



SIF - FARMACOGENETICA



Newsletter Numero 8 - Giugno 2009

Attenzione: le informazioni riportate hanno solo un fine illustrativo
e non sono riferibili né a prescrizioni né a consigli medici

Sommario

- Studio farmacogenetico sulla disfunzione tubulare renale in pazienti infetti da HIV trattati con Tenofovir
- Il gene triptofano idrossilasi-2 è associato all'insorgenza della depressione maggiore e alla risposta clinica al trattamento con farmaci antidepressivi
- Espressione di PTEN e mutazioni di *KRAS* in tumori primari e metastasi nel predire i benefici da cetuximab più irinotecan per pazienti con carcinoma coloretale metastatizzato
- Studio di associazione tra discinesia tardiva e cinque polimorfismi del gene *DRD4* in pazienti schizofrenici
- L'interazione tra i polimorfismi nei geni *BCL2* ed Interleuchina 10 influenza la risposta alla chemioterapia con Rituximab plus CHOP nel Linfoma a Cellule B Large Diffuse
- Polimorfismi nei geni codificanti per il trasportatore dei folati in forma ridotta e della metilentetraidrofolato reductasi: associazione con la risposta al trattamento farmacologico nella leucemia linfoblastica acuta infantile

STUDIO FARMACOGENETICO SULLA DISFUNZIONE TUBULARE RENALE IN PAZIENTI INFETTI DA HIV TRATTATI CON TENOFOVIR

A cura della Dott.ssa Cristina Tonello

Tenofovir disoproxil fumarato (TDF) è un analogo nucleotidico aciclico degli inibitori della trascrittasi inversa (NtRTIs). E' consigliato in combinazione con altri agenti antiretrovirali nel trattamento dell'infezione da virus HIV-1. A differenza degli inibitori nucleosidici che necessitano di una tripla fosforilazione intracellulare per trasformarsi nel metabolita attivo, il tenofovir è un nucleoside già fosforilato (nucleotide) che non richiede la prima delle tre fosforilazioni intracellulari. Si tratta di un pro-farmaco attivo contro il virus HIV e dell'epatite B; dopo somministrazione orale, viene rapidamente idrolizzato dalle esterasi plasmatiche a tenofovir. Come tale viene inglobato nelle cellule e sottoposto a fosforilazione per formare il difosfato che compete con il substrato deossadenosina-5-trifosfato inibendo competitivamente la transcriptasi inversa diretta a DNA e RNA. Il tenofovir ha una emivita plasmatica di 12-18 ore e una emivita intracellulare di 10-50 ore. Scarsamente legato alle proteine plasmatiche, viene eliminato soprattutto per via renale come farmaco immodificato tramite filtrazione glomerulare e secrezione tubulare. In seguito a trattamento con TDF sono stati descritti diversi casi di disfunzione tubulare, incluso lo sviluppo della Sindrome di Fanconi. Questa anomalia è caratterizzata da vari difetti della funzione tubulare prossimale, compreso il deficit di riassorbimento tubulare di glucosio, fosfato, aminoacidi, bicarbonato, acido urico, acqua, potassio e sodio. L'aminoaciduria è generalizzata e, a differenza della cistinuria, l'escrezione aumentata di cistina costituisce una componente secondaria. Nella forma ereditaria di sindrome di Fanconi le caratteristiche cliniche principali sono acidosi tubulare prossimale, rachitismo ipofosfatemico, ipokaliemia, poliuria e polidipsia. Inoltre si sviluppa una nefrite interstiziale che porta a insufficienza renale progressiva, a volte letale prima dell'adolescenza. Nell'adulto con sindrome di Fanconi acquisita sono presenti acidosi tubulare renale (tipo prossimale), ipofosfemia, ipokaliemia e sintomi conseguenti all'osteopatia

(osteomalacia) e debolezza muscolare. Esistono, pertanto, molti dubbi sulla sicurezza dell'utilizzo di TDF per tempi prolungati. Il meccanismo tramite il quale si sviluppa questo danno renale non è ancora noto, sebbene un ruolo potrebbe essere giocato dalle proteine trasportatrici presenti a livello tubulare. TDF entra nelle cellule epiteliali dei tubuli renali attraverso i trasportatori degli anioni organici (OATs), principalmente OAT1 e OAT3, codificati rispettivamente dai geni *SLC22A6* e *SLC22A8*. Una volta entrato nelle cellule tubulari la sua secrezione è un processo attivo che coinvolge diversi trasportatori tra cui MRP2 e MRP4, codificate rispettivamente dai geni *ABCC2* e *ABCC4*. Se tale efflusso è limitato TDF si può accumulare a livello delle cellule epiteliali tubulari e quindi interferire con la funzione renale.

L'obiettivo di questo studio era l'analisi della correlazione tra polimorfismi presenti a livello dei geni *ABCC2*, *ABCC4*, *ABCB1*, *SLC22A6* e *SLC22A11*.

Sono stati arruolati 124 pazienti infettati da HIV-1 in terapia con Tenofovir. La disfunzione tubulare era determinata sulla base della presenza di almeno due delle seguenti anomalie: glicosuria non diabetica, iperfosfaturia, iperaminoaciduria, β 2-microglobulinuria e aumento della clearance frazionata dell'acido urico. Sono stati analizzati 12 SNPs nei geni *ABCC2*, *ABCC4*, *ABCB1*, *SLC22A6* e *SLC22A11* selezionati sulla base del significato funzionale o di una frequenza maggiore del 5% nella popolazione dell'allele minore. La genotipizzazione è stata eseguita tramite sequenziamento diretto o quando disponibile con saggi TaqMan 5'-nuclease (TaqMan SNP Genotyping Assays; Applied Biosystems). 19 pazienti (16,5%) hanno sviluppato disfunzione tubulare renale. L'analisi degli SNPs ha rivelato una maggiore percentuale (24%) di individui con disfunzione tubulare renale tra gli omozigoti C alla posizione -24 di *ABCC2* rispetto alla percentuale (6%) di pazienti con altri genotipi. Non sono state osservate altre differenze statisticamente significative. Una analisi multivariata ha indicato i seguenti parametri indipendentemente associati a disfunzione tubulare renale: maggiore età, peso corporeo minore e omozigosità per l'allele C alla posizione -24 di *ABCC2*.

