

TITOLO:

FARMACOGENETICA DELL'IPERTENSIONE: STUDIO MONOCENTRICO RANDOMIZZATO IN PAZIENTI AFFETTI DA IPERTENSIONE ESSENZIALE E TRATTATI CON SPIRONOLATTONE O TORASEMIDE (ALTUM)

IDENTIFICATIVO PROTOCOLLO: ALTUM (RF-2016-02362623)

EudraCT Number: 2020-001014-37

Lo studio ALTUM è uno studio monocentrico randomizzato che prevedeva l'arruolamento di pazienti ipertesi essenziali mai trattati per l'ipertensione o non a target pressorio per essere trattati in monoterapia con torasemide o spironolattone sulla base del genotipo per i polimorfismi *UMOD* rs4293393 T>C e *LSS* rs2254524 C>A.

La flow chart sottostante riporta le procedure previste dallo studio:

Figura 1. Flow chart dello studio

	Run-in di 14-28 giorni Con dieta iposodica		Torasemide 2.5 mg oppure Spironolattone 50 mg per bocca	Fine studio
	VISITA di SCREENING (T-4)	VISITA di RUN-IN (±7gg) (T-2)	VISITA DI INIZIO (±7gg) (T0)	VISITA fine TRATTAMENTO (±7gg) (T4)
VISITA NUMERO	1	2	3	4
Giorno	-28	-14	0	+28
Dati anagrafici	X			
Anamnesi	X		X	
Patologie concomitanti	X	X	X	X
Terapie pregresse	X			
Terapie in atto	X	X	X	X
Misurazione PA e FC con OMRON	X	X	X	X
Valori PA di riferimento (mmHg)	X	X	X	
Verifica criteri di inclusione ed esclusione	X	X	X	X
Consenso informato	X			
Visita medica	X	X	X	X
Dati antropometrici	X	X	X	X
Prelievo ematico		X		X
Raccolta urine spot		X		X
Raccolta urine 24 ore	Dare istruzioni	X		
Assegnazione terapia			X	
Prelievo per genoma e assegnazione codice	X			
Verifica eventi avversi (EA)				x
Raccomandazioni per dieta iposodica e ipopotassica per chi è trattato con Spironolattone	X		X	
Sospensione terapia anti- ipertensiva	X			
Raccolta urine per metaboloma			X	X

Lo studio ALTUM è iniziato con l'arruolamento del primo paziente il giorno 11 febbraio 2021 e si è concluso con l'ultima visita in giorno 7 luglio 2023. Lo studio è stato chiuso presso CE OSR il giorno 17 ottobre 2023.

Sulla base della nostra pluriennale esperienza, al momento della stesura del progetto avevamo previsto come principale fonte di reclutamento per i pazienti l'Ambulatorio di Ipertensione presso OSR al quale affluivano circa 100-150 pazienti ipertesi di nuova diagnosi ogni anno. Lo studio è iniziato poco prima dello scoppio della pandemia di COVID19 che ha profondamente influito sulla gestione clinica dei pazienti ipertesi ambulatoriali determinando una notevole diminuzione dell'affluenza presso i centri ospedalieri.

Nello studio ALTUM sono stati complessivamente arruolati 48 pazienti ipertesi le cui caratteristiche basali sono riportate in Tabella 1

Tabella 1. Caratteristiche dei 48 pazienti arruolati.

	Media	DS
Età	51,40	8,53
BMI_v1	26,08	2,44
Media PAS_v1 (mmHg)	149,03	9,97
Media PAD_v1 (mmHg)	95,14	6,17
Media FC_v1 (bpm)	75,46	12,46
	Frequenza	%
Sesso	F	5 10,4
	M	43 89,6
	Totale	48 100,0

Gli esami ematochimici sono stati eseguiti alla visita 2 per valutare i criteri di arruolamento.

I dati clinici ed ematochimici rivelano una popolazione molto omogenea, normopeso e senza co-patologie, affetta da ipertensione essenziale di grado I-II.

Dopo il periodo di run-in di 2-4 settimane i soggetti randomizzati e che hanno concluso il trattamento sono stati 27.

In 38 soggetti i valori pressori si sono ridotti con la dieta iposodica consigliata alla visita di arruolamento nel periodo di run-in (Tabella 2).

