di positività del siero verso i vari allergeni (Fig.1).

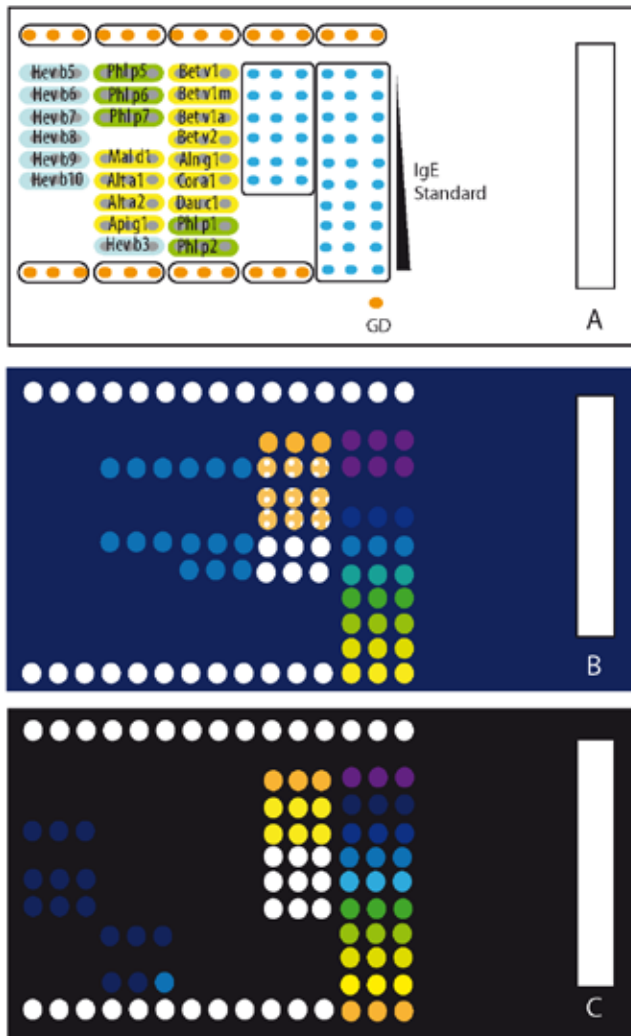


Figura 1. Test diagnostico microarray con allergeni ricombinanti basato sulla singola componente o CRD (component-resolved diagnosis). (A) Curva di calibrazione standard con IgE umane purificate e allergeni ricombinanti di pollini (Bet v 1, Bet v 1m, Bet v 1a, Bet v 2, Aln g 1, e Cor a 1), di alimenti (Dau c 1, Mal d 1 e Api g 1), di graminacee (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6, e Phl p 7), di muffe (Alt a 1 e Alt a 2), e di allergeni del lattice (Hew b 3, Hew b 5, Hew b 6, Hew b 7, Hew b 8, Hew b 9, e Hew b 10) in triplicato. (B) Immagine di un paziente allergico ai pollini con reattività IgE per rBet v 1, rAln g 1, rCor a 1, rPhl p 2, e rPhl p 5. (C) Soggetto non allergico (controllo). Immagine da K. Deinhofer et al. / Methods 32 (2004) 249–254.

La tecnica del microarray-All costituisce quindi un interessante strumento per la misurazione dei livelli di IgE specifiche sia perché, a differenza delle tecniche convenzionali, questo sistema permette la diagnosi simultanea di numerosi allergeni in un singolo passaggio analitico, sia per la quantità di materiale biologico (siero dei pazienti) utilizzato in un singolo esperimento, che è considerevolmente minore rispetto alle altre tecniche [Harwanegg e Hiller 2005]. Quest'ultimo aspetto potrebbe rivelarsi particolarmente utile anche per la diagnosi delle patologie allergiche nei bambini, per i quali il prelievo di quantitativi sufficienti di sangue è spesso difficile per ovvii motivi.

Inoltre, l'uso di reagenti che emettono differenti fluorescenze in combinazione con specifici anticorpi per la rivelazione del segnale, consentono di misurare simultaneamente parametri diversi, quali gli anticorpi IgG ed IgE allergene-specifici, in un unico saggio [Harwanegg et al. 2003, Hantusch et al. 2005]. In questo contesto il sistema microarray-All potrebbe essere notevolmente utile anche per valutare alcuni parametri quali aumento e/o diminuzione di sottoclassi di IgG specifiche (ad esempio IgG1, IgG2 ed IgG4) nel tempo, che forniscono informazioni sull'efficacia di eventuali trattamenti immunoterapeutici.

La tecnica del microarray-All può inoltre risultare vantaggiosa nel caso della diagnosi di allergie alimentari. Per questo tipo di patologia, infatti, molti dei sistemi diagnostici in uso presentano problemi non risolti. Il test di eccellenza per la diagnosi di tale patologia, ovvero la provocazione orale o *food challenge*, può non essere sempre applicato, per alcuni pazienti infatti la somministrazione dell'allergene può determinare lo scatenamento di reazioni anafilattiche anche gravi [Bindslev-Jensen et al 2004]. Per quanto riguarda lo SPT, questo test non si mostra particolarmente adatto per la diagnosi verso gli allergeni vegetali, ed in particolar modo ortaggi e frutta (es. mele, arance, pesche, patate, carote, sedano), poiché è molto difficile ottenere da questi alimenti estratti allergenici la cui stabilità sia provata nel tempo. Per questo motivo è diventato uso comune utilizzare cibo fresco per effettuare il prick-to-prick, saggio che si avvale della stessa procedura dello SPT, utilizzando al posto dell'estratto allergenico frutta o verdura fresca [Sampson 2005]. E' chiaro però come la disponibilità del prodotto fresco possa costituire un problema a livello organizzativo sia per quel che riguarda la conservazione del prodotto che per quanto riguarda la disponibilità del prodotto in relazione alla stagione. Il problema della labilità degli estratti può inoltre influire su alcuni sistemi di diagnosi *in vitro* classici, basati sul principio del RAST. Nel sistema microarray-All il problema può essere superato con l'utilizzo delle singole molecole allergeniche ricombinanti. Ad oggi sono disponibili sul mercato microarray-All che possono essere utilizzati per la diagnosi di allergia a diversi alimenti tra i quali kiwi, pesche, mele, ananas, arachidi, nocciole, orzo, carote, sedano, uova di gallina, latte di mucca e grano.

Prospettive e limitazioni nell'applicazione della tecnica microarray-All nella diagnosi allergologica

L'utilizzo su vasta scala dell'approccio diagnostico basato sul microarray-All nel settore allergologico potrebbe teoricamente apportare una semplificazione in virtù del fatto che il numero degli allergeni ricombinanti ad oggi disponibili è considerevole e che, i soggetti allergici, sono sempre più frequentemente polispecifici ossia sensibili a gruppi di allergeni e non ad uno soltanto. Di conseguenza questo sistema darebbe l'opportunità di saggiare contemporaneamente la reattività ad un ampio pannello di allergeni. In questo modo, con quantità ridotte di siero e nell'arco di poche ore, sarebbe possibile ottenere un'informazione abbastanza completa delle reattività del paziente allergico verso un ampio spettro di molecole allergeniche.

Nella pratica non risulta tutto così semplice proprio per alcune delle ragioni che rendono invece auspicabile l'applicazione in diagnosi di questo sistema. In particolare modo ciò che rende più difficoltosa l'applicazione di questo approccio è proprio la necessità di disporre di un alto numero di allergeni. Come descritto in precedenza, gli allergeni per il sistema microarray-All sono prodotti ricombinanti e questo implica che debbano essere realizzati in tale forma praticamente tutti gli allergeni esistenti. Prendendo in considerazione la famiglia degli acari della polvere, che rappresenta una delle fonti allergeniche più rilevanti, numerosi dati in letteratura hanno messo in evidenza che tale famiglia è costituita da ben diciannove allergeni differenti. Quindi per effettuare in modo accurato una diagnosi di allergia agli acari tramite il sistema microarray-All è evidente che sarà necessario produrre in forma ricombinante, caratterizzare e coniugare sul supporto specifico ben diciannove allergeni solo per la famiglia degli acari. Inoltre, se si vuole incrementare ulteriormente l'accuratezza della diagnosi, andrebbero anche prese in considerazione tutte le isoforme esistenti per ogni singolo allergene. Lo stesso approccio è valido ovviamente per tutte le altre fonti allergeniche.

D'altra parte un altro aspetto da non sottovalutare è che le molecole ricombinanti devono assumere una corretta conformazione, sovrapponibile a quella della corrispondente molecola nativa, in modo tale che gli epitopi di natura conformazionale siano tutti mantenuti, altrimenti la diagnosi potrebbe non essere effettuata in modo accurato. Questo problema, di non indifferente entità, ha accompagnato la produzione degli allergeni ricombinanti sin dagli esordi dell'applicazione delle tecniche di biologia molecolare. Per questa ragione ogni volta che viene prodotta una nuova molecola ricombinante deve essere caratterizzata accuratamente dal punto di vista strutturale, biochimico ed immunochimico, nonché in esperimenti di valutazione dell'attività biologica *in vitro* mediante un confronto con la rispettiva molecola nativa.

