

**Newsletter Numero 45 – Novembre 2012**

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

Sommario

- Studio farmacogenetico su pazienti affetti da tumore avanzato del polmone non a piccole cellule (NSCLC) trattati con pemetrexed o pemetrexed-carboplatino in seconda linea
- Polimorfismi della chinasi 4 dei recettori accoppiati a proteine G: farmacogenetica dei beta-bloccanti ed *outcome* nella terapia dell'ipertensione
- La variante G143E della carbossilesterasi 1 è associata con un aumento dei livelli di metabolita attivo del clopidogrel e con una miglior risposta a clopidogrel
- La resistenza ai corticosteroidi nella sepsi è influenzata da una down-regolazione del recettore per i glucocorticoidi indotta dal microRNA-124
- Un polimorfismo di STAT3 può predire la risposta a terapia con interferone- α in pazienti con carcinoma renale metastatico
- Uno studio comprensivo dei polimorfismi di ABCB1, ABCC2 e ABCG2 nella risposta terapeutica e nella prognosi del trattamento chemioterapico del cancro del polmone
- Il genotipo CC per la variante rs12979860 del gene IL-28B nei donatori è associato ad un migliore *outcome* clinico nell'Epatite C dopo trapianto di fegato
- Test genetici *point-of-care* per la personalizzazione della terapia antiaggregante (*RAPID GENE*): uno studio prospettico, randomizzato, *proof-of-concept*

STUDIO FARMACOGENETICO SU PAZIENTI AFFETTI DA TUMORE AVANZATO DEL POLMONE NON A PICCOLE CELLULE (NSCLC) TRATTATI CON PEMETREXED O PEMETREXED-CARBOPLATINO IN SECONDA LINEA

A cura della Dott.ssa Marzia Del Re e della Dott.ssa Michela Santoro

La chemioterapia a base di platino rappresenta la scelta di prima linea nel trattamento del tumore avanzato del polmone non a piccole cellule (NSCLC), ma, inevitabilmente, i soggetti affetti da NSCLC vanno incontro a progressione di malattia e, a causa di un profilo di tossicità molto basso, il trattamento di seconda linea prevede l'utilizzo del pemetrexed da solo o in associazione con il carboplatino. L'attività del pemetrexed è dipendente da vari fattori, tra cui: la timidilato sintetasi (TS), principale bersaglio del farmaco, il trasportatore del folato (RFC), necessario per l'entrata nella cellula di folati e anti-folati, la γ -glutamyl idrolasi (GGH) che rimuove i residui glutamminici da substrati poli-glutamati diminuendo l'attività intracellulare del pemetrexed, e la 5,10-metilentetraidrofolato reduttasi (MTHFR) che assume un ruolo determinante nella regolazione del *pathway* dell'acido folico. Lo scopo dello studio di Tiseo *et al.* (Lung

cancer 2012) è quello di verificare la presenza di una correlazione tra polimorfismi di geni implicati nel metabolismo del pemetrexed e del carboplatino ed *outcome* in pazienti con NSCLC.

Lo studio, farmacogenetico multicentrico retrospettivo, si è svolto su 208 pazienti affetti di NSCLC, arruolati dall'Ottobre 2005 all'Ottobre 2009 in Italia e nei Paesi Bassi. Sono stati raccolti prelievi di sangue ed è stato estratto il DNA sul quale sono stati esaminati i principali polimorfismi funzionali di: TS (TSER*2 e TSER*3), RFC (80G>A ed RFC-*exon* 6-SNP C>T), GGH (452C>T), MTHFR (677C>T) e XPD (2251A>C). Il genotipo TSER è stato valutato tramite l'amplificazione della regione *enhancer* (5'UTR) e sequenziamento automatico, mentre tutti gli altri polimorfismi sono stati esaminati tramite analisi in Real Time PCR.