Tabella 2. Variazione della pressione arteriosa dopo dieta iposodica durante run-in nei 48 pazienti arruolati.

	Media (mmHg)	DS (mmHg)
Media PAS_v1	149.74*	9.76
Media PAS_v3	140.77*	9.98
Media PAD_v1	95,54 **	5,84
Media PAD_v3	93,18**	6,84

*MANOVA $p < 0,0001$

**MANOVA $p = 0,047$

Durante in run-in e per effetto della riduzione del sodio con la dieta i valori pressori si sono normalizzati in 10 pazienti che quindi sono stati esclusi dallo studio.

Per tale motivo sono stati randomizzati 28 pazienti.

Il procedimento di randomizzazione è stato eseguito secondo il seguente iter: i pazienti durante la visita 1 sono stati sottoposti a prelievo di sangue in parte utilizzato per l'estrazione del DNA genomico. Ad ogni paziente alla visita 1 è stato assegnato un codice ALTUM (ALT) consecutivo. Il DNA è stato poi analizzato mediante Real-Time PCR (tecnologia TaqMan) per ottenere i genotipi relativi ai polimorfismi *UMOD* rs4293393 T>C e *LSS* rs2254524 C>A.

L'arruolamento è stato effettuato in cieco in base alla combinazione genotipica di questi due SNP. Una volta ottenuti i due genotipi, ogni singolo paziente veniva randomizzato mediante un file apposito protetto da password accessibile ai ricercatori ma non ai medici. In particolare, in base alla composizione genotipica il paziente veniva allocato in uno dei 6 sottogruppi genotipici, ognuno dei quali era suddiviso in 2 diverse colonne di trattamento (Torasemide/Spironolattone). I pazienti sono stati randomizzati ad uno dei due trattamenti in modo bilanciato secondo un rapporto 1:1, in ordine di tempo di allocazione

Alla visita 3, il personale di laboratorio ha comunicato ai clinici la randomizzazione del paziente con lo specifico trattamento (Torasemide o Spironolattone) ed è stato assegnato un codice di randomizzazione consecutivo, mantenendo in cieco il sottogruppo genotipico.

Complessivamente sono stati quindi randomizzati 28 pazienti. Durante il periodo di trattamento non è stato osservato nessun evento avverso serio (SAE) e nessuna sospetta reazione avversa grave e inattesa (SUSAR). Un paziente ha sospeso precocemente il trattamento per inefficacia come previsto dal protocollo.

27 pazienti hanno quindi concluso il trattamento di 4 settimane, 13 pazienti con Spironolattone e 14 pazienti con Torasemide.

Risultati complessivi

Nei 27 pazienti randomizzati al trattamento si sono osservati una caduta significativa della pressione sistolica (PAS) e diastolica (PAD) e un aumento dei valori di Aldosterone plasmatico come atteso in abse alle caratteristiche dei farmaci diuretici utilizzati.

In particolare, i valori pressori sistolici sono diminuiti in media da 143,47 a 137 mmHg e quelli diastolici da 96 a 91 mmHg. Non sono state osservate differenze basali (a T0) tra i due gruppi di trattamento rispetto ai valori pressori e ai livelli di aldosterone plasmatico. (tabella 3)

Tabella 3. Confronto tra i valori di pressione, aldosterone e sodiuria basale nei due gruppi di trattamento

Trattamento		Media PAS_v3 (mmHg)	Media PAD_v3 (mmHg)	Aldo_v2 (ng/dl)	Sodiuria_24h_v2 (mEq/24h)
Spironolattone (N = 13)	Media	143,36	94,64	122,6	130,23
	DS	11,21	4,13	45,28	50,01
Torasemide (N = 14)	Media	143,58	97,30	133,80	125,24
	DS	7,27	4,68	71,30	67,08
Totale (N = 27)	Media	143,47	96,02	128,62	127,54
	DS	9,19	4,54	59,82	58,71

Si osserva un effetto significativamente maggiore dello Spironolattone rispetto a Torasemide nel ridurre la PAD, indipendentemente dal background genetico. (MANOVA p=0.025 tra soggetti per trattamento) (figura 2)