Per quanto riguarda la sensibilità e la specificità del sistema del microarray-All sono disponibili diversi studi che mettono a confronto questa tecnica innovativa con le metodiche più classiche impiegate per la diagnosi *in vitro*. Da uno degli studi più recenti [Wöhrl et al. 2006] è emerso che sia la sensibilità che la specificità sono comparabili per la diagnosi solo di alcuni allergeni, quali la betulla, il gatto e le graminacee mentre, per gli allergeni degli acari della polvere, la sensibilità del microarray-All sembra inferiore ma comunque accettabile per la diagnosi. Tuttavia, per altri allergeni la tecnica del microarray-All potrebbe avere una bassa sensibilità, come nel caso dell'artemisia dove la bassa reattività degli anticorpi IgE verso l'allergene maggiore ricombinante, Art v 1 [Bousquet et al. 1994], potrebbe essere legata alla perdita di importanti componenti glicidiche nella struttura della molecola ricombinante. Inoltre, sempre nel caso dell'artemisia, per poter effettuare una diagnosi completa sarà necessario l'introduzione nel saggio di ulteriori componenti allergeniche, quali ad esempio l'Art v 2 [Wöhrl et al. 2006].

Sembra quindi evidente che una corretta diagnosi delle patologie allergiche è legata in primo luogo ad una anamnesi clinica attenta da parte del medico specialista, in concomitanza con una diagnosi mediante saggi *in vivo* ai quali sarebbe auspicabile affiancare saggi *in vitro* come il sistema dei microarray-All. Infatti il solo dosaggio delle IgE *in vitro* non può costituire una diagnosi di per sé completa poiché in molti casi la presenza delle IgE nel siero del soggetto in esame non correla con i sintomi [Lin et al. 2007].

La sostituzione delle convenzionali metodologie *in vitro* con il sistema microarray-All potrebbe produrre un notevole abbattimento dei costi in virtù delle ridotte quantità di reagenti necessari. In conclusione, sebbene la tecnica potrebbe presentare vantaggi sia in termini di tempo che, presumibilmente, economici la necessità di migliaia di molecole ripiegate nella maniera corretta può costituire allo stato attuale un limite in termini di accuratezza della diagnosi. Poiché ogni individuo può essere sensibilizzato a più di una componente per ogni estratto allergenico, sarà necessario includere in futuro tutte le componenti allergenicamente rilevanti per ogni estratto nei test diagnostici al fine di identificare nel modo più completo possibile il pannello di molecole rilevanti per la patologia.

In conclusione, i microarray-All rappresentano un buono strumento per il miglioramento della diagnosi allergologica, ma il loro potenziale non potrà essere pienamente sfruttato fino a quando un pannello completo di allergeni sarà stato prodotto e convalidato in studi clinici appropriati [Harwanegg and Hiller 2005].

Bibliografia

- Adkinson N.F. Jr.: The radioallergosorbent test: Uses and abuses. *J Allergy Clin Immunol* 1980 Jan, VOL: 65(1), P:1.
- Bindslev-Jensen C., Ballmer-Weber B. K., Bengtsson U., Blanco C., Ebner C., Hourihane J. et al.: Standardization of food challenges in patients with immediate reactions to foods – position paper from the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 2004, VOL: 59, P: 690.
- Bousquet J., Lehrer S., Lowenstein H., Norman P.S., De Weck A.L.: Special report from the IUIS/WHO Allergen Standardization Committee. *Allergy and Clinical Immunology News* 1994, VOL: 6, P: 33.
- Deinhofer K., Sevcik H., Balic N., Harwanegg C., Hiller R., Rumpold H., Mueller M. W., Spitzauer S.: Microarrayed allergens for IgE profiling. *Methods* 2004, VOL: 32, P: 249.
- EUROPEAN ALLERGY WHITE PAPER Allergic disease as a public health problem in Europe. The UCB Institute of Allergy, 1997.
- Hantusch B., Schöll I., Harwanegg C., Krieger S., Becker W.M., Spitzauer S., Boltz-Nitulescu G., Jensen-Jarolim E.: Affinity determinations of purified IgE and IgG antibodies against the major pollen allergens Phl p 5a and Bet v 1a: discrepancy between IgE and IgG binding strength. *Immunol Lett* 2005, VOL: 97, P: 81.
- Harwanegg C., Hiller R.: Protein microarrays for the diagnosis of allergic diseases: State-of-the-art and future development. *J Lab Med* 2005, VOL: 29(4), P: 272.
- Harwanegg C., Laffer S., Hiller R., Mueller M.W., Kraft D., Spitzauer S., Valenta R.: Microarrayed recombinant allergens for diagnosis of allergy. *Clin Exp Allergy* 2003 Jan, VOL:33(1), P:7.
- Janson C., Anto J., Burney P., Chinn S., de Marco R., Heinrich J., Jarvis D., Kuenzli N., Leynaert B., Luczynska C., Neukirch F., Svanes C., Sunyer J., Wjst M.: European Community Respiratory Health Survey II. The European Community Respiratory Health Survey: what are the main results so far? *European Community Respiratory Health Survey II. Eur Respir J* 2001 Sep, VOL:18(3), P:598.
- Lin J., Shewry P.R., Archer D.B., Beyer K., Niggemann B., Haas H., Wilson P., Alcocer M.J.: A novel tool for the detection of allergic sensitization combining protein microarrays with human basophils. *Clinical and Experimental Allergy* 2007, VOL:37, P:1854.
- Malling H.J.: Skin prick testing in biological standardization of allergenic products. *Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impfstoffe Frankf A M.* 1997, VOL:91, P:157.

- Mothes N., Valenta R., Spitzauer S.: Allergy testing: the role of recombinant allergens. *Clin Chem Lab Med* 2006, VOL:44(2), P:125.
- Movérare R., Elfman L., Vesterinen E., Metso T., Haahtela T.: Development of new IgE specificities to allergenic components in birch pollen extract during specific immunotherapy studied with immunoblotting and Pharmacia CAP System. *Allergy* 2002 May, VOL:57(5), P:423.
- Sampson H. A.: Food allergy – accurately identifying clinical reactivity. *Allergy* 2005, VOL: 60 (Suppl. 79), P:19.
- Sicherer S.H.: Food allergy: when and how to perform oral food challenges. *Pediatr Allergy Immunol* 1999 Nov, VOL:10(4), P:226.
- Upham J.W., Holt P.G.: Environment and development of atopy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005 Apr, VOL:5(2), P:167.
- Valenta R., Lidholm J., Niederberger V., Hayek B., Kraft D., Grönlund H.: The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT). *Clin Exp Allergy* 1999, VOL:29, P: 896.
- Von Mutius E., Schmid S.: The PASTURE project: EU support for the improvement of knowledge about risk factors and preventive factors for atopy in Europe. *Allergy*. 2006 Apr, VOL:61(4), P: 407.
- Wöhrl S., Vigl K., Zehetmayer S., Hiller R., Jarisch R., Prinz M., Stingl G., Kopp T.: The performance of a component-based allergen-microarray in clinical practice. *Allergy* 2006 May, VOL:61(5), P: 633.

I Microarray come tecnologia emergente per lo studio dei gemelli

Corrado Fagnani¹, Simonetta Pulciani², Anna Di Lonardo²

¹Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma

²Centro per la Ricerca e la Valutazione dei Prodotti ImmunoBiologici, Istituto Superiore di Sanità, Roma

I gemelli come risorsa per gli studi di genetica

Gli studi sui gemelli sono stati fra i primi studi sull'ereditarietà dei caratteri umani. Nella seconda metà dell'Ottocento, Francis Galton, psicologo e naturalista inglese, intuì per primo le potenzialità di un metodo di indagine scientifica basato proprio sull'osservazione delle coppie gemellari. Galton, infatti, concepì lo studio dei gemelli come il migliore strumento per valutare gli effetti dell'ereditarietà (*nature*) e dell'ambiente (*nurture*) sulle caratteristiche umane, ovvero per effettuare una distinzione fra le tendenze ricevute alla nascita e quelle imposte da speciali circostanze della vita successiva.

I gemelli sono un'importante risorsa per l'epidemiologia genetica. In questo campo di ricerca, che si avvale di metodi e tecniche propri dell'epidemiologia classica, della biostatistica, della biologia molecolare e della genetica delle popolazioni, il metodo gemellare viene utilizzato per quantificare il ruolo delle influenze genetiche ed ambientali nel determinare la variabilità inter-individuale di tratti multifattoriali, quali la suscettibilità a malattie complesse, i fenotipi intermedi di tali malattie, oppure le caratteristiche fisiche e del comportamento. A differenza degli studi sulle famiglie, le indagini sui gemelli offrono il notevole vantaggio di poter direttamente stabilire se l'eventuale aggregazione riscontrata per un certo fenotipo all'interno di nuclei familiari sia causata da fattori genetici o da esposizioni ambientali comuni ai membri delle famiglie.