E' stata osservata una significativa associazione tra i pazienti portatori del genotipo MTHFR 677TT e risposta clinica, rispetto ai pazienti con genotipo 677CC o 677CT. In particolare, i pazienti MTHFR 677TT mostravano una PFS più lunga rispetto agli altri genotipi (5,4 vs 3,4 mesi); allo stesso modo, i pazienti con genotipo 677TT mostravano una OS di 16,4 mesi rispetto a pazienti portatori del genotipo 677CC o 677CT che hanno una OS di 8,5 mesi. Nessun'altra associazione significativa è stata osservata con gli altri polimorfismi esaminati.

Suddividendo i pazienti per gruppo di trattamento (pemetrexed vs pemetrexed + carboplatino) è stata osservata un'associazione significativa tra genotipo di XPD 2251A>C e PFS ed OS, in particolare i portatori del genotipo mutato 2251CC avevano PFS più corta rispetto ai portatori del genotipo XPD 2251AA e CC; questa associazione non è stata riscontrata nel gruppo dei pazienti in trattamento con il solo pemetrexed.

Il genotipo omozigote mutato per il polimorfismo MTHFR677C>T è correlato ad una maggiore PFS ed OS in pazienti affetti da NSCLC in trattamento con pemetrexed. In pazienti in trattamento con l'associazione pemetrexed e carboplatino il genotipo omozigote mutato per XPD2251A>C è correlato con una peggiore PFS ed OS.

L'associazione del genotipo MTHFR 677C>T con PFS ed OS in pazienti affetti da NSCLC in trattamento con pemetrexed era già stata riscontrata in numerosi altri studi, per questo motivo, l'aumento dell'evidenza di un ruolo di questo polimorfismo promuove l'ipotesi di valutarne il ruolo in studi futuri prospettici, poiché la validazione di questo polimorfismo potrebbe offrire un nuovo biomarcatore per l'ottimizzazione del trattamento del NSCLC.

Parole chiave: NSCLC, pemetrexed, carboplatino, polimorfismi, *outcome*

Riferimento bibliografico

[Tiseo M](#) et al. *Lung Cancer* 2012, 78(1):92-9.

POLIMORFISMI DELLA CHINASI 4 DEI RECETTORI ACCOPPIATI A PROTEINE G: FARMACOGENETICA DEI β -BLOCCANTI ED *OUTCOME* NELLA TERAPIA DELLA IPERTENSIONE

A cura della Dott.ssa Lucia Gozzo

I farmaci β -bloccanti vengono comunemente utilizzati nel trattamento dell'ipertensione, ma la loro efficacia risulta essere molto variabile, con fallimento terapeutico nel 30-60% dei casi. Le differenze a livello dei geni del recettore β adrenergico e delle proteine regolatorie associate, come i membri della famiglia delle chinasi del recettore accoppiato a proteine G (GRK), potrebbero spiegare in parte questa variabilità. Le GRK sono serina/treonina chinasi che fosforilano i recettori accoppiati a proteine G (GPGR) attivati, con conseguente desensitizzazione, deattivazione ed endocitosi. I membri della famiglia delle GRK sembrano essere coinvolti nella regolazione della pressione arteriosa (PA) e nella patogenesi dell'ipertensione e di altre patologie cardiovascolari (CV), come scompenso cardiaco ed ipertrofia miocardica. In particolare la GRK4, altamente espressa nel rene, nei testicoli, nei muscoli scheletrici e modestamente espressa nel cuore, sembrerebbe giocare un ruolo importante nel controllo della PA attraverso la fosforilazione di alcuni GPCR, come il recettore della dopamina e potenzialmente il recettore β_1 , target chiave dei farmaci β -bloccanti.