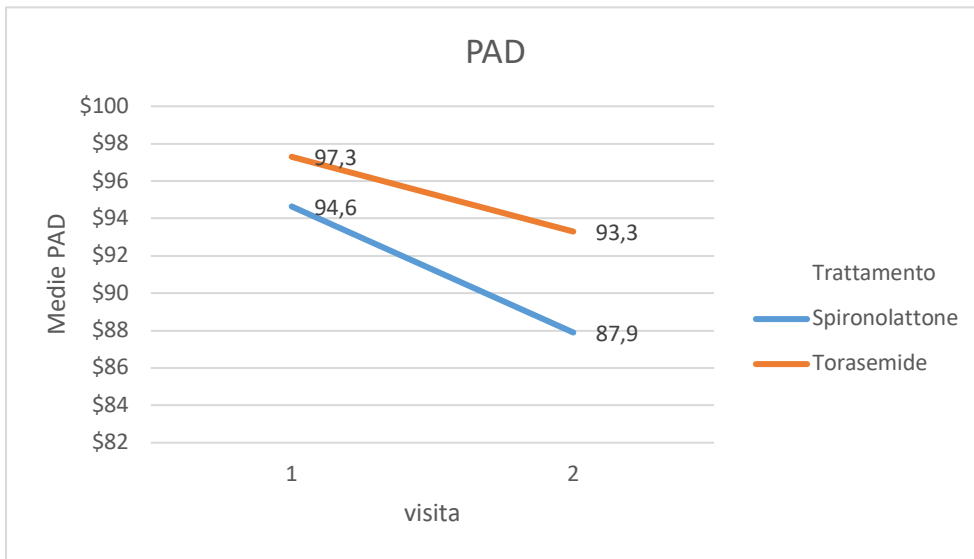


Figura 2. Variazione della pressione arteriosa distolica nei due gruppi di trattamento

Tale dato è in linea con gli ultimi dati della letteratura che suggeriscono di utilizzare farmaci inibitori del sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAASi) per ottimizzare il controllo pressorio.

La differenza di efficacia dei due farmaci si evidenzia maggiormente confrontando i valori pressori sistolici e diastolici raggiunti al termine del trattamento. Da tale analisi emerge che solo i pazienti trattati con Spironolattone hanno raggiunto valori pressori target (PAD<90 mmHg alla visita).

Considerando invece la variazione di PAS e PAD tra inizio e fine trattamento non si evidenzia nessuna differenza statisticamente significativa tra i due trattamenti, anche se il trattamento con Spironolattone permette di ottenere delle cadute pressorie maggiori.

La variazione di aldosterone tra la fine del trattamento e la visita di run-in è risultata maggiore nei pazienti trattati con Spironolattone: nei soggetti trattati con Spironolattone si osserva un aumento notevole di aldosterone plasmatico che non è presente nei pazienti trattati con Torasemide (t-test, $p < 0,002$). (figura 3)

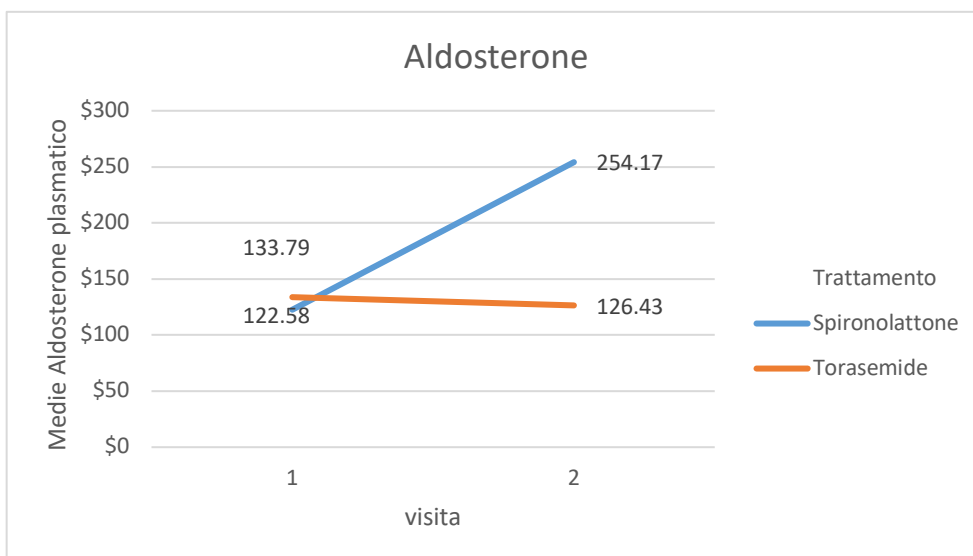


Figura 3. Variazione di aldosterone nei due gruppi di trattamento

Questo è indicativo della maggiore riduzione di volume circolante che spiega quindi la maggiore risposta pressoria sistolica.