Gli autori fanno tre ipotesi per spiegare come questo polimorfismo a carico della proteina MRP2 può aumentare il rischio di disfunzione tubulare renale: i) TDF potrebbe essere escreto meno efficientemente e una sua maggiore concentrazione potrebbe essere dannosa per le cellule tubulari; ii) MRP-2 potrebbe trasportare una proteina o un molecola endogena non ancora conosciuta che a sua volta influenzerebbe la tossicità di TDF; iii) -24 *ABCC2* potrebbe essere in linkage disequilibrium con altri SNPs in geni per proteine non note che influenzano la funzionalità tubulare. Il lavoro presenta parecchie limitazioni, innanzitutto il numero limitato di pazienti e dei trasportatori coinvolti nell'eliminazione di TDF presi in considerazione. Inoltre i pazienti scelti erano in terapia con TDF da molto tempo e questo potrebbe aver causato l'esclusione di quei pazienti che manifestano gravi problemi renali nelle fasi iniziali del trattamento.

In conclusione questo studio raccomanda di monitorare più frequentemente la funzionalità renale dei pazienti omozigoti CC alla posizione -24 del gene *ABCC2*, in quanto sono soggetti con un rischio elevato di sviluppare tubulopatia associata al trattamento con Tenofovir.

Conflitto di interesse: alcuni degli autori dichiarano conflitti di interesse

Parole chiave: HIV, Tenofovir, disfunzione tubulare renale

Riferimento bibliografico:

[Rodríguez-Nóvoa S](#) et al. *Clin Infect Dis*. 2009, 48(11):e108-16.

IL GENE TRIPTOFANO IDROSSILASI-2 È ASSOCIATO ALL'INSORGENZA DELLA DEPRESSIONE MAGGIORE E ALLA RISPOSTA CLINICA AL TRATTAMENTO CON FARMACI ANTIDEPRESSIVI

A cura del Dott. Salvatore Terrazzino

La triptofano-idrossilasi (TPH) è l'enzima limitante della biosintesi della serotonina (5-HT) che converte l'aminoacido triptofano in 5-idrossitriptofano, a sua volta decarbossilato a 5-HT ad opera dell'aminoacido decarbossilasi. Nell'uomo esistono due isoforme di TPH: l'isoforma TPH1, la cui espressione è stata

dimostrata nella ghiandola pineale, nel SN periferico e nel SNC embrionale, e l'isoforma TPH2, localizzata esclusivamente nel SNC adulto ed in particolare a livello dei nuclei del rafe mediano e dorsale. Poiché la TPH2 gioca un ruolo cruciale nella biosintesi della serotonina a livello del SNC, varianti del gene TPH2 potrebbero essere coinvolte nella variabilità interindividuale della risposta agli inibitori selettivi del *reuptake* della serotonina (SSRI), comunemente utilizzati per il trattamento farmacologico della depressione maggiore (DM).

In questo lavoro gli Autori hanno valutato in pazienti affetti da DM l'associazione di cinque varianti note del gene TPH2 con l'insorgenza della malattia e con la risposta al trattamento antidepressivo con SSRI.

In questo studio sono stati reclutati 508 pazienti cinesi di etnia Han (208 maschi e 300 femmine) con diagnosi di DM. I criteri di inclusione nello studio erano uno score minimo di 18 nella scala di Hamilton (21-item *Hamilton Depression Rating Scale*, HAM-D) e la presenza di sintomi depressivi da almeno due settimane; criteri di esclusione: diagnosi di altre patologie appartenenti all'asse I del DSM-IV (schizofrenia, disturbi bipolari, disturbi della personalità, abuso di sostanze, disordini ossessivi-compulsivi), gravidanza e disturbi neurologici. Oltre ai pazienti affetti da DM sono stati inclusi nello studio 463 soggetti sani di controllo (rapporto maschi/femmine: 212/251, età media 41.6 anni). Un sottogruppo di questi pazienti è stato sottoposto al trattamento antidepressivo con fluoxetina o citalopram ad una dose iniziale di 20 mg giornaliera fino ad un massimo di 40 mg/day. Sono stati definiti *responders* i pazienti che avevano avuto almeno il 50 % di riduzione del punteggio nella scala HAM-D al termine di 8 settimane di trattamento con SSRI. Per quanto riguarda l'analisi genotipica, sono stati valutati 5 SNPs nel gene TPH2: due di questi (rs4131348 e rs2171363) sono stati selezionati sulla base di precedenti evidenze che suggeriscono una loro associazione con il disturbo bipolare o la DM, mentre il polimorfismo rs1386492 è stato selezionato poiché è in forte *linkage disequilibrium* con la variante rs1386494 che uno studio precedente avevano trovato associato alla DM, ma il cui allele minore ha una bassa frequenza nella popolazione cinese esaminata (3%). Gli altri due SNPs considerati (rs42900270 e rs17110747) sono localizzati rispettivamente nella regione codificante e nella regione non trascritta al 3' del gene TPH2.

Nell'analisi per singoli loci, la distribuzione genotipica ($P=0.002$) e la frequenza allelica ($P=0.001$) evidenziano un'associazione significativa della variante rs17110747 con la DM. In particolare, i pazienti omozigoti rs17110747-GG hanno un maggior rischio d'insorgenza di malattia (OR =1.75) rispetto ai portatori dell'allele rs17110747-A. L'analisi genetica ha inoltre evidenziato nei soggetti controlli un forte *linkage disequilibrium* ($r^2=0.93$) tra due dei cinque markers analizzati (rs2171363 e rs1386492). Per questo motivo è stata valutata la distribuzione aplotipica dei polimorfismi rs2171363 e rs1386492 nei soggetti controllo e nei pazienti affetti da DM. I risultati tuttavia non hanno evidenziato l'associazione di uno specifico aplotipo dei markers rs2171363-rs1386492 con il rischio d'insorgenza della malattia.