È stato ipotizzato che tre SNP non-sinonimi del gene *GRK4* (R65L -rs2960306-, A142V -rs1024323- e A486V -rs1801058-) abbiano importanti effetti fisiologici e potenziali effetti farmacogenomici: sembrano essere polimorfismi con aumento di funzione, con conseguente incremento della capacità della GRK4 di legare, fosforilare e desensitizzare i GPCR. Fino ad ora solamente uno studio ha valutato gli effetti degli SNP del *GRK4* sulla risposta al metoprololo, come parte dell'*African American Study of Kidney Disease (AASK) trial*, nel quale i pazienti con entrambi gli alleli 65L e 142A necessitavano di un tempo maggiore per ottenere il controllo pressorio, rispetto ai pazienti senza questa combinazione genotipica. Inoltre, anche l'SNP R389G (rs1801253) del gene che codifica il recettore β_1 (*ADRB1*) sembra influenzare la risposta ai β -bloccanti, come dimostrato in diversi studi in cui i pazienti omozigoti 389R mostravano una maggiore risposta rispetto ai portatori del 389G.

In questo studio è stata valutata l'ipotesi che polimorfismi specifici del gene *GRK4* influenzino la risposta pressoria all'atenololo e che siano correlati al rischio di eventi CV in pazienti trattati con β -bloccanti rispetto ai trattati con calcio-antagonisti (*calcium channel blocker*, CCB). Inoltre è stata esaminata la possibile interazione tra GRK4 e ADRB1.

All'interno dello studio *Pharmacogenomic Evaluation of Antihypertensive Response (PEAR)* sono stati reclutati, presso l'*University of Florida* (Gainesville, FL), l'*Emory University* (Atlanta, GA) e la *Mayo Clinic* (Rochester, MN), pazienti con ipertensione lieve-moderata (PA diastolica >85 mmHg con misurazione a casa e >90 mmHg in ambulatorio) di età compresa tra 17 e 65 anni. Dopo l'arruolamento sono state sospese tutte le terapie anti-ipertensive per un periodo di 4-6 settimane, al termine del quale i partecipanti, se confermata la presenza dell'ipertensione, sono stati randomizzati a ricevere una monoterapia a base di 50 mg/die di atenololo o 12 mg/die di idroclorotiazide (dosaggi aumentati rispettivamente a 100 mg/die e 25 mg/die se a tre settimane dall'inizio della terapia i valori pressori rimanevano al di sopra di 120/70 mmHg). Dopo 9 settimane di terapia, in caso di mancato controllo pressorio, è stato aggiunto un secondo farmaco ed i pazienti sono stati seguiti per altre 9 settimane.

All'interno dello studio *INternational VErapamil SR/Trandolapril STudy (INVEST)* sono stati reclutati pazienti con età superiore ai 50 anni con patologia coronarica documentata ed ipertensione. I campioni per l'analisi genetica sono stati ottenuti dai partecipanti arruolati in 184 siti negli Stati Uniti e a Porto Rico come parte del sottostudio INVEST-GENES. I pazienti sono stati randomizzati a ricevere CCB (verapamil) o β -bloccanti (atenololo), insieme a idroclorotiazide, trandolapril o entrambi per il controllo della PA e la protezione dal danno d'organo. Le valutazioni cliniche sono state condotte al basale ed alle settimane 6, 12, 18 e 24, poi ogni 6 mesi per 2 anni dalla data dell'ultimo arruolamento. Il follow-up medio per l'*outcome* primario (morte per qualsiasi causa, infarto miocardico non fatale -IM- e stroke non fatale) è stato di 2.8 ± 0.7 anni. I campioni per l'analisi genetica sono stati ottenuti da 292 casi (pazienti con *outcome* primario durante il follow-up), correlati in rapporto di 1 a 4 per età, sesso ed etnia con 1168 controlli (partecipanti senza *outcome* primario durante il follow-up).

Sono stati reclutati nello studio PEAR 768 pazienti (405 F e 363 M; 57.2% bianchi, 38.3% neri), con età media di 48.8 anni, di cui 387 randomizzati a ricevere atenololo e 381 idroclorotiazide, egualmente distribuiti per razza (anche se il braccio con atenololo conteneva più donne). Nello studio INVEST sono stati reclutati 292 casi (143 F e 149 M; 60.9% bianchi, 24.7% ispanici, 14% neri) e 1168 controlli (602 F e 566 M), con età media rispettivamente di 71.4 e 70.3 anni, senza differenze per età, razza e sesso tra i due gruppi. I casi avevano un più basso *Body Mass Index* ed una percentuale più alta di precedenti episodi di IM, scompenso cardiaco congestizio, patologia vascolare periferica, attacco ischemico transitorio, diabete mellito ed disfunzione renale.