Abbiamo successivamente valutato la % di soggetti che raggiungono il target pressorio <140/90 (responder) nei due gruppi di trattamento. Nella totalità del campione solo 18 soggetti sono risultati responder (67%) e 8 non responder (33%), dato in linea con la letteratura.

Anche questo tipo di analisi ha confermato la tendenza alla maggiore efficacia dello spironolattone. (figura 4)

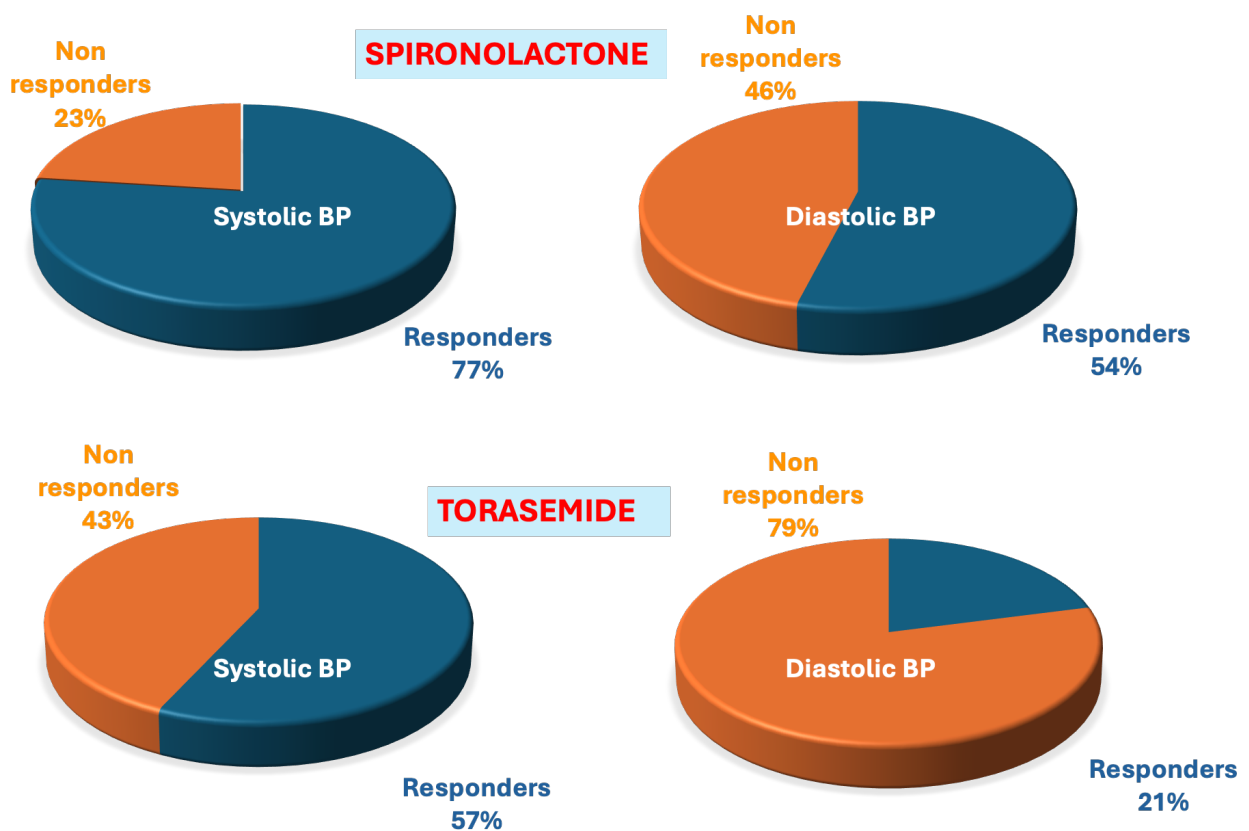


Figura 4. Percentuale di responders in base al trattamento

Effetto del trattamento farmacologico in relazione alle varianti nei geni LSS e UMOD

Abbiamo quindi valutato la diversa risposta ai trattamenti sulla base del background genetico. Tale analisi è resa difficile dalla scarsa numerosità dei gruppi genotipici. Abbiamo quindi preferito utilizzare le metodiche di analisi continua per variazione di pressione arteriosa e test non parametrici.