Dei 187 pazienti con DM che hanno completato le 8 settimane di trattamento antidepressivo con fluoxetina o citalopram, 126 (67,4%) hanno avuto una riduzione di almeno il 50% del punteggio nella scala HAM-D. Pazienti *responders* (R) e *non-responders* (NR) non differiscono per sesso (R vs NR (M/F): 51/75 vs 26/35, $P=0.874$), età (R vs NR: 44.2 ± 15 vs 44.1 ± 15.4 , $P=0.948$) o score iniziale nella scala HAM-D (R vs NR: 28.3 ± 4.6 vs 27.7 ± 4.8 , $P=0.455$). L'analisi per singoli loci ha mostrato una differente distribuzione genotipica del polimorfismo rs2171363 tra pazienti *responders* e *non-responders* ($P=0.009$). In particolare, i pazienti eterozigoti per il polimorfismo rs2171363 hanno una maggiore probabilità di rispondere al trattamento con SSRI rispetto ai pazienti omozigoti (CC o TT) (OR 2.61, 95% CI=1.37-4.95). Non sono state evidenziate differenze significative nella distribuzione aplotipica dei polimorfismi rs2171363-rs1386492 tra pazienti *responders* e *non-responders* (P globale=0.287).

In conclusione, i risultati dello studio mostrano un'associazione della variante rs2171363 con la risposta di pazienti cinesi al trattamento antidepressivo con SSRI. In particolare, i pazienti eterozigoti per la variante rs2171363 hanno una maggiore probabilità di risposta rispetto ai portatori in omozigosi della variante maggiore o minore.

Malgrado non sia ancora noto il ruolo funzionale della variante rs2171363 del gene TPH2 sarebbe comunque importante la conferma di questi risultati preliminari anche nella popolazione caucasica.

Parole chiavi: Depressione maggiore, SSRI, gene TPH2

Riferimento bibliografico

[Tsai SJ](#) et al. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2009, 33(4):637-41.

ESPRESSIONE DI PTEN E MUTAZIONI DI KRAS IN TUMORI PRIMARI E METASTASI NEL PREDIRE I BENEFICI DA CETUXIMAB PIÙ IRINOTECAN PER PAZIENTI CON CARCINOMA COLORETTALE METASTATIZZATO

A cura della Dott.ssa Valentina Boscaro

Il cetuximab è approvato in Europa per il trattamento di pazienti con carcinoma coloretale metastatizzato (mCRC) EGFR-positivo e con *KRAS wild-type*; gli studi clinici hanno però evidenziato una mancata correlazione tra espressione di EGFR e *outcome* clinici ed è ormai accettato che l'espressione immunohistochimica (IHC) di EGFR non predice la risposta al trattamento con questo farmaco.

L'attenzione è stata quindi focalizzata sul *pathway* di EGFR, in particolare sull'asse KRAS/BRAF/MAPK (*mitogen-activated protein kinases*). Le mutazioni di *KRAS*, presenti in circa il 40% di CRC, hanno un valore predittivo negativo sulla risposta al cetuximab, ma anche in questo gruppo la risposta al farmaco è solo del 10%, evidenziando la necessità di trovare fattori alternativi per identificare pazienti con tumore *KRAS wild-type* che non beneficiano di questo trattamento farmacologico.

Dati preclinici hanno dimostrato l'importanza di un *pathway* PTEN/PI3K/AKT funzionale nel determinare la sensibilità al cetuximab in linee cellulari di CRC: mutazioni attivanti di *PIK3CA* e perdita di PTEN conferiscono resistenza all'apoptosi farmaco-indotta.

Scopo di questo studio è stato quindi determinare l'impatto della perdita di PTEN, della fosforilazione di AKT e delle mutazioni di *KRAS*, valutate sia su tumore primario che su metastasi, sulla resistenza al cetuximab e irinotecan in pazienti con mCRC EGFR-positivo e irinotecan-refrattorio.

Si tratta di uno studio di coorte retrospettivo, longitudinale, multicentrico, condotto in Italia. I pazienti con mCRC refrattario a irinotecan (la malattia è progredita durante o entro 3 mesi di trattamento con irinotecan), trattati con cetuximab e irinotecan, sono stati considerati eleggibili se avevano un adenocarcinoma EGFR-positivo, confermato istologicamente, malattia misurabile e campioni paraffinati di tumore primario o metastasi disponibili. La risposta è stata valutata ogni 8 settimane attraverso una tomografia computerizzata in accordo a *Response Evaluation Criteria in Solidi Tumors* (RECIST). Sui campioni (96 di tumore primario, 59 di metastasi e 53 coppie di campioni) è stata effettuata l'analisi mutazionale per *KRAS* e valutata l'espressione di EGFR, PTEN e AKT mediante IHC.

Sono stati considerati come *responder* i pazienti che avevano raggiunto una risposta parziale (PR) o completa (CR) in accordo con RECIST e quelli che avevano raggiunto una stabilizzazione della malattia di durata superiore a 6 mesi (SD6).

La sopravvivenza libera da progressione (PFS) e la sopravvivenza totale (OS) sono state definite rispettivamente come tempo tra la prima somministrazione del trattamento alla progressione della malattia o morte per ogni causa e tempo tra la prima somministrazione e morte per ogni causa.

Dei 102 pazienti arruolati (62 anni, 60 - 59% - maschi), tutti, tranne 2, hanno ricevuto una combinazione di cetuximab più irinotecan. Il cetuximab è stato somministrato alla dose iniziale di 400mg/m², seguito da infusione settimanale di 250mg/m², in 65 pazienti, mentre 35 hanno ricevuto 500mg/m² di farmaco ogni due settimane. L'irinotecan è stato somministrato in dosi variabili da 130 a 180mg/m² ogni due settimane, a discrezione del medico. 18 pazienti (18%) hanno ricevuto questi farmaci come terapia di seconda linea, mentre i rimanenti 84 (82%) dopo fallimento di almeno due schemi terapeutici.