L'analisi dei risultati dello studio PEAR ha mostrato un'associazione tra le varianti alleliche dei tre SNP ed una minore riduzione pressoria con atenololo (eccetto per i portatori del 486V tra i neri, probabilmente perché meno frequente in questa popolazione). Sono stati poi valutati gli aplotipi, e la presenza di un maggior numero di copie dell'aplotipo 65L-142V è stata associata con un minore abbassamento pressorio, statisticamente significativo. In contrasto, un maggior numero di copie dell'aplotipo 65R-142A è stato associato con aumento della risposta pressoria all'atenololo. L'associazione tra le varianti 65L e 142V del *GRK4* con una ridotta risposta farmacologica è stata osservata solo nei bianchi omozigoti per il 389R dell'*ADRB1*, mentre nei neri una minore risposta pressoria con l'aumento delle copie 65L e 142V del *GRK4* è stata riscontrata sia negli omozigoti 389R sia nei portatori dell'allele 389G.

Nello studio INVEST tutte e tre le varianti del *GRK4* sono state associate con aumento del rischio per l'*outcome* primario in bianchi ed ispanici omozigoti per l'allele 65L ($P=0.0192$), 142V ($P=0.0426$), e 486V ($P=0.0002$). Quando stratificato per gruppo di trattamento, il rischio per l'*outcome* primario in presenza delle varianti 65L o 142V è apparso simile per bianchi ed ispanici sia nei pazienti trattati con verapamil sia in quelli trattati con atenololo. In accordo con i dati sulla risposta pressoria, è stata riscontrata un'associazione tra l'allele 389R e l'*outcome* CV. La presenza della variante 142V del *GRK4* è stata associata con aumento del rischio per l'*outcome* primario negli omozigoti per 389R dell'*ADRB1* ($P=0.0033$) ma non nei portatori del 389G ($P=0.9628$). Anche l'aplotipo 65L-142V del *GRK4* è risultato significativo per aumento del rischio negli omozigoti per 389R dell'*ADRB1* ($P=0.0283$) ma non nei portatori del 389G ($P=0.5731$). La variante 486V del *GRK4*, invece, è stata associata con il rischio in presenza di entrambi i genotipi *ADRB1*. L'interazione tra i geni *GRK4* e *ADRB1*, tuttavia, non è risultata significativa in entrambi gli studi.

I risultati di questo studio suggeriscono che le varianti alleliche 65L and 142V e l'aplotipo 65L-142V sono associati ad una ridotta risposta alla terapia con β -bloccanti e ad un rischio maggiore di eventi CV a lungo termine. Nell'analisi combinata, corretta per confronti multipli, le associazioni delle varianti 142V e 486V sono risultate significative, mentre la variante 65L tendeva verso la significatività. La spiegazione dell'associazione tra polimorfismi del *GRK4* ed una ridotta risposta ai β -bloccanti potrebbe risiedere nel fatto che il target di questi farmaci è rappresentato dal recettore β_1 , GPCR che, in presenza delle varianti del *GRK4* con aumento di funzione, potrebbe venire desensitizzato in maniera maggiore, dando origine ad un genotipo meno responsivo ai β -bloccanti. In particolare, le varianti 65L e 142V hanno mostrato maggiore influenza sulla risposta pressoria all'atenololo, mentre il 486V è stato coinvolto più nell'*outcome* CV: questo potrebbe essere spiegato dalla localizzazione di questi SNP in diversi domini funzionali del *GRK4*, essendo i primi due localizzati a livello del dominio di interazione con il GPCR ed il secondo a livello della regione di legame alla membrana. Inoltre, potrebbe esistere un'interazione gene-gene, per cui lo stato dell'R389G dell'*ADRB1* sembrerebbe influenzare l'effetto dei polimorfismi del *GRK4* sulla risposta pressoria ed il rischio di eventi CV. Il fatto che l'associazione con la risposta pressoria e l'*outcome* CV sia risultata generalmente più forte nel gruppo con omozigosi 389R con recettore β_1 più attivo, supporta l'ipotesi che la chinasi GRK4 fosforili il recettore β_1 . Tuttavia, la mancanza di significatività statistica in termini di interazione rappresenta un limite dello studio.