Il Registro Nazionale Gemelli

L'Italia vanta una grande tradizione scientifica in materia di gemelli. Negli anni cinquanta, Luigi Gedda, con la pubblicazione del libro "Studio dei

Gemelli" (Gedda L., 1951), ha sancito la nascita della "gemellologia". Gedda aveva intuito l'importanza di una raccolta sistematica di dati sulla popolazione gemellare, tanto che fin da allora aveva dato inizio, presso l'Istituto Mendel di Roma, all'imponente arruolamento di una coorte volontaria di circa 40.000 gemelli; questa coorte, seguita fin dal 1950 per circa quaranta anni, ancora oggi costituisce una preziosa banca di informazioni per studi su caratteri complessi, benché non siano disponibili dati su indicatori molecolari.

Quello che, però, mancava in Italia era un registro di gemelli su base di popolazione, analogo a quelli istituiti in molti paesi nordeuropei. Tali registri, contenendo informazioni fenotipiche, genotipiche e sullo stile di vita di un elevato numero di gemelli e, talvolta, dei loro familiari, costituiscono una preziosa risorsa per la ricerca in epidemiologia genetica (Boomsma D. et al., 2002, Busjahn A. e Hur Y.M., 2006).

Nel 2000, l'Italia, in linea con altri stati in Europa e nel mondo, ha istituito il "Registro Nazionale Gemelli" (RNG, www.gemelli.iss.it). Tale registro, tenuto presso il Reparto di Epidemiologia Genetica dell'Istituto Superiore di Sanità di Roma, ha come obiettivo principale quello di utilizzare i dati sui gemelli per investigare i fattori ereditari ed ambientali che contribuiscono all'espressione fenotipica di caratteri umani, normali e/o patologici (Stazi M.A. et al., 2002, Fagnani C. et al., 2006). Ad oggi, il RNG include informazioni su circa 15.000 gemelli di diverse fasce di età ed aree geografiche, ed è coinvolto in numerosi studi di epidemiologia genetica su caratteri complessi, molti dei quali condotti nell'ambito di consorzi internazionali.

Il metodo gemellare classico si basa sul confronto tra la correlazione o la concordanza osservata in gemelli monozigoti (MZ) e quella rilevata in gemelli dizigoti (DZ), per un certa caratteristica in studio. Dato che i gemelli MZ sono geneticamente identici, mentre i DZ condividono, in media, il 50% dei geni, al pari di normali fratelli, un'eventuale maggiore correlazione o concordanza osservata tra i MZ rispetto ai DZ può essere assunta come evidenza di influenze genetiche sulla caratteristica in studio, e la differenza tra le correlazioni nei MZ e nei DZ può essere usata come indice di "ereditabilità". Il ragionamento, però, è valido solo se si assume che i gemelli MZ condividano le esperienze ambientali, rilevanti per la caratteristica in esame, nella stessa misura dei DZ [*equal environments assumption* (Spector T.D. et al., 2000)]. Questa costituisce l'assunzione di base del metodo gemellare, e, sebbene sia stata spesso additata come un grave punto debole del metodo, numerosi studi ne hanno dimostrato la validità per la maggior parte dei tratti di interesse in epidemiologia genetica, ed hanno verificato che eventuali violazioni portano, in genere, ad una minima sovrastima dell'ereditabilità.

I gemelli e l'epidemiologia genetica

Di recente, la definizione della sequenza del genoma umano e la progressiva identificazione delle sue varianti hanno aperto nuovi percorsi nella ricerca in epidemiologia genetica, dando ulteriore vigore anche al metodo di indagine che utilizza i gemelli.

Innanzitutto, i risultati degli studi sui gemelli possono essere considerati preliminari a studi genetici più approfonditi, volti ad individuare e localizzare le varianti geniche implicate nell'espressione fenotipica di specifici tratti. E' chiaro, infatti, che ha senso effettuare tali studi solo nel caso di tratti per i quali vi siano consistenti evidenze, provenienti, ad esempio, da studi sui gemelli (ma non solo), a favore di un sufficiente carico di ereditabilità, ovvero a favore dell'esistenza di polimorfismi che potrebbero contribuire, in modo rilevante, alle differenze fenotipiche inter-individuali osservate.

Nel corso degli ultimi anni, i gemelli si sono anche rivelati un *setting* particolarmente vantaggioso in cui alcuni disegni di studio, classicamente adottati in epidemiologia genetica, sono stati applicati con straordinaria efficacia. Ad esempio, i gemelli DZ possono essere utilizzati per effettuare studi genetici cosiddetti "di *linkage*" tramite il metodo denominato "*affected sib pair*". L'obiettivo di questi studi è verificare se coppie di fratelli che presentano un certo carattere in esame, eventualmente una patologia, tendono a condividere le varianti di specifici geni in misura maggiore rispetto a quanto atteso sotto l'ipotesi che non vi siano legami tra il carattere in studio e quei geni. Se si osserva un eccesso di condivisione, ciò costituisce un'evidenza che quei geni sono coinvolti (o localizzati vicino ai geni coinvolti) nell'espressione del carattere. Gli studi di *linkage* condotti su gemelli DZ, rispetto a quelli eseguiti su fratelli non gemelli, permettono sia di rimuovere la variabilità intra-coppia dovuta all'età, fattore fondamentale nell'insorgenza di tante patologie, sia di ridurre quella dovuta ad una serie di altri fattori, quali le esposizioni ambientali in utero e nella prima infanzia, conferendo così una maggiore potenza statistica al disegno di studio.

Per le stesse ragioni, i gemelli offrono le condizioni ideali anche per gli studi genetici "di associazione" basati sul disegno "caso-controllo", il cui scopo è verificare se la frequenza di una variante allelica di uno specifico gene in individui affetti da una certa patologia (casi) differisce da quella osservata in individui sani (controlli). E' evidente che, affinché l'eventuale discrepanza nella frequenza della variante tra casi e controlli possa esclusivamente attribuirsi alla presenza/assenza della patologia, casi e controlli devono essere confrontabili per una serie di fattori che potrebbero essere associati sia con la variante che con la patologia. In un simile contesto, assume rilievo il disegno di studio "*case-cotwin control*", in cui i casi e i controlli sono

rappresentati, rispettivamente, da gemelli malati e dai loro co-gemelli sani. Questo disegno di studio può avvalersi sia di gemelli MZ che di gemelli DZ. Se applicato a soli gemelli MZ, esso garantisce non solo un livello ottimale di comparabilità dei due gruppi rispetto a numerosi determinanti ambientali, ma anche un appaiamento perfetto per tutte le varianti alleliche diverse da quella in esame.

I gemelli e lo studio dei meccanismi epigenetici

Oltre ad offrire evidenti vantaggi nell'utilizzo di metodi già noti in epidemiologia genetica, i gemelli hanno anche aperto la strada alla messa a punto di disegni di studio totalmente nuovi, in grado di fornire alla ricerca genetica molecolare informazioni mai prodotte in precedenza. Il disegno di studio più mirabilmente rivoluzionario, per la profondità delle sue implicazioni e la complessità delle tecniche che ad esso si sono affiancate, è senz'altro quello basato sulle coppie di gemelli MZ discordanti per una certa condizione, cioè in cui la condizione è presente in uno solo dei due gemelli. Un interrogativo che ricorre da sempre è perché i gemelli MZ, pur identici nel patrimonio genetico, possono presentare discordanze per patologie e/o altri caratteri fenotipici.

Oltre ad essere il risultato di diverse esperienze ambientali vissute dai due gemelli o di mutazioni genetiche sopraggiunte in uno solo dei gemelli dopo la nascita, tali differenze possono essere prodotte, secondo i più recenti studi, anche da "meccanismi epigenetici". I meccanismi epigenetici sono quelle modificazioni di tipo reversibile che interessano la struttura del DNA, ma non la sua sequenza.

Il fatto che, ad esempio, una specifica malattia insorga soltanto in uno di due gemelli geneticamente identici costituisce la situazione ideale per individuare differenze nei profili di espressione genica, ed investigare il ruolo dei meccanismi epigenetici nel determinare l'insorgenza della malattia stessa.

Tra le modificazioni epigenetiche meglio studiate vi sono la metilazione della citosina e l'acetilazione degli istoni (Suzuki M.M. e Bird A., 2008), che comportano una variazione nell'assetto sterico della doppia elica, favorendo o limitando la funzione degli enzimi deputati alla trascrizione del messaggio genetico. Tali fenomeni interferiscono nella struttura della cromatina, alterando il processo di trascrizione, prima tappa nella sintesi proteica. L'effetto finale è una variazione nel contenuto proteico, capace di generare differenti fenotipi.

Applicazioni della tecnologia dei *Microarray* allo studio dei gemelli

La tecnica dei *Microarray* risulta particolarmente versatile negli studi in cui vengono impiegati i gemelli MZ discordanti sia per determinare le alterazioni epigenetiche che per analizzare le variazioni nell'espressione genica a queste correlate (Pulciani S. et al 2006).