Complessivamente hanno risposto alla terapia 19 (18,6%) pazienti, con 1 CR, 13 PR e 5 SD6. Alla media di 20,6 mesi di follow-up, la malattia è progredita in 100 (98%) pazienti e 78 (76%) sono morti; PFS e OS sono stati in media di 3,8 e 9,3 mesi rispettivamente.

Rispettivamente 49 (58%) e 35 (40%) tumori primari esprimevano PTEN e pAKT. I livelli di concordanza tra tumori primari e metastasi sono stati del 60%, 68%, 80% e 95% per PTEN, pAKT, EGFR e *KRAS* rispettivamente; lo stato di PTEN nei tumori primari e di pAKT, sia nei tumori primari e nelle metastasi, non predicono la risposta e il PFS. Per quanto riguarda le metastasi, 12 (36%) di 33 pazienti con tumore PTEN-positivo erano *responder*, contro 1 (5%) di 22 pazienti con tumore PTEN-negativo ($p=0,007$). Il PFS medio

(mPFS) dei pazienti con metastasi PTEN-positive è stato di 4,7 mesi vs 3,3 mesi per quelli con metastasi PTEN-negative (HR 0,49, $p=0,005$); non sono state osservate differenze significative in termini di OS.

KRAS era mutato in 35 (40%) di 88 tumori primari disponibili; solo 2 (6%) dei 35 *responder* appartenevano a questo gruppo rispetto a 13 (25%) dei 53 con *KRAS wild type* ($p=0,024$); nelle metastasi, i *responder* sono stati 2 su 21 pazienti con tumore mutato e 11 su 27 pazienti con tumore non mutato ($p=0,016$). I pazienti con *KRAS wild-type* hanno avuto un mPFS e un mOS più lungo che quelli con tumore *KRAS* non mutato (mPFS: 4,2 vs 3,1 mesi, HR 0,45, $p=0,003$, mOS: 13,5 vs 6,1 mesi, HR 0,45, $p=0,0004$).

Dall'analisi multivariata è emerso come i pazienti con metastasi PTEN-positive e *KRAS wild-type* hanno avuto un PFS più lungo rispetto agli altri che presentavano almeno un fattore non favorevole (5,5 vs 3,8 mesi, HR 0,42, $p=0,001$). Tra i pazienti con *KRAS wild-type*, la positività per PTEN prediceva un più lungo PFS (5,3 vs 3,7 mesi, $p=0,026$), mentre non sono state osservate differenze significative in termini di OS e di OS e PFS tra i pazienti con mutazioni di *KRAS*.

In conclusione, la perdita di PTEN nelle metastasi può predire la resistenza a cetuximab più irinotecan; la combinazione dell'analisi mutazionale di *KRAS* e di quella immunohistochemica di PTEN potrebbe aiutare a identificare un sottogruppo di pazienti con mCRC con maggiore probabilità di beneficiare della terapia con inibitori di EGFR.

Lo studio presenta alcune limitazioni, sia per la coorte retrospettiva e relativamente piccola, soprattutto per il sottogruppo di pazienti con campioni metastatici disponibili, sia per la determinazione di PTEN mediante IHC, metodo non ancora validato, scelto per i diversi meccanismi genetici ed epigenetici che possono portare alla perdita della funzionalità di PTEN.

Oltre allo stato di *KRAS* e alla positività per PTEN, altri potenziali fattori predittivi, come le mutazioni di *BRAF* o di *PIK3CA*, potrebbero aiutare nel processo di selezione dei pazienti.

E' quindi necessario pianificare *trial* di dimensioni adeguate per validare l'analisi integrata delle vie di segnale di EGFR, come utile strumento per selezione pazienti da sottoporre al trattamento con cetuximab.

Parole chiave: cetuximab, *KRAS*, PTEN

Riferimento bibliografico

[Loupakis F](#) et al. *J Clin Oncol*. 2009, 27: 2622-29.

STUDIO DI ASSOCIAZIONE TRA DISCINESIA TARDIVA E CINQUE POLIMORFISMI DEL GENE DRD4 IN PAZIENTI SCHIZOFRENICI

A cura della Dott.ssa Maria Elisa Bersia

La discinesia tardiva (TD) è un effetto collaterale che si sviluppa approssimativamente nel 25% dei pazienti schizofrenici in trattamento cronico con antipsicotici tipici; questo disturbo motorio riduce notevolmente la qualità di vita dei pazienti, compromettendo anche la continuità della terapia farmacologica.

Sebbene la classe degli antipsicotici atipici di più recente introduzione predisponga in misura minore (non nulla) alla TD, non risulta tuttavia essere indenne da altri effetti indesiderati, come per esempio l'aumento ponderale (*SIF-Farmacogenetica* n° 6 aprile 2009 e n°7 maggio 2009).

Ad oggi, l'eziologia della TD rimane poco chiara, anche se esistono alcuni fattori che ne favoriscono l'insorgenza: età avanzata, genere femminile, abuso di sostanze/alcool, fumo, componente genetica e trattamento con antipsicotici tipici.

I possibili meccanismi biologici implicati nella patofisiologia della TD sembrano derivare da anomalie a livello del sistema nigro-striatale, in cui si verifica un'ipersensibilità alla dopamina in seguito al blocco continuativo dei recettori dopaminergici, prodotto dalla somministrazione cronica degli antipsicotici.

Questa ipotesi è supportata dal fatto che il recettore D₂ è maggiormente espresso a livello dei gangli basali, zona del SNC deputata alla regolazione dei movimenti; dall'altro lato gli antipsicotici tipici possiedono un'alta affinità per il DRD2 (*dopamine D₂ receptor*), e ciò spiegherebbe la loro azione predisponente alla TD, mentre gli antipsicotici con affinità D₄ (per esempio la clozapina) potrebbero addirittura avere una funzione protettiva.

Dato che la TD sembra derivare da un'alterazione dell'attività dopaminergica e gli agenti che causano TD sono tutti potenti antagonisti dei DRD2, gli Autori si sono proposti di indagare l'associazione tra TD ed alcuni polimorfismi del gene DRD4, che codifica per il terzo membro dei recettori dopaminergici D2-simili. DRD4 appartiene alla classe di recettori accoppiati alla proteina G ed attiva un segnale intracellulare che inibisce la sintesi di cAMP.