In conclusione, questo studio contribuisce a dimostrare l'importanza delle differenze genetiche individuali nella risposta ai β -bloccanti. I 3 polimorfismi del *GRK4* studiati sono stati associati ad una minore risposta pressoria e ad un aumento del rischio di eventi CV in bianchi ed ispanici. Sono necessari ulteriori studi per comprendere meglio il ruolo del *GRK4* nella regolazione della risposta all'atenololo.

Conflitto di interesse: Alcuni autori hanno ricevuto fondi da ditte farmaceutiche.

Parole chiave: β -bloccanti, ipertensione, *GRK4*, *ADRB1*

Riferimento bibliografico

[Vandelli AG](#) et al. *Hypertension* 2012, 60:957-64.

LA VARIANTE G143E DELLA CARBOSSILESTERASI 1 È ASSOCIATA CON UN AUMENTO DEI LIVELLI DI METABOLITA ATTIVO DEL CLOPIDOGREL E CON UNA MIGLIOR RISPOSTA A CLOPIDOGREL

A cura della Dott.ssa Eleonora Turrini

L'impiego del doppio regime antiaggregante di clopidogrel ed aspirina rappresenta la terapia standard per pazienti con disturbi coronarici (*coronary heart disease*, CHD) sottoposti a interventi coronarici percutanei (*percutaneous coronary intervention*, PCI) ed in pazienti con sindromi coronariche acute. Il clopidogrel è un pro farmaco che richiede l'attivazione metabolica in due *step* da parte del CYP450. Il metabolita attivo che ne risulta inibisce l'attivazione piastrinica ADP-indotta e l'aggregazione attraverso il legame irreversibile

con il recettore P2Y₁₂ sulle piastrine. È noto in letteratura come polimorfismi genetici del CYP450, come il CYP2C19*2, influenzino la formazione del metabolita attivo del farmaco. Altri fattori genetici sembrano influenzare l'attività del clopidogrel e tra questi gli autori del presente lavoro propongono polimorfismi nella carbossilesterasi 1 (CES1), responsabile in questo contesto del metabolismo sia del clopidogrel, che di un intermedio, 2-oxo-clopidogrel, che del derivato attivo nei rispettivi derivati biologicamente inattivi. Dato che solo il 15% del pro farmaco è trasformato in metabolita attivo del clopidogrel, variazioni genetiche che interessano il CES1 potrebbero avere un ruolo determinante nella risposta a clopidogrel. La variante genetica presa in esame è G143E (rs71647871), che *in vitro* per altri farmaci ha già dato evidenze di inibire significativamente l'attività catalitica di CES1. Gli autori ipotizzano che individui portatori dell'allele 143E, quindi correlati ad una minor attività di CES1, abbiano livelli plasmatici di metabolita attivo maggiori se confrontati con gli individui omozigoti per l'allele 143G.

Scopo del presente lavoro è stato pertanto quello di indagare gli effetti della variante CES1 G143E sulla formazione del metabolita attivo e sull'aggregazione piastrinica ADP-indotta prima e dopo trattamento con clopidogrel.