Diverse sono le pubblicazioni scientifiche sulle applicazioni dei *Microarray* nello studio dei gemelli MZ discordanti, e, nella presente monografia, illustreremo soltanto alcune delle più recenti.

Tra le patologie più studiate usando la combinazione gemelli-*Microarray*, quelle neurologiche e psichiatriche sono le più frequenti.

Come primo esempio, presentiamo il caso della paralisi cerebrale. Questa è una patologia cronica che si manifesta nei primi anni di vita e comporta un aberrante controllo dei movimenti e della postura, nonché altri innumerevoli sintomi. Ne esistono diverse forme, la forma spastica, atassica, ipotonica, etc. L'eziologia di questa malattia non è stata ancora ben definita; presumibilmente è di tipo multifattoriale, e i fattori di rischio possono agire sia durante la vita intrauterina che durante il periodo neonatale. Tra i fattori di rischio sembrano essere inclusi anche i processi infettivi, l'esposizione a sostanze teratogene, la ridotta crescita nel periodo di vita intrauterina e lo scarso peso alla nascita. Si stima che nell'1%-2% dei casi le forme di paralisi cerebrale abbiano una origine genetica. Alcuni studi condotti da McHale e collaboratori indicano in una modificazione nel cromosoma 2 la causa genetica della paralisi cerebrale di tipo spastico ed in un'alterazione nel cromosoma 9 la causa della paralisi atassica (McHale D.P. et al., 2000).

Un gruppo di ricercatori cinesi ha impiegato i gemelli MZ come modello di studio per determinare le alterazioni genetiche responsabili della paralisi cerebrale mediante la tecnica dei DNA-*Microarray* (Zhang T. et al., 2007). Gli RNA totali estratti dai campioni ematici di una coppia di sorelle gemelle MZ discordanti per la paralisi cerebrale sono stati analizzati per valutare i livelli di espressione di 20.000 geni umani. I risultati ottenuti sono stati posti a confronto con i dati di quattro banche biologiche (FatiGO, FatiGO PLUS, KEGG, SOURCE), mettendo in evidenza nella gemella affetta da paralisi cerebrale una espressione differenziale di 2703 geni complessivamente. Per 1272 geni i livelli di espressione risultano aumentati, mentre per 1431 risultano diminuiti. Le funzioni di molti di questi geni sono sconosciute. Bisogna precisare che la significatività statistica è stata evidenziata solo per alcuni geni coinvolti nella via biosintetica (*pathway*) correlata alla formazione delle giunzioni cellulari e per geni coinvolti nel metabolismo e nella polimerizzazione dell'actina (Zhang T. et al., 2007). Questi risultati sono estremamente interessanti poiché i

geni in questione potrebbero essere implicati nel controllo delle attività motorie. Pertanto, tali studi forniscono preziose indicazioni sui geni da analizzare in dettaglio per definire la base ereditaria della paralisi cerebrale.

Un'altra patologia neurologica che è stata indagata a livello molecolare utilizzando la tecnologia dei *Microarray* è l'epilessia con assenza, detta anche "piccolo male", in quanto caratterizzata dalla perdita di coscienza e mancanza di convulsioni (Helbig I. et al., 2008).

Il gruppo di ricerca australiano del Dottor Helbig ha effettuato uno studio trifasico sugli RNA estratti da linee cellulari linfoblastoidi derivate dai seguenti gruppi di gemelli:

- a) cinque coppie di gemelli MZ discordanti per la patologia;
- b) quattro coppie di gemelli concordanti per la patologia;
- c) cinque coppie di gemelli MZ sani utilizzati come controllo.

Lo studio, effettuato con la tecnica del DNA-*Microarray*, si è articolato in tre disegni sperimentali in cui sono stati posti a confronto:

- a) i gemelli discordanti per patologia nell'ambito della stessa coppia;
- b) i gemelli concordanti per patologia con i gemelli sani;
- c) i gemelli affetti dalla patologia con i gemelli sani, indipendentemente dal gruppo di appartenenza (concordanti o discordanti).

I risultati ottenuti dai tre gruppi sperimentali sono stati intersecati per individuare quei geni differenzialmente espressi negli individui affetti dalla patologia rispetto a quelli espressi negli individui sani, presumibilmente correlati con l'esordio e la progressione della patologia. Questa analisi ha permesso di evidenziare una comunanza, nei soggetti malati dei tre gruppi, dell'espressione differenziale di sessantacinque geni. Tra questi, sono stati selezionati sedici geni preferenzialmente espressi nel tessuto cerebrale. Ad ulteriore conferma delle variazioni nell'espressione genica ottenute negli esperimenti di DNA-*Microarray*, questi sedici geni sono stati analizzati con la tecnica della Real Time PCR (RT-PCR). Gli esperimenti di RT-PCR hanno confermato che 9 dei 16 geni erano effettivamente sovraespressi nei soggetti malati. Tra questi 9 geni, assume particolare rilevanza l'alterata espressione del gene EGR1, acronimo per Early Growth Response 1, un gene implicato nella plasticità neuronale. Esso è sovraespresso anche in modelli sperimentali animali per l'epilessia così come nei foci neocorticali epilettici. Ad oggi, le vie biosintetiche correlate al gene EGR1 non sono ancora ben conosciute, anche se è stato ipotizzato che il gene EGR1 interagisca con geni implicati nella funzione e formazione delle sinapsi (Helbig et al., 2008).

Come esempi di patologie psichiatriche presentiamo gli studi del gruppo di ricerca del Dottor Kakiuchi, rivolti a determinare i fondamenti genetici associati ai disturbi bipolari e alla schizofrenia.

A questo proposito, è stata analizzata l'espressione genica differenziale in cellule linfoblastoidi provenienti da due coppie di gemelli MZ discordanti

per disturbi bipolari ed una coppia di gemelli sani. I risultati hanno evidenziato nei soggetti malati una ridotta espressione nei geni XBP1 e HSPA5, connessi al metabolismo del reticolo endoplasmatico. Questo dato è una conferma dell'importanza del gene HSPA5 nella manifestazione del disturbo bipolare. Infatti, studi *in vitro* avevano già dimostrato che il composto chimico valproato, utilizzato come stabilizzatore dell'umore, induce l'espressione del gene HSPA5, sotto il controllo del gene XBP1. Inoltre, il gene HSPA5 risiede in posizione 22q12, ossia su un sito del cromosoma 22 già precedentemente correlato con le malattie di tipo bipolare (Kakiuchi C. et al., 2003).

Questo stesso modello sperimentale è stato applicato allo studio della schizofrenia (Kakiuchi C. et al., 2008).

È ben noto che nella schizofrenia sono coinvolti fattori genetici, come dimostrato dalla familiarità e dalla maggiore concordanza della malattia nei gemelli MZ rispetto ai gemelli DZ. Approcci sperimentali tradizionali hanno indicato come possibili cause genetiche della patologia la delezione al locus 22q11, e mutazioni nei geni DTNBP1 e NRG1, rispettivamente implicati nel legame con la distrofina e nello sviluppo del sistema nervoso.

I livelli di espressione genica sono stati analizzati in cellule linfoblastoidi provenienti da due coppie di gemelli MZ discordanti per la schizofrenia mediante la tecnica dei DNA-Microarray, utilizzando piattaforme della ditta Affymetrix (tipo HU133A). Questa analisi ha dimostrato che nelle cellule linfoblastoidi isolate dai gemelli schizofrenici vi è una maggiore espressione dei geni ADM e SEPX1.

Uno dei più recenti sviluppi della tecnologia dei Microarray è la preparazione di vetrini atti a rilevare modificazioni epigenetiche. Per gli aspetti tecnici dei vetrini Microarray elaborati per l'analisi delle mutazioni epigenetiche, rinviamo alla letteratura scientifica (Suzuki M.M. e Bird A., 2008, Schumacher A. e Petronis A., 2006).

Recentemente, Kaminsky e collaboratori hanno utilizzato questo approccio sperimentale per rilevare le differenze nella metilazione del DNA in una coppia di gemelle MZ di 49 anni, discordanti nelle attitudini comportamentali (Kaminsky Z. et al., 2008). Questa coppia è stata prescelta in quanto le gemelle differivano palesemente sulle scelte personali e lavorative, a dispetto di un forte coinvolgimento emotivo tra di loro. La prima gemella ha intrapreso la carriera di giornalista, come corrispondente di guerra, mettendo a rischio la propria vita; si è sposata non giovanissima con un suo collega e non ha avuto figli. La seconda gemella ha intrapreso un tipo di vita ordinario, sposandosi giovane ed avendo subito due figli, e lavorando per uno studio legale part-time. Entrambe le gemelle sono state sottoposte a test psicometrici, genetici ed epigenetici. I test attitudinali hanno evidenziato nella seconda gemella un grado maggiore di ansia e tensione. Nessuna delle due gemelle era comunque affetta da disturbi psichiatrici, e la monozigotità delle gemelle è stata confer-

mata da test genetici. Infine, il DNA isolato dalle cellule nucleate del sangue delle due gemelle è stato analizzato per determinarne le differenze a livello epigenetico. Gli esperimenti effettuati hanno dimostrato un'eguaglianza delle due gemelle dal punto di vista genetico, ma non da quello epigenetico. Senza descrivere nel dettaglio gli esperimenti effettuati, ci limitiamo a sottolineare che i risultati ottenuti hanno evidenziato alterazioni nel locus 2q31.1, corrispondente alla porzione 3'LTR del gene DLX1 (Distal-less/homeobox1). Studi su modelli sperimentali murini hanno dimostrato che l'espressione del gene DLX1 è determinante per l'espressione dell'ormone NPY e che tale ormone è strettamente correlato con l'induzione di stati ansiosi. Ulteriori esperimenti sono necessari per determinare come la variazione epigenetica individuata possa influire sull'espressione genica e di conseguenza sul carattere delle due gemelle.