Il gene codificante per questo recettore si trova sul cromosoma 11p15.5, consiste di 4 esoni e misura 6kb.

I cinque polimorfismi del gene DRD4 in ordine 5'-3' sono:

- Estremità 5':
 - rs3758653 alleli: T/C, ancestrale: T, freq. > allele popolaz. caucasica: T
 - rs916457 alleli: C/T, ancestrale: C, freq. > allele popolaz. caucasica: C
- Esone 3
 - VNTR-esone 3
 - rs762502 alleli: C/T, ancestrale: C, freq. > allele: T⁽¹⁾
- Estremità 3':
 - rs11246226 alleli: A/C, ancestrale: C, freq. > allele popolaz. Europea: C - *NCBI (National Centre for Biotechnology Information)* – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp&cmd=search&term>.

In questo studio sono stati analizzati i cinque polimorfismi del gene DRD4 sopracitati, al fine di verificare un'eventuale correlazione con la TD.

Poiché il gene DRD4 è situato in una regione del cromosoma contenente isole CpG, i polimorfismi sono stati analizzati separando i dati maschili da quelli femminili.

Il campione analizzato ha compreso 171 pazienti caucasici schizofrenici, provenienti da quattro istituti clinici del nord America: *Center for Addiction and Mental Health* (Toronto Ontario, n=88), *Case Western Reserve University* (Cleveland Ohio, n=42), *Hillside Hospital* (Glen Oaks New York, n=38), *University of California* (Irvine California, n=3).

Tutti i soggetti ricevevano da almeno un anno un trattamento con antipsicotici tipici. La presenza di TD è stata valutata con l'AIMS (*Abnormal Involuntary Movement Scale*) e con l'HSDS (*Hillside Simpson Dyskinesia Scale*). Per l'analisi dei polimorfismi è stato utilizzato DNA purificato proveniente da campioni ematici.

E' stata confermata una maggior frequenza di TD nel gruppo femminile e nei soggetti in età avanzata, seppur senza significatività statistica.

Nessuno dei SNPs testati singolarmente è stato associato a TD nel campione studiato, mentre un'analisi dell'aplotipo dei 4 marcatori DRD4 ha mostrato un'associazione significativa (P globale=0,056).

- TCCA

L'aplotipo TCCA (4° SNP, rs11246226 allele A) è stato sottorappresentato nei casi di TD: i portatori hanno avuto il minor valore medio AIMS, mentre analizzando separatamente i gruppi maschile e femminile, si è osservata l'assenza dell'aplotipo nel gruppo maschile con TD e la presenza in 11 uomini senza TD.

- VNTR-esone3

Nessuna differenza significativa nella distribuzione degli alleli tra gruppo TD e non-TD; poiché emerge che questo tipo di SNP non riveste un ruolo significativo come singolo marcatore, è stato escluso dall'analisi dell'aplotipo.

- Copy-number variation (CNV)

Visto che il gene DRD4 è situato in una regione con CNV, sono stati raggruppati i pazienti omozigoti per tutti i marcatori, confrontando all'interno del gruppo la frequenza di TD vs non-TD: non si è osservata alcuna differenza significativa nella frequenza degli andamenti di omozigosi tra i due gruppi.

Questi risultati hanno dimostrato una correlazione significativa tra aplotipi formati dai quattro markers DRD4 e discinesia tardiva negli uomini presi in esame, incoraggiando ulteriori approfondimenti in questa direzione.

A differenza di studi precedenti effettuati su SNP di geni recettoriali dopaminergici, gli Autori hanno limitato il loro studio ad un campione unicamente caucasico ma piuttosto ampio, integrando ai dati dei singoli SNPs, uno studio globale degli aplotipi presenti in DRD4.

Tuttavia lo studio in oggetto ha presentato delle carenze riguardanti dosaggi e durata della terapia antipsicotica, patologie concomitanti (come il Parkinson) ed assunzione di alcool/tabacco.

Poiché tutti gli antipsicotici hanno come bersaglio più di un recettore, è probabile che la discinesia tardiva non sia univocamente correlata ad un gene recettoriale, ma possa rappresentare una realtà poligenica in cui ogni gene contribuisce in minor/maggior misura all'insorgenza di questo disturbo motorio.

La discinesia tardiva (TD) è un effetto collaterale dell'esposizione cronica agli antipsicotici. In questo studio si è osservata una associazione significativa tra aplotipi di quattro polimorfismi (rs3758653, rs916457, rs762502, rs11246226) del gene DRD4 ed insorgenza di discinesia tardiva nel genere maschile.

Conflitti d'interesse: lo studio è stato finanziato dal Canadian Institute for Health (CIHR), CR Young Foundation, Bebensee Foundation, Prentiss Foundation e Ritter Foundation

Parole chiave: schizofrenia, discinesia tardiva, DRD4

Riferimento bibliografico

Zai CC et al. *Pharmacogenomics J.* 2009, 9: 168-174 .

L'INTERAZIONE TRA I POLIMORFISMI NEI GENI BCL2 ED INTERLEUCHINA 10 INFLUENZA LA RISPOSTA ALLA CHEMIOTERAPIA CON RITUXIMAB PLUS CHOP NEL LINFOMA A CELLULE B LARGHE DIFFUSE

A cura della Dott.ssa Sabrina Angelini

L'introduzione del Rituximab [RTX] nel regime chemioterapico CHOP [Ciclofosfamide, Adriamicina, Vincristina e Prednisone; R-CHOP] ha significativamente migliorato la risposta alla chemioterapia e la sopravvivenza in pazienti affetti da Linfoma a Cellule-B Larghe Diffuse [DLBCL]. Il meccanismo d'azione non è ancora stato chiarito, tuttavia la chemioresistenza mediata da bcl-2 è stata proposta come target del regime R-CHOP. Ad avvallare questa ipotesi studi recenti suggeriscono che [RTX] moduli i *pathways* molecolari e cellulari di trasduzione del segnale che regolano bcl-2. Tra questi l'interleuchina 10 (IL-10) che regola l'espressione di bcl-2 nelle cellule del sistema emopoietico, così come in quelle di linfoma. Il meccanismo proposto è che RTX interferisca con l'IL-10 causando la *down-regulation* di bcl-2, sensibilizzando le cellule di linfoma al trattamento R-CHOP. In virtù di queste considerazioni è possibile che l'interazione bcl-2/IL-10 possa contribuire alla resistenza alla chemioterapia osservata nel trattamento di DLBCL.