La popolazione in studio è costituita da 566 soggetti appartenenti allo studio Amish PAPI (*Pharmacogenomics of Anti-Platelet Intervention*) (Schuldiner et al. *JAMA* 2009, 302: 849–857; Lewis et al. *Clin Pharmacol Ther* 2011, 90:568–574). Brevemente, i partecipanti allo studio hanno interrotto l'uso di qualsiasi prescrizione medica, supplementi o vitamine una settimana prima dell'inizio dello studio. I soggetti venivano classificati come affetti da: iperlipidemia per valori di colesterolo superiori a 160 mg/dl o quelli a cui era prescritta una terapia ipolipemizzante; ipertensione per pressione sistolica \geq di 140 mmHg e/o pressione diastolica \geq 90 mmHg o con prescrizione di terapia anti-ipertensiva. La presenza di diabete o lo stato di fumatori veniva autocertificato. L'aggregazione piastrinica al *baseline* è stata definita da un valore di 200 000 piastrine/ μ l, misurata attraverso aggregometria ottica dopo stimolazione con ADP (20 μ mol/l) ed è stata espressa come la percentuale massima di cambiamento di trasmittanza rispetto a un plasma povero di piastrine usato come riferimento. A tutti i pazienti è stata somministrata per via orale una dose di carico di clopidogrel di 300 mg e, a seguire, 75 mg/die per i 6 giorni successivi. Il prelievo del sangue è stato effettuato 1 h dopo l'assunzione dell'ultima dose di clopidogrel. Un secondo *follow-up* di misurazione dell'aggregazione piastrinica è stato fatto lo stesso giorno ma dopo 1 h dalla somministrazione di 324 mg di aspirina. Uno studio indipendente è stato condotto su una popolazione di 350 soggetti affetti da CHD di età superiore ai 18 anni in fase di intervento coronarico, reclutati presso l'Ospedale Sinai, Baltimora. Le caratteristiche della popolazione sono state precedentemente descritte (Schuldiner et al. *JAMA* 2009, 302: 849–857; Lewis et al. *Clin Pharmacol Ther* 2011, 90:568–574). Tutti i protocolli sperimentali sono stati approvati dai rispettivi Comitati Etici dell'Università del Maryland e dell'Ospedale Sinai di Baltimora. Il consenso informato è stato firmato da ciascun paziente, i quali hanno ricevuto un compenso per la partecipazione allo studio.

I partecipanti dell'Amish PAPI erano generalmente in buona salute, età media 45.5 anni, cui è stato somministrato il farmaco per la prima volta e con bassa prevalenza di patologie (diabete <1%, ipertensione 5%, ipercolesterolemia 25.6%), con BMI medio 27.0 e fumatori nel 9.8% dei casi. Sono stati individuati 7 soggetti eterozigoti per l'allele CES1 143E, risultando in una frequenza allelica dello 0.6%, leggermente inferiore a studi precedentemente riportati. La concentrazione del metabolita attivo del clopidogrel differiva significativamente tra i 7 soggetti portatori dell'allele 143E e i 499 soggetti omozigoti per l'allele 143G, infatti i soggetti eterozigoti avevano una concentrazione plasmatica del metabolita attivo maggiore se confrontato con gli omozigoti (30.3 \pm 6.1 vs 19.0 \pm 0.4 ng/ml, rispettivamente. $P = 0.001$). Non è stata rilevata nessuna differenza significativa nella concentrazione di clopidogrel. Prima della somministrazione di clopidogrel, non è stata osservata nessuna evidenza di una associazione tra l'allele 143E e l'aggregazione piastrinica ADP-indotta ($P = 0.27$). Invece, dopo trattamento con clopidogrel si è osservata una riduzione di aggregazione piastrinica ADP-indotta del 29% rispetto alla *baseline* in risposta al clopidogrel in soggetti portatori della variante 143E per CES1, rispetto a quella del 43% in individui omozigoti per 143G ($P = 0.003$).

Tali risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti nei 350 pazienti dell'Ospedale di Sinai, Baltimora. In questa coorte 6 pazienti erano portatori dell'allele 143E per CES1 (frequenza allelica = 0.85%) e per 5 di questi l'aggregazione piastrinica ADP-indotta è stata misurata prima e durante il trattamento con clopidogrel e non è stata rilevata nessuna differenza significativa tra i differenti genotipi nell'aggregazione piastrinica

ADP-indotta prima del trattamento con clopidogrel. In accordo con l'osservazione dello studio PAPI, pazienti portatori dell'allele 143E presentavano una risposta a clopidogrel migliore rispetto ai pazienti omozigoti per l'allele 143G (aggregazione piastrinica massima 25 vs 45%, rispettivamente. $P = 0.03$). Dopo 1 anno di *follow-up*, è stato osservato come il 13.7% dei pazienti omozigoti per l'allele 143G di CES1 e lo 0% dei pazienti portatori dell'allele 143E siano stati colpiti da eventi cardiovascolari, senza raggiungere comunque una significatività statistica.