Gli studi fino ad oggi effettuati utilizzando i gemelli e la tecnologia dei *Microarray* sottolineano la validità di tale modello sperimentale. Ci si auspica che nel prossimo futuro questo approccio, coadiuvato dagli studi di genetica, possa fornire maggiori informazioni sui meccanismi molecolari di patologie complesse, che possano condurre ad una migliore diagnosi e valutazione degli approcci terapeutici.

Bibliografia

- Boomsma D., Busjahn A., Peltonen L.: Classical twin studies and beyond. *Nat Rev Genet* 2002 Nov, VOL: 3(11), P:872.
- Busjahn A., Hur YM.: Twin registries: an ongoing success story. *Twin Res Hum Genet* 2006 Dec, VOL: 9(6), P:705.
- Fagnani C., Brescianini S., Cotichini R., D'Ippolito C., Dukic T., Giannantonio L., Medda E., Nisticò L., Patriarca V., Pulciani S., Rotondi D., Toccaceli V., Stazi M.A.: The Italian Twin Register: new cohorts and tools, current projects and future perspectives of a developing resource. *Twin Res Hum Genet* 2006 Dec, VOL:9(6), P:799.
- Gedda L. *Studio dei gemelli*. Roma. Orizzonte Medico, 1951.
- Helbig I., Matigian N.A., Vadlamudi L., Lawrence K.M., Bayly M.A., Bain S.M., Diyagama D., Scheffer I.E., Mulley J.C., Holloway A.J., Dibbens L.M., Berkovic S.F., Hayward NK.: Gene expression analysis in absence epilepsy using a monozygotic twin design. *Epilepsia* 2008 Sep, VOL 49(9), P:1546.
- Kakiuchi C., Ishiwata M., Nanko S., Ozaki N., Iwata N., Umekage T., Tochigi M., Kohda K., Sasaki T., Imamura A., Okazaki Y., Kato T.: Up-regulation of

- ADM and SEPX1 in the lymphoblastoid cells of patients in monozygotic twins discordant for schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2008 Jul, VOL:147B(5), P:557.
- Kakiuchi C., Iwamoto K., Ishiwata M., Bundo M., Kasahara T., Kusumi I., Tsujita T., Okazaki Y., Nanko S., Kunugi H., Sasaki T., Kato T.: Impaired feedback regulation of XBP1 as a genetic risk factor for bipolar disorder. *Nat Genet* 2003 Oct, VOL:35(2), P:171.
- Kaminsky Z., Petronis A., Wang S.C., Levine B., Ghaffar O., Floden D., Feinstein A.: Epigenetics of personality traits: an illustrative study of identical twins discordant for risk-taking behavior. *Twin Res Hum Genet* 2008 Feb, VOL:11(1), P:1.
- McHale D.P., Jackson A.P., Campbell, Levene M.I., Corry P., Woods C.G., Lench N.J., Mueller R.F., Markham A.F.: A gene for ataxic cerebral palsy maps to chromosome 9p12-q12. *Eur J Hum Genet* 2000 Apr, VOL:8(4), P:267.
- Pulciani S., Di Lonardo A., Fagnani C., D'Ippolito C., Bompreszi R., Stazi M.A.: [DNA-microarray: new technological approaches on twin studies] *Ann Ist Super Sanita* 2006, VO:42(2), P:211.
- Schumacher A., Petronis A.: Epigenetics of complex diseases: from general theory to laboratory experiments. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006, VOL:310, P:81.
- Spector, T. D., Snieder, H., & MacGregor, A. J.(Eds) *Advances in twin and sib-pair analysis*. London. Greenwich Medical Media Ltd 2000.
- Stazi M.A., Cotichini R., Patriarca V., Brescianini S., Fagnani C., D'Ippolito C., Cannoni S., Ristori G., Salvetti M.: The Italian Twin Project: from the personal identification number to a national twin registry. *Twin Res* 2002 Oct, VOL:5(5), P:382.
- Suzuki M.M., Bird A.: DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet* 2008 Jun, VOL:9(6), P:465.
- Zhang T., Wang M., Pan L., Ding W., Wang J.G., Yang L., Liu M, Li W., Yan Z.: Study of gene expression profiles and biological mechanism of cerebral palsy using a monozygotic twin pair. *Twin Res Hum Genet* 2007 Jun, VOL:10(3), P:496.

Si ringrazia il Signor Alessandro Spurio per il suo prezioso
contributo nella realizzazione della parte grafica

Indice

Editoriale	pag. 3
Microarray e Virus dell'Epatite C Anna Rita Ciccaglione, Cinzia Marcantonio, Elena Tritarelli, Paola Tataseo, Alessandro Ferraris, Roberto Bruni, Germano Gerosolimo, Angela Costantino, Leonardo Geraci, Maria Rapicetta.....	» 9
Farmacogenomica: dal progetto genoma umano alla terapia personalizzata. Simona Gaudi, Fabio Macchiardi, Francesca Carlini, Romano Arcieri, Stefano Vella.....	»21
Impiego degli allergeni ricombinanti nello sviluppo di sistemi microarray per la diagnosi delle patologie allergiche Barbara Brunetto, Carlo Pini, Raffaella Tinghino, Patrizia Iacovacci.....	» 31
I Microarray come tecnologia emergente per lo studio dei gemelli Corrado Fagnani, Simonetta Pulciani/ Anna Di Lonardo.....	» 41
Indice.....	» 51

Caleidoscopio

Italiano

...il futuro ha il cuore antico  MEDICAL SYSTEMS SpA

1. Rassu S.: *Principi generali di endocrinologia*. Gennaio '83
2. Rassu S.: *L'ipotalamo endocrino*. Giugno '83
3. Rassu S.: *L'ipofisi*. Dicembre '83
4. Alagna., Masala A.: *La prolattina*. Aprile '84
5. Rassu S.: *Il pancreas endocrino*. Giugno '84
6. Fiorini I., Nardini A.: *Citomegalovirus, Herpes virus, Rubella virus (in gravidanza)*. Luglio '84.
7. Rassu S.: *L'obesità*. Settembre '84
8. Franceschetti F., Ferraretti A.P., Bolelli G.F., Bulletti C.: *Aspetti morfofunzionali dell'ovaio*. Novembre '84.
9. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (1)*. Dicembre '84.
10. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte prima*. Gennaio '85.
11. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte seconda*. Febbraio '85.
12. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (3) parte prima*. Aprile '85.
13. Nacamulli D, Girelli M.E, Zanatta G.P, Busnardo B.: *Il TSH*. Giugno '85.
14. Facchinetti F. e Petraglia F.: *La β -endorfina plasmatica e liquorale*. Agosto '85.
15. Baccini C.: *Le droghe d'abuso (1)*. Ottobre '85.
16. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (3) parte seconda*. Dicembre '85.
17. Nuti R.: *Fisiologia della vitamina D: Trattamento dell'osteoporosi post-menopausale*. Febbraio '86
18. Cavallaro E.: *Ipnosi: una introduzione psicofisiologica*. Marzo '86.
19. Fanetti G.: *AIDS: trasfusione di sangue emoderivati ed emocomponenti*. Maggio '86.
20. Fiorini I., Nardini A.: *Toxoplasmosi, immunologia e clinica*. Luglio '86.
21. Limone P.: *Il feocromocitoma*. Settembre '86.
22. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Flamigni C.: *Il Testicolo. Aspetti morfo-funzionali e clinici*. Novembre '86.
23. Bolcato A.: *Allergia*. Gennaio '87.
24. Kubasik N.P.: *Il dosaggio enzimologico e fluoroimmunologico*. Febbraio '87.
25. Carani C.: *Patologie sessuali endocrino-metaboliche*. Marzo '87.
26. Sanna M., Carcassi R., Rassu S.: *Le banche dati in medicina*. Maggio '87.
27. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Jasonni V.M., Flamigni C.: *L'amenorrea*. Giugno '87.
28. Zilli A., Pagni E., Piazza M.: *Il paziente terminale*. Luglio '87.
29. Pisani E., Montanari E., Patelli E., Trinchieri A., Mandressi A.: *Patologie prostatiche*. Settembre '87.
30. Cingolani M.: *Manuale di ematologia e citologia ematologica*. Novembre '87.