Considerate queste premesse Park e Collaboratori hanno voluto indagare il ruolo predittivo di polimorfismi nei geni BCL2 e IL10 sulla risposta al trattamento di DLBCL.

Nello studio sono stati arruolati 235 pazienti affetti da DLBCL trattati in prima linea con R-CHOP [$n = 125$] o con CHOP [$n = 110$]. DNA genomico è stato estratto da prelievo di sangue venoso utilizzando un kit commerciale (Bioneer). La genotipizzazione è stata eseguita mediante PCR-RFLP per l'IL-10 [T⁻⁸¹⁹C-rs1800871 e A⁻⁵⁹²C-rs1800872] e *rapid capillary* PCR e analisi delle curve di *melting* (*probes* fluorescenti - Roche Diagnostic) per BCL2 [C⁻⁹³⁸A-rs2279115 e A²¹G-rs1801018]. Tutti i risultati sono stati confermati mediante sequenziamento diretto. La risposta alla chemioterapia con o senza RTX è stata determinata mediante tomografia assiale, mentre lo *score* di risposta alla terapia è stato assegnato in accordo a criteri internazionali (*International Working Group criteria*).

Molteplici sono state le analisi effettuate. Innanzitutto non sono state osservate differenze significative nella risposta al tumore sia riguardo la risposta completa (CR) o il grado di risposta complessiva (ORR) nei due gruppi. Riguardo la sopravvivenza complessiva (OS), non vi sono differenze significative tra i due gruppi, anche se la percentuale tende ad essere migliore nel gruppo di trattamento R-CHOP rispetto al quello CHOP [CHOP: OS_{1 anno} 83.9 ± 3.7% e OS_{2 anno} 70.9 ± 4.9%; R-CHOP: OS_{1 anno} 89.4 ± 2.9% e OS_{2 anno} 74.0 ± 4.8]. Al contrario si osserva una differenza significativa nel tempo che intercorre tra l'inizio della terapia e fallimento della stessa [*Failure-Free Survival*-FFS; fallimento dovuto a progressione, recidiva o morte; $P = 0.03$] e la probabilità di progressione [PP; $P = 0.01$] [CHOP: FFS_{1 anno} 65.7 ± 4.8% e FFS_{2 anno} 54.5 ± 5.3%; PP_{1 anno} 31.3 ± 4.8% e PP_{2 anno} 41.9 ± 5.3%; R-CHOP: FFS_{1 anno} 82.4 ± 3.6% e FFS_{2 anno} 59.3 ± 5.4%; PP_{1 anno} 13.7 ± 3.3% e PP_{2 anno} 35.8 ± 5.5%], performance che risulta quindi significativamente migliore nel gruppo R-CHOP.

Per quanto riguarda la risposta alla terapia il genotipo IL10 influenza significativamente la risposta solo nel gruppo CHOP. In particolare, l'ORR è significativamente più alto nel gruppo con genotipo IL10⁻⁵⁹² AA o AC rispetto agli individui⁻⁵⁹² CC [87% vs 62%, $P = 0.04$], o IL10⁻⁸¹⁹ TT o TC rispetto agli individui⁻⁸¹⁹ CC [87% vs 62%, $P = 0.04$]. L'analisi di *Linkage Disequilibrium* (LD) ha evidenziato un forte LD tra i due polimorfismi analizzati per IL10 [⁻⁵⁹²A > C e ⁻⁸¹⁹T > C], tanto da generare due aplotipi soltanto [TA e AC; $D' = 1$]. L'analisi dell'aplotipo per IL10 nel gruppo CHOP conferma l'effetto sull'ORR osservato per i singoli genotipi per cui, pazienti con 0 o 1 copia dell'aplotipo CC [TA/TA o TA/CC] mostrano un ORR del 90%, contro il 67% dei pazienti con due copie dell'aplotipo CC [$P = 0.03$]. Nel complesso questo dato conferma l'effetto prognostico negativo dell'aplotipo IL10-CC sulla sopravvivenza dei pazienti affetti da DLBCL, dato tuttavia non confermato nel gruppo R-CHOP [$P = 0.3$]. Una ulteriore analisi di regressione logica multipla condotta sull'intera popolazione, conferma l'aplotipo IL10-CC come fattore prognostico negativo sull'ORR. Tale effetto risulta prominente nel gruppo terapeutico CHOP [OR: 6.07; CI 95%: 1.56-23.69; $P = 0.009$], mentre non raggiunge la significatività statistica nel gruppo R-CHOP.

Nel gruppo R-CHOP invece si osserva un FFS significativamente migliore in presenza del genotipo IL10⁻⁵⁹² AA/AC [$P = 0.03$] o IL10⁻⁸¹⁹ TT/TC [$P = 0.02$]. Inoltre, sempre nel gruppo R-CHOP si osserva un FFS migliore in presenza di BCL2⁺²¹ AA [$P = 0.05$] e BCL2⁻⁹³⁸ AA [$P = 0.05$].

Stratificando i due gruppi di trattamento sulla base del genotipo, nel gruppo R-CHOP individui con genotipo IL10⁻⁵⁹² CC o ⁻⁸¹⁹ CC sono caratterizzati da un significativo miglioramento dell'ORR rispetto al gruppo CHOP con lo stesso genotipo [$P = 0.05$ per entrambi].