In conclusione, la variante allelica 143E del gene CES1, critico per l'inattivazione del clopidogrel, influenza significativamente sia la formazione del metabolita attivo del clopidogrel ($P = 0.001$) che l'aggregazione piastrinica ADP-indotta in soggetti sani trattati con clopidogrel, aumentandone la risposta ($P = 0.003$). Tale associazione è stata confermata in una coorte indipendente di pazienti affetti da CHD sottoposti a PCI ($P = 0.03$).

Ulteriori studi sono richiesti per approfondire il ruolo della variante allelica di CES1 sull'*outcome* clinico e ciò fornirà informazioni utili per migliorare la prescrizione della terapia antiaggregante.

Parolo chiave: CES1, clopidogrel, interventi coronarici percutanei, farmacogenetica

Riferimento bibliografico

[Lewis JP](#) et al. *Pharmacogenet Genomics* 2012 Oct 29. [Epub ahead of print].

LA RESISTENZA AI CORTICOSTEROIDI NELLA SEPSI È INFLUENZATA DA UNA DOWN-REGOLAZIONE DEL RECETTORE PER I GLUCOCORTICOIDI INDOTTA DAL MICRORNA-124

A cura della Dott.ssa Sara De Iudicibus e del Dott. Gabriele Stocco

Forme di resistenza acquisita ai glucocorticoidi (GC) complicano spesso la terapia della sepsi, portando ad un'esagerata risposta proinfiammatoria. L'infiammazione sistemica severa e prolungata infatti può determinare sia un'insufficiente secrezione di ormoni steroidei da parte delle ghiandole surrenali, sia una resistenza ai glucocorticoidi delle cellule tissutali: questa condizione è definita *critical illness-related corticosteroid insufficiency* (CIRCI). I meccanismi molecolari per cui i tessuti acquisiscono resistenza ai corticosteroidi nella CIRCI non sono stati ancora del tutto compresi. Gli effetti immunomodulatori dei GC sono mediati dal recettore per i glucocorticoidi (GR), appartenente alla super-famiglia dei recettori nucleari e fattori di trascrizione ligando dipendente, in particolare dall'isoforma alfa del recettore. Il gene umano per il GR è localizzato sul cromosoma 5q31.3 e comprende 9 esoni. Lo *splicing* alternativo dell'esone 9 (corrispondente alla regione 3'-UTR del gene) genera due isoforme del recettore: GR-alfa e GR-beta. GR-beta è l'isoforma inattiva: infatti, non è in grado di legare i GC, risiede in maniera costitutiva nel nucleo e non attiva la trascrizione dei geni inducibili dai GC; inoltre GR-beta ha un'emivita più lunga di GR-alfa. È stato osservato che elevati livelli di GR-beta e un alterato rapporto di espressione tra le due isoforme GR-alfa: GR-beta possono contribuire alla resistenza ai GC in malattie infiammatorie.

In questo lavoro, gli autori hanno l'obiettivo di studiare l'influenza delle isoforme del GR sugli effetti dei GC in colture primarie di linfociti T, che giocano un ruolo importante nella patogenesi della CIRCI. Inoltre, è stata indagata l'ipotesi di un controllo mediato da specifici micro-RNA (miRNA) sull'espressione di GR-alfa.

A questo scopo, sono stati arruolati 24 pazienti con diagnosi di sepsi acuta o shock settico (classificati secondo i criteri dell'*American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine*). Tutti i campioni di sangue sono stati prelevati prima del trattamento antibiotico e/o steroideo. I criteri di esclusione applicati sono stati: trattamento con corticosteroidi in corso o passato e la presenza di una patologia tumorale. Inoltre, sono stati arruolati 15 volontari sani i cui campioni sono stati processati allo stesso modo dei campioni ottenuti dai pazienti.