Il trattamento con Torasemide è stato concluso da 14 pazienti.

L'analisi dell'effetto del genotipo *LSS* mostra una maggiore risposta della pressione sistolica nei pazienti portatori della variante allelica A che però non raggiunge la significatività statistica, verosimilmente a causa della scarsa numerosità (Tabella 4)

Tabella 4. Effetto sulla PAS del trattamento con Torasemide e genotipo *LSS* rs2254524.

dPAS_v4_v3	N	Media	DS
AA	2	-5,85	0,21
AC	5	-6,90	6,01
CC	7	-2,77	6,01

p=ns; dPAS_v4_v3=variazione di PAS tra la visita 4 (fine trattamento) e la visita 3 (inizio trattamento)

Il genotipo *LSS* non influenza la risposta della PAD a Torasemide.

Per quel che riguarda il genotipo *UMOD* invece non si sono osservate differenze nella risposta per la pressione sistolica e diastolica dopo 4 settimane di trattamento con Torasemide.

Dai nostri dati non emerge un effetto del genotipo *LSS* sulla risposta pressoria al trattamento con Spironolattone.

Il genotipo di *UMOD* invece influenza la risposta della PAS e della PAD a Spironolattone, in quanto i soggetti portatori del genotipo CT hanno una caduta pressoria sistolica di 12,90 mmHg e diastolica di 12,60 mmHg rispetto a 7,20 e 4,99 mmHg nei soggetti TT (Tabella 5). Tali differenze non raggiungono la significatività statistica per la scarsa numerosità del gruppo CT, ma considerando i valori pressori raggiunti a fine trattamento i pazienti portatori del genotipo CT raggiungono valori significativamente più bassi (Mann-Whitney p=0,028).

Tabella 5. Effetto sulla PAS del trattamento con Spironolattone e genotipo *UMOD* rs4293393

dPAS_v4_v3	N	Media	DS
CT	3	-12,90	6,40
TT	10	-7,20	7,31

p=ns; dPAS_v4_v3=variazione di PAS tra la visita 4 (fine trattamento) e la visita 3 (inizio trattamento)

In conclusione, la variante genica *UMOD* influenza la risposta al trattamento con Spironolattone, mentre la variante *LSS* non sembra influenzare la risposta al diuretico.

Per quanto riguarda la variazione di aldosterone tra la fine del trattamento e la visita di run-in, sulla base delle due varianti geniche *LSS* e *UMOD*, si osserva una diversa variazione di aldosterone, anche se non si raggiunge la significatività statistica intra-trattamento per la scarsa numerosità.

Come previsto dal progetto, abbiamo effettuato le analisi di interazione genotipica separatamente sia sul trattamento con Spironolattone sia con Torasemide. Emerge un ruolo delle diverse combinazioni genotipiche. In particolare, nel trattamento con Torasemide la combinazione *LSS AC+CC/UMOD TT* sembra conferire resistenza alla terapia.

Studio metabolomica urinaria

Un'ultima attività prevista dal progetto era lo studio della metabolomica urinaria dei pazienti dello studio ALTUM. Le analisi sono state eseguite dalla facility interna al nostro Istituto (ProMiFa).

I campioni di urina raccolti alla visita T0 e T4 e sono stati sottoposti a profilazione metabolomica utilizzando la cromatografia liquida ad altissima prestazione (UPLC) con colonne BEH Amide e C18. Il rilevamento dei metaboliti è stato eseguito utilizzando uno spettrometro di massa Triple TOF 5600 più in modalità di polarità positiva e negativa.