Gli Autori hanno indagato l'interazione tra i polimorfismi di IL10 e BCL2 sulla risposta alla chemioterapia, stratificando la popolazione in due gruppi di rischio a seconda dell'aplotipo dell'IL10 e del genotipo di BCL2. In particolare, un gruppo (a) è caratterizzato da BCL2 e IL10 altamente inducibili (BCL2^{high}/IL10^{high}; BCL2⁻⁹³⁸ AA e 2 copie dell'aplotipo CC per IL10) l'altro gruppo (b) è caratterizzato da BCL2 e IL10 scarsamente inducibili (BCL2^{low}/IL10^{low}; BCL2⁻⁹³⁸ AC/CC e 0 o 1 copia dell'aplotipo CC per IL10).

Dalle analisi emerge che i pazienti BCL2^{low}/IL10^{low} del gruppo di trattamento CHOP, mostrano un FFS significativamente migliore rispetto a pazienti BCL2^{high}/IL10^{high} [$P = 0.002$], differenza che invece non si osserva nel gruppo terapeutico R-CHOP. In quest'ultimo gruppo invece la combinazione BCL2^{high}/IL10^{high} determina una significativa riduzione del rischio di progressione rispetto al gruppo di trattamento CHOP con la stessa combinazione [$P = 0.004$].

Riguardo la combinazione BCL2^{high}/IL10^{high} l'analisi sull'intera popolazione porta ad ipotizzare un effetto negativo sulla sopravvivenza. Tuttavia, stratificando la popolazione in base alla terapia la combinazione BCL2^{high}/IL10^{high} si evidenzia una performance di risposta peggiore, in termini di FFS e rischio di progressione nel gruppo terapeutico CHOP, non in quello R-CHOP. Dall'analisi multivariata emerge che nel gruppo terapeutico CHOP, la combinazione BCL2^{high}/IL10^{high} rappresenta un fattore di rischio indipendente significativo per l'FFS [$P = 0.04$] e la PP [$P = 0.016$]. Tali implicazioni di cattiva prognosi non si mantengono nel gruppo terapeutico R-CHOP

Tra tutti i risultati emerge che pazienti affetti da DLBCL con la combinazione BCL2^{high}/IL10^{high} sono caratterizzati da cattiva prognosi rispetto a quelli BCL2^{low}/IL10^{low}, che si manifesta in maniera significativa con un peggior FFS ed un più alto rischio di progressione nel gruppo terapeutico CHOP. Tale evidenza non si manifesta nel gruppo terapeutico R-CHOP, suggerendo che l'effetto prognostico negativo potrebbe essere superato con l'aggiunta di RTX alla chemioterapia.

In conclusione, quindi la chemioresistenza osservata nel trattamento di DLBCL potrebbe essere dovuta alla interazione BCL2/IL10, e potrebbe essere superata con il protocollo chemioterapico R-CHOP.

Gli Autori tuttavia suggeriscono una cauta interpretazione dei dati. Lo studio infatti presenta due importanti limitazioni, riconosciute dagli stessi Autori, che rendendo difficile attribuire un chiaro significato clinico ai risultati osservati: la scarsa ampiezza della popolazione e la durata limitata del follow-up. Queste limitazioni rendono necessaria la validazione dei risultati in gruppi di pazienti più ampi, anche di etnia diversa.

Parole chiave: Chemioterapia CHPO, Rituximab, Linfoma a cellule B larghe diffuse, BCL2, IL10.

Riferimento bibliografico

[Park YH](#) et al. *Clin Cancer Res* 2009, 15(6): 2107-15.

POLIMORFISMI NEI GENI CODIFICANTI PER IL TRASPORTATORE DEI FOLATI IN FORMA RIDOTTA E DELLA METILENTETRAIDROFOLATO REDUTTASI: ASSOCIAZIONE CON LA RISPOSTA AL TRATTAMENTO FARMACOLOGICO NELLA LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA INFANTILE

A cura della Dott.ssa Sabrina Angelini

Il Metotrexato [MTX], antagonista dell'acido folico, è il principale componente dei protocolli di chemioterapia per il trattamento della leucemia linfoblastica acuta [LLA]. La scarsa risposta al MTX può contribuire in maniera sostanziale al fallimento della terapia. Geni codificanti per enzimi coinvolti nel *pathway* dei folati svolgono un ruolo essenziale per l'*uptake* ed il metabolismo del MTX. Per questo, la presenza di polimorfismi in questi geni può essere importante nel determinare efficacia e tossicità nei pazienti trattati, affetti da ALL. In particolare, studi hanno riportato un incremento delle frequenza del genotipo MTHFR 677T in pazienti intolleranti al MTX. Recentemente, inoltre, la variante 80A, sul gene codificante per il trasportatore dei folati in forma ridotta [RFC, G80A → Arg²⁷His] è stata associata ad un miglioramento della terapia con MTX in pazienti affetti da artrite reumatoide. Riguardo quest'ultimo polimorfismo, pochi, e con risultati discordanti, sono gli studi che hanno indagato le implicazioni cliniche di questo SNP nel trattamento della LLA.

Questo ha spinto Ashton e Collaboratori ad investigare la possibile associazione tra il genotipo MTHFR C677T ed RFC G80A ed il rischio di recidiva o morte nei 5 anni successivi alla diagnosi, in una coorte di 170 bambini affetti da LLA.

DNA genomico è stato isolato mediante tecniche convenzionali da campioni diagnostici, prelevati da pazienti arruolati nello "Australian and New Zeland Children's Cancer Study Group ALL Study VI Protocol". I pazienti sono stati diagnosticati nel periodo Aprile 1992 - Dicembre 1997, sottoposti al medesimo protocollo chemioterapico e in follow-up fino a Gennaio 2002. La genotipizzazione è stata eseguita mediante real-time e confermata tramite PCR-RFLP in circa il 60% dei campioni. L'influenza del genotipo MTHFR e RFC sulla sopravvivenza liberi da eventi [*Event-Free Survival*, EFS] è stata analizzata utilizzando il *Cox proportional hazards model*. L'EFS è stato calcolato mediante il metodo Kaplan-Meier e confrontata tra i diversi sottogruppi tramite il logrank test.