31. Kubasik N.P.: *Ibridomi ed anticorpi monoclonali*. Gennaio '88.
32. Andreoli C., Costa A., Di Maggio C.: *Diagnostica del carcinoma mammario*. Febbraio '88.
33. Jannini E.A., Moretti C., Fabbri A., Gnessi L., Isidori A.: *Neuroendocrinologia dello stress*. Marzo '88.
34. Guastella G., Cefalù E., Carmina M.: *La fecondazione in vitro*. Maggio '88.
35. Runello F., Garofalo M.R., Sicurella C., Filetti S., Vigneri R.: *Il gozzo nodulare*. Giugno '88.
36. Baccini C.: *Le droghe d'abuso (2)*. Luglio '88.
37. Piantino P., Pecchio F.: *Markers tumorali in gastroenterologia*. Novembre '88.
38. Biddau P.F., Fiori G.M., Murgia G.: *Le leucemie acute infantili*. Gennaio '89.
39. Sommariva D., Branchi A.: *Le distipidemie*. Febbraio '89.
40. Butturini U., Butturini A.: *Aspetti medici delle radiazioni*. Marzo '89.
41. Caffero F., Gipponi M., Paganuzzi M.: *Diagnostica delle neoplasie colo-rettali*. Aprile '89.
42. Palleschi G.: *Biosensori in Medicina*. Maggio '89.
43. Franciotta D.M., Melzi D'Eril G.V. e Martino G.V.: *HTLV-I*. Giugno '89.
44. Fanetti G.: *Emostasi: fisiopatologia e diagnostica*. Luglio '89.
45. Contu L., Arras M.: *Le popolazioni e le sottopopolazioni linfocitarie*. Settembre '89.
46. Santini G.F., De Paoli P., Basaglia G.: *Immunologia dell'occhio*. Ottobre '89.
47. Gargani G., Signorini L.F., Mandler F., Genchi C., Rigoli E., Faggi E.: *Infezioni opportunistiche in corso di AIDS*. Gennaio '90.
48. Banfi G., Casari E., Murone M., Bonini P.: *La coriogonadotropina umana*. Febbraio '90.
49. Pozzilli P., Buzzetti R., Procaccini E., Signore E.: *L'immunologia del diabete mellito*. Marzo '90.
50. Cappi F.: *La trasfusione di sangue: terapia a rischio*. Aprile '90.
51. Tortoli E., Simonetti M.T.: *I micobatteri*. Maggio '90.
52. Montecucco C.M., Caporali R., De Gennaro F.: *Anticorpi antinucleo*. Giugno '90.
53. Manni C., Magalini S.I. e Proietti R.: *Le macchine in terapia intensiva*. Luglio '90.
54. Goracci E., Goracci G.: *Gli allergo-acari*. Agosto '90.
55. Rizzetto M.: *L'epatite non A non B (tipo C)*. Settembre '90.
56. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Razzini E. e Gulminetti R.: *Infezione da HIV-1: patogenesi ed allestimento di modelli animali*. Ottobre '90.
57. La Vecchia C. *Epidemiologia e prevenzione del cancro (I)*. Gennaio '91.
58. La Vecchia C. *Epidemiologia e prevenzione del cancro (II)*. Febbraio '91.
59. Santini G.F., De Paoli P., Mucignat G., e Basaglia G., Gennari D.: *Le molecole dell'adesività nelle cellule immunocompetenti*. Marzo '91.
60. Bedarida G., Lizioli A.: *La neopterina nella pratica clinica*. Aprile '91.
61. Romano L.: *Valutazione dei kit immunochimici*. Maggio '91.
62. Dondero F. e Lenzi A.: *L'infertilità immunologica*. Giugno '91.
63. Bologna M. Biordi L. Martinotti S.: *Gli Oncogeni*. Luglio '91.
64. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Gulminetti R., Razzini E., Zambelli A. e Scevola D.: *Infezione-malattia da HIV in Africa*. Agosto '91.
65. Signore A., Chianelli M., Fiore V., Pozzilli P., Andreani D.: *L'immunoscintigrafia nella diagnosi delle endocrinopatie autoimmuni*. Settembre '91.
66. Gentilomi G.A.: *Sonde genetiche in microbiologia*. Ottobre '91.
67. Santini G.F., Fornasiero S., Mucignat G., Besaglia G., Tarabini-Castellani G. L., Pascoli L.: *Le sonde di DNA e la virulenza batterica*. Gennaio '92.

68. Zilli A., Biondi T.: *Il piede diabetico*. Febbraio '92.
69. Rizzetto M.: *L'epatite Delta*. Marzo '92.
70. Bracco G., Dotti G., Pagliardini S., Fiorucci G.C.: *Gli screening neonatali*. Aprile '92.
71. Tavani A., La Vecchia C.: *Epidemiologia delle patologie cardio e cerebrovascolari*. Luglio '92.
72. Cordido F., Peñalva A., De la Cruz L. F., Casanueva F. F., Dieguez C.: *L'ormone della crescita*. Agosto '92.
73. Contu L., Arras M.: *Molecole di membrana e funzione immunologica (I)*. Settembre '92.
74. Ferrara S.: *Manuale di laboratorio I*. Ottobre '92.
75. Gori S.: *Diagnosi di laboratorio dei patogeni opportunisti*. Novembre '92.
76. Ferrara S.: *Manuale di laboratorio II*. Gennaio '93.
77. Pinna G., Veglio F., Melchio R.: *Ipertensione Arteriosa*. Febbraio '93.
78. Alberti M., Fiori G.M., Biddau P.: *I linfomi non Hodgkin*. Marzo '93.
79. Arras M., Contu L.: *Molecole di membrana e funzione immunologica (II)*. Aprile '93.
80. Amin R.M., Wells K.H., Poiesz B.J.: *Terapia antiretrovirale*. Maggio '93.
81. Rizzetto M.: *L'epatite C*. Settembre '93.
82. Andreoni S.: *Diagnostica di laboratorio delle infezioni da lieviti*. Ottobre '93.
83. Tarolo G.L., Bestetti A., Maioli C., Giovanella L.C., Castellani M.: *Diagnostica con radio-nuclidi del Morbo di Graves-Basedow*. Novembre '93.
84. Pinzani P., Messeri G., Pazzagli M.: *Chemiluminescenza*. Dicembre '93.
85. Hernandez L.R., Osorio A.V.: *Applicazioni degli esami immunologici*. Gennaio 94.
86. Arras M., Contu L.: *Molecole di Membrana e funzione immunologica. Parte terza: I Infociti B*. Febbraio '94.
87. Rossetti R.: *Gli streptococchi beta emolitici di gruppo B (SGB)*. Marzo '94.
88. Rosa F., Lanfranco E., Balleari E., Massa G., Ghio R.: *Marcatori biochimici del rimodellamento osseo*. Aprile '94.
89. Fanetti G.: *Il sistema ABO: dalla sierologia alla genetica molecolare*. Settembre '94.
90. Buzzetti R., Cavallo M.G., Giovannini C.: *Citochine ed ormoni: Interazioni tra sistema endocrino e sistema immunitario*. Ottobre '94.
91. Negrini R., Ghielmi S., Savio A., Vaira D., Miglioli M.: *Helicobacter pylori*. Novembre '94.
92. Parazzini F.: *L'epidemiologia della patologia ostetrica*. Febbraio '95.
93. Proietti A., Lanzafame P.: *Il virus di Epstein-Barr*. Marzo '95.
94. Mazzarella G., Calabrese C., Mezzogiorno A., Peluso G.F., Micheli P, Romano L.: *Immunoflogosi nell'asma bronchiale*. Maggio '95.
95. Manduchi I.: *Steroidi*. Giugno '95.
96. Magalini S.I., Macaluso S., Sandroni C., Addario C.: *Sindromi tossiche sostenute da principi di origine vegetale*. Luglio '95.
97. Marin M.G., Bresciani S., Mazza C., Albertini A., Cariani E.: *Le biotecnologie nella diagnosi delle infezioni da retrovirus umani*. Ottobre '95.
98. La Vecchia C., D'Avanzo B., Parazzini F., Valsecchi M.G.: *Metodologia epidemiologica e sperimentazione clinica*. Dicembre '95.
99. Zilli A., Biondi T., Conte M.: *Diabete mellito e disfunzioni conoscitive*. Gennaio '96.
100. Zazzeroni F., Muzi P., Bologna M.: *Il gene oncosoppressore p53: un guardiano del genoma*. Marzo '96.
101. Cogato I. Montanari E.: *La Sclerosi Multipla*. Aprile '96.