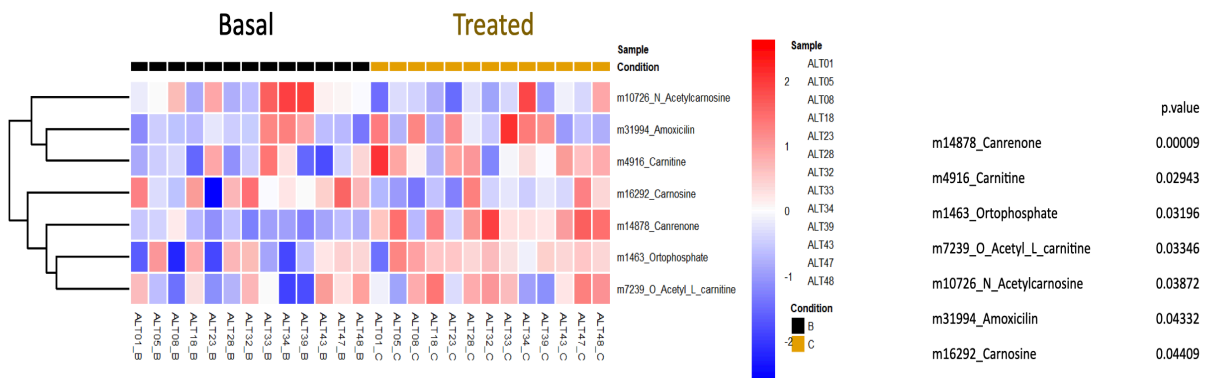
L'analisi metabolomica ha rivelato un arricchimento dopo la terapia dei metaboliti coinvolti nel metabolismo energetico, risposta allo stress, e ciclo di metilazione.

In particolare i soggetti responder alla torasemide hanno mostrato alterazioni nei metaboliti collegati al metabolismo del glucosio e dei carboidrati, alla produzione dei lipidi e alla funzione mitocondriale.

Al contrario, i responder allo spironolattone hanno mostrato metaboliti arricchiti associati al metabolismo degli amminoacidi, al metabolismo dei lipidi, alla funzione mitocondriale e allo stress ossidativo.

SPIRONOLATTONE

Normalised per urine density, Log transformation, Pareto Scaling, paired t-Test
7 metabolites $p < 0.05$ out of 242



Spirolactone_SBP Responders



Spirolactone_DBP Responders

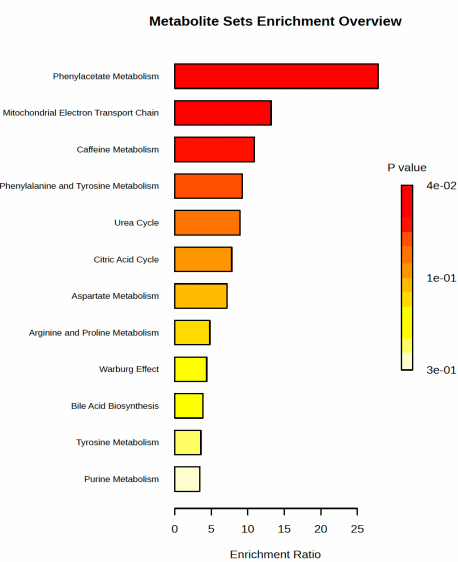


Figura 5: risultati della analisi sul metaboloma urinario

In conclusione, lo studio ALTUM, nonostante la bassa numerosità campionaria ci ha consentito di confermare la superiorità del trattamento con Spironolattone rispetto a Torasemide anche nell'ipertensione essenziale di primo riscontro e in monoterapia. Questa maggiore efficacia si associa a una più marcata salita dell'aldosterone plasmatico.

L'analisi genotipica ci ha mostrato che il genotipo LSS influenza la risposta a Torasemide e quello di UMOD a Spironolattone. Tali dati dovranno essere interpretati anche tenendo conto dei meccanismi di compenso ormonali, renali e vascolari alla terapia diuretica.

In conclusione, lo studio ALTUM, nonostante la bassa numerosità campionaria ci ha consentito di confermare la superiorità del trattamento con spironolattone rispetto a Torasemide anche nell'ipertensione essenziale di primo riscontro e in monoterapia. Questa maggiore efficacia si associa a un più marcato aumento dell'aldosterone plasmatico.

CONCLUSIONI

I risultati delle analisi eseguite sul metaboloma urinario evidenziano che, Spironolactone agisce principalmente sul metabolismo degli aminoacidi e dei lipidi e sullo stress ossidativo (figura 5).

Al contrario, Torasemide ha avuto un impatto principalmente sul metabolismo del glucosio e dei carboidrati. Sono necessari ulteriori studi guidati da profili genetici e metabolici per migliorare i risultati della terapia antipertensiva personalizzata.

Milano, 8 aprile 2025



Prof.ssa Chiara Lanzani (PI)