L'analisi non ha evidenziato alcuna influenza del genotipo MTHFR C677T sull'EFS. Al contrario, la EFS è significativamente più bassa nei pazienti con genotipo RFC 80GG rispetto agli individui con altro genotipo [RFC GA o AA; $P = 0.024$] o con genotipo combinato [RFC GA + AA; $P = 0.007$]. Inoltre, l'analisi univariata ha evidenziato che individui eterozigoti o omozigoti per l'allele RFC 80A hanno il 50% delle probabilità in più di rimanere liberi da eventi nel corso del follow-up, rispetto ai pazienti omozigoti RFC-GG. Tale associazione si osserva anche combinando pazienti eterozigoti [RFC GA] con gli omozigoti [RFC AA; $P = 0.009$], e rimane significativa [$P = 0.017$] nell'analisi multivariata, dopo correzione per fattori prognostici quali la mediana dei globuli bianchi alla diagnosi ed il sesso.

Questo studio suggerisce un coinvolgimento del genotipo RFC G80A nella risposta alla terapia con MTX in pazienti affetti da LLA.

Tuttavia, l'associazione positiva osservata con la variante RFC 80A è in contrasto con uno studio Franco-Canadese su 205 pazienti affetti da LLA, nel quale è stata invece evidenziata una associazione negativa tra il genotipo RFC 80A e l'EFS. Gli Autori sostengono che molteplici possono essere le spiegazioni, come il protocollo terapeutico (uniforme per i pazienti in questo studio, sottoposti a tre differenti regimi chemioterapici quelli dello studio Franco-Canadese), la composizione etnica delle due popolazioni o l'effetto dovuto ad altri polimorfismi non analizzati in nessuno dei due studi. Non viene invece fatta menzione all'ampiezza della popolazione, relativamente piccola, che implica una debole potenza statistica nell'analisi. Quest'ultimo aspetto, potrebbe anche spiegare il mancato effetto del genotipo MTHFR C677T osservato invece in altri studi su pazienti affetti da LLA ed artrite reumatoide [*ndr*]. In ultimo, gli Autori sottolineano comunque la necessità di considerare un maggior numero di polimorfismi in geni codificanti per enzimi del *pathway* dei folati, in una coorte di pazienti più ampia, allo scopo di identificare una combinazione di genotipi che influenzino la risposta clinica al MTX.

Parole chiave: Metotrexato, Leucemia linfoblastica acuta, RFC, MTHFR

Riferimento bibliografico

[Ashton LJ](#) et al. *Leukemia* 2009 Apr 2. [Epub ahead of print]

**GRUPPO DI LAVORO SULLA FARMACOGENETICA
della SOCIETA' ITALIANA DI FARMACOLOGIA**

http://www.sifweb.org/gruppilavoro/sif_gruppo_farmacogen.php

Direttore	Prof. Carlo Riccardi (Presidente eletto SIF, Università di Perugia)
Coordinatori	Dott.ssa Valentina Boscaro (Università di Torino) Dott. Federico Casale (Università di Torino)
Hanno contribuito a questo numero:	Dott.ssa Sabrina Angelini (Università di Bologna) Dott.ssa Maria Elisa Bersia (ASL CN1, Ospedale di Savigliano - CN) Dott. Salvatore Terrazzino (Università del Piemonte Orientale) Dott.ssa Cristina Tonello (Università di Milano) Dott.ssa Valentina Boscaro (Università di Torino)
Supervisione	Prof. Emilio Clementi (Università di Milano) Prof. Diego Fornasari (Università di Milano) Prof. Armando Genazzani (Università del Piemonte Orientale)

Contatti: sif@unito.it

DISCLAIMER – Leggere attentamente

Gli autori e redattori del Gruppo di Lavoro sulla Farmacogenetica sono Farmacologi, Medici, Farmacisti e Biologi, e quanto riportato deriva da affidabili ed autorevoli fonti e studi scientifici, accompagnato dai relativi estratti o riferimenti bibliografici alle pubblicazioni. In ogni caso, le informazioni fornite, le eventuali nozioni su procedure mediche, posologie, descrizioni di farmaci o prodotti d'uso sono da intendersi come di natura generale ed a scopo puramente divulgativo ed illustrativo. Non possono, pertanto, sostituire in nessun modo il consiglio del medico o di altri operatori sanitari. Nulla su http://www.sifweb.org/gruppilavoro/sif_gruppo_farmacogen.php, sulle relative newsletter, e-mails, o qualsiasi dei progetti della SIF, può essere interpretato come un tentativo di offrire o rendere un'opinione medica o in altro modo coinvolta nella pratica della Medicina. La Società Italiana di Farmacologia, i suoi Soci od altre parti ed essa connesse non possono, quindi, essere ritenuti responsabili circa risultati o conseguenze di qualunque utilizzo o tentato utilizzo di una qualsiasi delle informazioni riportate. Il servizio è totalmente gratuito e non esistono conflitti di interesse o finalità di lucro. Non sono ammesse la divulgazione e la diffusione della newsletter "SIF – Farmacogenetica" senza precedente autorizzazione scritta della Società Italiana di Farmacologia.

RICEZIONE NEWSLETTER

Nella consapevolezza che le e-mail indesiderate sono oggetto di disturbo, vi informiamo che il vostro indirizzo viene conservato e trattato nel rispetto del DL 196/03 ed in qualsiasi momento potrà esserne richiesta la modifica o cancellazione come previsto dall'articolo 13. Tutti i destinatari della e-mail sono in copia nascosta (Privacy L. 75/96). Qualora non intendeste ricevere ulteriori comunicazioni vi preghiamo di inviare una risposta all'indirizzo sif.farmacologia@segr.it con oggetto: CANCELLA.

Sostieni la Società Italiana di Farmacologia

La Società Italiana di Farmacologia è tra i beneficiari dei proventi del 5 per mille dell'IRPEF 2009. È sufficiente apporre la propria firma ed indicare, sulla dichiarazione dei redditi, nel riquadro Finanziamento della ricerca scientifica e della Università, il Codice Fiscale della SIF che è 97053420150, per destinare tali fondi a Borse di studio SIF per giovani ricercatori.

Per maggiori informazioni, contattare la segreteria SIF: 02-29520311
sif.farmacologia@segr.it; sif.informazione@segr.it; sifcese@comm2000.it.