102. Carosi G., Li Vigni R., Bergamasco A., Caligaris S., Casari S., Matteelli A., Tebaldi A.: *Malattie a trasmissione sessuale*. Maggio '96.
103. Fiori G. M., Alberti M., Murtas M. G., Casula L., Biddau P.: *Il linfoma di Hodgkin*. Giugno '96.
104. Marcante R., Dalla Via L.: *Il virus respiratorio sinciziale*. Luglio '96.
105. Giovanella L., Ceriani L., Roncari G.: *Immunodosaggio dell'antigene polipeptidico tissutale specifico (TPS) in oncologia clinica: metodologie applicative*. Ottobre '96.
106. Aiello V., Palazzi P., Calzolari E.: *Tecniche per la visualizzazione degli scambi cromatici (SCE): significato biologico e sperimentale*. Novembre '96.
107. Morganti R.: *Diagnostica molecolare rapida delle infezioni virali*. Dicembre '96.
108. Andreoni S.: *Patogenicità di Candida albicans e di altri lieviti*. Gennaio '97.
109. Salemi A., Zoni R.: *Il controllo di gestione nel laboratorio di analisi*. Febbraio '97.
110. Meisner M.: *Procalcitonina*. Marzo '97.
111. Carosi A., Li Vigni R., Bergamasco A.: *Malattie a trasmissione sessuale (2)*. Aprile '97.
112. Palleschi G., Moscone D., Compagnone D.: *Biosensori elettrochimici in Biomedicina*. Maggio '97.
113. Valtriani C., Hurle C.: *Citofluorimetria a flusso*. Giugno '97.
114. Ruggenini Moiraghi A., Gerbi V., Ceccanti M., Barcucci P.: *Alcol e problemi correlati*. Settembre '97.
115. Piccinelli M.: *Depressione Maggiore Unipolare*. Ottobre '97.
116. Pepe M., Di Gregorio A.: *Le Tiroiditi*. Novembre '97.
117. Cairo G.: *La Ferritina*. Dicembre '97.
118. Bartoli E.: *Le glomerulonefriti acute*. Gennaio '98.
119. Bufi C., Tracanna M.: *Computerizzazione della gara di Laboratorio*. Febbraio '98.
120. National Academy of Clinical Biochemistry: *Il supporto del laboratorio per la diagnosi ed il monitoraggio delle malattie della tiroide*. Marzo '98.
121. Fava G., Rafanelli C., Savron G.: *L'ansia*. Aprile '98.
122. Cinco M.: *La Borreliosi di Lyme*. Maggio '98.
123. Giudice G.C.: *Agopuntura Cinese*. Giugno '98.
124. Baccini C.: *Allucinogeni e nuove droghe (I)*. Luglio '98.
125. Rossi R.E., Monasterolo G.: *Basofili*. Settembre '98.
126. Arcari R., Grosso N., Lezo A., Boscolo D., Cavallo Perin P.: *Eziopatogenesi del diabete mellito di tipo I*. Novembre '98.
127. Baccini C.: *Allucinogeni e nuove droghe (II)*. Dicembre '98.
128. Muzi P., Bologna M.: *Tecniche di immunoistochimica*. Gennaio '99.
129. Morganti R., Pistello M., Vatteroni M.L.: *Monitoraggio dell'efficacia dei farmaci antivirali*. Febbraio '99.
130. Castello G., Silvestri I.: *Il linfocita quale dosimetro biologico*. Marzo '99.
131. Aiello V., Caselli M., Chiamenti C.M.: *Tumorigenesi gastrica Helicobacter pylori - correlata*. Aprile '99.
132. Messina B., Tirri G., Fraioli A., Grassi M., De Bernardi Di Valserra M.: *Medicina Termale e Malattie Reumatiche*. Maggio '99.
133. Rossi R.E., Monasterolo G.: *Eosinofili*. Giugno '99.
134. Fusco A., Somma M.C.: *NSE (Enolasi Neurono-Specifica)*. Luglio '99.
135. Chieffi O., Bonferraro G., Fimiani R.: *La menopausa*. Settembre '99.

136. Giglio G., Aprea E., Romano A.: *Il Sistema Qualità nel Laboratorio di Analisi*. Ottobre '99.
137. Crotti D., Luzzi I., Piersimoni C.: *Infezioni intestinali da Campylobacter e microrganismi correlati*. Novembre '99.
138. Giovanella L.: *Tumori Neuroendocrini: Diagnosi e fisiopatologia clinica*. Dicembre '99.
139. Paladino M., Cerizza Tosoni T.: *Umanizzazione dei Servizi Sanitari: il Case Management*. Gennaio 2000.
140. La Vecchia C.: *Come evitare la malattia*. Febbraio 2000.
141. Rossi R.E., Monasterolo G.: *Cellule dendritiche*. Marzo 2000.
142. Dammacco F.: *Il trattamento integrato del Diabete tipo 1 nel bambino e adolescente (I)*. Aprile 2000.
143. Dammacco F.: *Il trattamento integrato del Diabete tipo 1 nel bambino e adolescente (II)*. Maggio 2000.
144. Croce E., Olmi S.: *Videolaparoscopia*. Giugno 2000.
145. Martelli M., Ferraguti M.: *AllergoGest*. Settembre 2000.
146. Giannini G., De Luigi M.C., Bo A., Valbonesi M.: *TTP e sindromi correlate: nuovi orizzonti diagnostici e terapeutici*. Gennaio 2001.
147. Rassa S., Manca M.G., Pintus S., Cigni A.: *L'umanizzazione dei servizi sanitari*. Febbraio 2001.
148. Giovanella L.: *I tumori della tiroide*. Marzo 2001.
149. Dessi-Fulgheri P., Rappelli A.: *L'ipertensione arteriosa*. Aprile 2001.
150. The National Academy of Clinical Biochemistry: *Linee guida di laboratorio per lo screening, la diagnosi e il monitoraggio del danno epatico*. Settembre 2001.
151. Dominici R.: *Riflessioni su Scienza ed Etica*. Ottobre 2001.
152. Lenziardi M., Fiorini I.: *Linee guida per le malattie della tiroide*. Novembre 2001.
153. Fazii P.: *Dermatofiti e dermatofitosi*. Gennaio 2002.
154. Suriani R., Zanella D., Orso Giacone G., Ceretta M., Caruso M.: *Le malattie infiammatorie intestinali (IBD) Eziopatogenesi e Diagnostica Sierologica*. Febbraio 2002.
155. Trombetta C.: *Il Varicocele*. Marzo 2002.
156. Bologna M., Colorizio V., Meccia A., Paponetti B.: *Ambiente e polmone*. Aprile 2002.
157. Correale M., Paradiso A., Quaranta M.: *I Markers tumorali*. Maggio 2002.
158. Loviselli A., Mariotti S.: *La Sindrome da bassa T3*. Giugno 2002.
159. Suriani R., Mazzucco D., Venturini I., Mazzarello G., Zanella D., Orso Giacone G.: *Helicobacter Pylori: stato dell'arte*. Ottobre 2002.
160. Canini S.: *Gli screening prenatali: marcatori biochimici, screening nel 1° e 2° trimestre di gravidanza e test integrato*. Novembre 2002.
161. Atzeni M.M., Masala A.: *La β -talassemia omozigote*. Dicembre 2002.
162. Di Serio F.: *Sindromi coronariche acute*. Gennaio 2003.
163. Muzi P., Bologna M.: *Il rischio di contaminazione biologica nel laboratorio biosanitario*. Febbraio 2003.
164. Magni P., Ruscica M., Verna R., Corsi M.M.: *Obesità: fisiopatologia e nuove prospettive diagnostiche*. Marzo 2003.
165. Magrì G.: *Aspetti biochimici e legali nell'abuso alcolico*. Aprile 2003.
166. Rapporto dello Hastings Center: *Gli scopi della medicina: nuove priorità*. Maggio 2003.
167. Beelke M., Canovaro P., Ferrillo F.: *Il sonno e le sue alterazioni*. Giugno 2003.

168. Macchia V., Mariano A.: *Marcatori tumorali nel cancro della vescica*. Luglio 2003.
169. Miragliotta G., Barra Parisi G., De Sanctis A., Vinci E.: *La Tuberculosis Polmonare: Diagnostica di Laboratorio*. Agosto 2003.
170. Aebischer T.: *Il Comitato Internazionale della Croce Rossa ed il Diritto Internazionale Umanitario*. Settembre 2003.
171. Martino R., Frallicciardi A., Tortoriello R.: *Il manuale della sicurezza*. Ottobre 2003.
172. Canigiani S. e Volpini M.: *Infarto acuto del miocardio: biochimica del danno cellulare e marcatori di lesione*. Novembre 2003.
173. La Brocca A., Orso Giaccone G., Zanella D., Ceretta M.: *Laboratorio e clinica delle principali affezioni tiroidee*. Dicembre 2003.
174. Savron G.: *Le Fobie*. Gennaio 2004.
175. Paganetto G.: *Evoluzione storica del rischio di patologie umane per contaminazione chimica ambientale*. Febbraio 2004.
176. Giovannella L.: *Iperparatiroidismo e tumori paratiroidei*. Marzo 2004.
177. Severino G., Del Zompo M.: *Farmacogenomica: realtà e prospettive per una "Medicina Personalizzata"*. Aprile 2004.
178. Arigliano P.L.: *Strategie di prevenzione dell'allergia al lattice nelle strutture sanitarie*. Maggio 2004.
179. Bruni A.: *Malattia di Alzheimer e Demenza Frototemporale*. Giugno 2004.
180. Perdelli F., Mazzarello G., Bassi A.M., Perfumo M., Dallera M.: *Eziopatogenesi e diagnostica allergologica*. Luglio 2004.
181. Franzoni E., Gualandi P., Pellegrini G.: *I disturbi del comportamento alimentare*. Agosto 2004.
182. Grandi G., Peyron F.: *La toxoplasmosi congenita*. Settembre 2004.
183. Rocca D.L., Repetto B., Marchese A., Debbia E.A.: *Patogeni emergenti e resistenze batteriche*. Ottobre 2004.
184. Tosello F., Marsano H.: *Scientific English Handout*. Novembre 2004.
185. La Brocca A., Orso Giaccone G., Zanella D.: *Ipertensione arteriosa secondaria: clinica e laboratorio*. Dicembre 2004.
186. Paganetto G.: *Malattie Neoplastiche: dalla Paleopatologia alle Fonti Storiche*. Gennaio 2005.
187. Savron G.: *La sindrome dai mille tic: il disturbo di Gilles de la Tourette*. Febbraio 2005.
188. Magri G., Baghino E., Florida M., Ghiara F.: *Leishmania*. Marzo 2005.
189. Lucca U., Forloni G., Tiraboschi P., Quadri P., Tettamanti M., Pasina L.: *Invecchiamento, deterioramento cognitivo e malattia di Alzheimer*. Aprile 2005.
190. Volpe G., Delibato E., Orefice L., Palleschi G.: *Tossinfezioni alimentari e metodiche recenti ed innovative per la ricerca dei batteri patogeni responsabili*. Maggio 2005.
191. Mazzarello M.G., Albalustri G., Audisio M., Perfumo M., L. Cremona G.: *Aerobiologia ed allergopatie*. Giugno 2005.
192. Scalabrino G., Veber D., Mutti E.: *Nuovi orizzonti biologici per la vitamina B12*. Luglio 2005.
193. Zepponi E.: *Guida pratica per gli utenti del laboratorio analisi*. Settembre 2005.
194. Faricelli R., Esposito S., Martinotti S.: *La sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi*. Ottobre 2005.
195. Baccini C., Bezzi F., Conti M., Tazzari V.: *Doping e antidoping nello sport*. Novembre 2005.

196. Lozzi M.: *La Mediazione pacifica dei conflitti. Una risorsa socio-relazionale in ambito medico-sanitario*. Dicembre 2005.
197. Bracco G.: *Progettare un Laboratorio di Analisi*. Gennaio 2006.
198. Angelucci A.: *Apoptosi e sistema immunitario: regolazione e patologie associate*. Febbraio 2006.
199. Commissione Tecnica sul Rischio Clinico: *Risk management in Sanità. Il problema degli errori*. Marzo 2006
200. Casati G., Marchese E., Roberti V., Vichi M.C.: *La gestione dei processi clinico assistenziali per il miglioramento delle prassi*. Aprile 2006.
201. Zanella D., Ceretta M., Orso Giacone G.: *Peptidi natriuretici: nuove frontiere in cardiologia?* Maggio 2006.
202. Cicala M., Dal Lago U., Vinci P., Maggiorotti M.: *L'accusa di malpractice in ambito medico*. Giugno 2006.
203. Martino R.: *Manuale Qualità UNI EN ISO 9001*. Luglio 2006.
204. Mazzarello M.G., Arata M., Perfumo M., Marchese A., Debbia E.A.: *Tubercolosi e micobatteri*. Settembre 2006.
205. Matrullo R.: *Anoressia: la negazione della sessualità come difesa narcisistica*. Ottobre 2006.
206. Crotti D.: *Le parassitosi intestinali ed uro-genitali*. Novembre 2006.
207. Orso Giacone G., Zanella D., Ceretta M.: *Il referto interpretativo in infettivologia*. Dicembre 2006.
208. Baghino E., Magri G., Nicoletti L., Novaro G., Vignale C., Mazzei C.: *Stato dell'arte delle aneuploidie fetali, dall'indagine clinica prenatale alla diagnosi anatomopatologica*. Gennaio 2007.
209. Mazzarello M.G., Brunetti R., Perfumo M., Torriglia A.M., Montresor G.: *Principali Tecniche Analitiche in uso nei Laboratori di Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche*. Febbraio 2007.
210. Orso Giacone G., Zanella D., Ceretta M.: *Celiachia dalla A alla Z*. Marzo 2007.
211. Cingolani M., Sparviero E.: *Decidere ora per allora: il testamento biologico (dichiarazioni anticipate di trattamento)*. Aprile 2007.
212. Barletta G., Pastacaldi V., Peracino A.P.: *La misura dei processi nella medicina di laboratorio*. Maggio 2007.
213. Rassu S., Masia L., Delussu P., Chessa P., Demartis M.G., Moroso G.: *Manuale per il supporto vitale di base e la defibrillazione precoce (BLS-D)*. Giugno 2007.
214. Anchisi R., M. Gambotto Dessy: *Il Burnout del personale sanitario*. Marzo 2008.
215. Gulletta E., Orrico F., Foti D.P.: *Clinical Governance nel Laboratorio Biomedico*. Aprile 2008.
216. Rochira V., Scaltriti S., Zirilli L., Carani C.: *Il ruolo degli estrogeni nel maschio*. Maggio 2008.
217. Gulletta E., Foti D.P., Corsi M.M., Galliera E.: *Citochine e Chemochine*. Giugno 2008.
218. Zambotto F.M.: *La biotecnologia transgenica utilizzata nella produzione degli alimenti di origine vegetale*. Settembre 2008
219. Cavallini M.: *Tecniche di Ringiovanimento del viso*. Ottobre 2008

220. Morra A., Odetto L., Bozza C., Bozzetto P., Agostinis S., Bariona M.: *Compendio di Medicina delle Grandi Emergenze*. Novembre 2008
221. Di Lonardo A., Fagnani C., Pulciani S.: *I Microarray*. Dicembre 2008.
222. Di Lonardo A., Fagnani C., Pulciani S.: *Applicazioni dei microarray (1)*. Marzo 2009



I volumi disponibili su Internet nel sito www.medicalsystems.it sono riportati in nero mentre in grigio quelli non ancora disponibili su Internet.

Inoltre sono disponibili un limitato numero di copie di alcuni numeri del *Caleidoscopio* che ormai sono “storiche”. Qualora mancassero per completare la collana potete farne richiesta al collaboratore Medical Systems della Vostra zona. I numeri sono: *Caleidoscopio* 14, 18, 33, 40, 48, 49, 50, 54, 65, 68, 84, 100, 106, 118, 121, 126, 129, 130, 131, 132, 133, 134. I volumi verranno distribuiti sino ad esaurimento e non verranno ristampati se non in nuove edizioni.

Caleidoscopio
Rivista mensile di Medicina
anno 27, numero 223

Direttore Responsabile

Sergio Rassu
Tel. mobile 338 2202502
E-mail: sergiorassu@yahoo.it

Responsabile Ufficio Acquisti

Giusi Cunietti

Servizio Abbonamenti

Maria Grazia Papalia
Laura Cecchi

Progettazione e Realizzazione



Restless Architect of Human

Possibilities s.a.s.

Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari
Tel. 079 5907759

<http://rahp80.googlepages.com/>

Consulenti di Redazione

Giancarlo Mazzocchi ed
Angelo Maggio

Segretaria di Direzione

Maria Speranza Giola

EDITORE

...il futuro ha il cuore antico.  **MEDICAL SYSTEMS SpA**

Via Rio Torbido, 40

16165 Genova (Italy)

Tel. 010 83401 Numero Verde 800 801005 (senza prefisso);

Telefax 010/8340310- 809070.

Internet URL: <http://www.medicalsystems.it>

La Medical Systems pubblica anche le seguenti riviste: *Caleidoscopio Illustrato*,
Caleidoscopio Letterario, *Guida Pratica Immulite®*, *Guida Pratica Città*, *Journal of Clinical*
Ligand Assay, *Pandora*, *Tribuna Biologica e Medica*.

Stampa

Tipolitografia Nuova ATA

Via Gelasio Adamoli, 281 - Genova

Tel. 010 513120 - Fax 010 503320 - info@nuovaata.com - www.nuovaata.com

Registrazione Tribunale di Genova n. 34 del 31/7/1996

Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa n° 2661 del 2 Settembre 1989

Iscrizione al Registro degli Operatori di Comunicazione (ROC) n° 1188

Finito di stampare: Giugno 2009

Sped. in Abb. Post. 45%

Pubblicazione protetta a norma di legge dall'Ufficio proprietà letteraria, artistica e scientifica della Presidenza del Consiglio dei Ministri, dedicata all'aggiornamento professionale continuo e riservata ai medici.

Caleidoscopio viene anche letto e rilanciato da:

"L'ECO DELLA STAMPA"

Via Compagnoni, 28 - Milano