In linfociti T ottenuti dai volontari sani (cellule non stimulate o stimulate con CD3/CD28, trattate o meno con idrocortisone) è stata quantificata l'espressione genica delle isoforme di GR, mediante real-time PCR. Inoltre, sono stati determinati gli effetti del silenziamento genico di GR-beta attraverso siRNA su queste

stesse cellule. Successivamente, il silenziamento di GR-alfa mediato da microRNA è stato valutato mediante clonaggio della porzione 3'-UTR di GR-alfa (1-776 bp del 3' -UTR di GR-alfa, corrispondente a parte dell'esone 9) ed espressione eterologa della stessa in un vettore di fusione (psiCHECK) che utilizza la proteina reporter *Renilla* luciferasi. Gli miRNA specifici su base computazionale per la sequenza del GR-alfa sono stati identificati secondo l'approccio di Hinske et al., *BMC Genomics* 2010, portando all'identificazione di miR-124 come potenzialmente rilevante. Gli effetti del miR-124 sull'espressione di GR-alfa sono stati analizzati nelle cellule Jurkat T e nei linfociti T estratti da volontari sani (real-time PCR e Western blotting). Infine, l'espressione di GR-alfa, GR-beta, e del miR-124 è stata testata nei linfociti T di pazienti con sepsi.

Gli autori hanno prima di tutto confermato che nei linfociti T non stimolati dei volontari sani, la concentrazione di GR-alfa è molto superiore a quella di GR-beta: il rapporto di espressione GR-alfa:GR-beta è risultato pari infatti a circa 3500:1. Stimolando queste cellule per 24 ore è stata inoltre osservata un'up-regolazione di GR-alfa, controllata dal trattamento con idrocortisone; i livelli di espressione di GR-beta non hanno subito modifiche in seguito a stimolazione e non hanno mostrato cambiamenti indotti dagli steroidi. Silenziando l'espressione dell'isoforma GR-beta in linee primarie di linfociti T trattate con idrocortisone per 24 ore, si è notata una diminuzione dei livelli di IL-2, nota citochina down-regolata dai GC. Questi dati suggeriscono che GR-beta, sebbene sia poco espresso, è in realtà determinante per gli effetti dell'idrocortisone nei linfociti T umani.

Per analizzare direttamente il ruolo di miR-124 sull'espressione di GR-alfa, è stato clonato il cDNA di parte di GR-alfa, contenente il frammento con potenziale sito di legame di miR-124, fuso alla sequenza di una proteina reporter: esprimendo questo vettore in cellule HEK293, l'espressione eterologa di miR-124 ha indotto una rimozione significativa dell'attività *Renilla* luciferasi, indicando che il 3'-UTR del GR-alfa è bersaglio di miR-124.

In colture primarie di linfociti T stimolati con CD3/CD28 è stata osservata una down regolazione significativa dell'espressione di GR-alfa dopo espressione eterologa di miR-124: analizzando inoltre l'espressione endogena di miR-124 in linfociti T stimolati e trattati con idrocortisone è stato osservato che la presenza del glucocorticoide upregola significativamente miR-124.

Per verificare se questi risultati possono essere traslati ad un contesto clinico, l'espressione di GR-alfa, GR-beta e miR-124 è stata analizzata in linfociti T dei pazienti con sepsi: le cellule T dei pazienti con sepsi mostrano una lieve down regolazione di GR-alfa ed una lieve up-regolazione di miR-124, mentre l'espressione di GR-beta è risultata aumentata di due volte.

In conclusione, questo studio ha dimostrato che il trattamento con GC induce l'up-regolazione dell'espressione di miR-124, che è in grado di down-regolare in maniera specifica GR-alfa, limitando in tal modo gli effetti anti-infiammatori dei GC. Inoltre, nei pazienti con elevata espressione di GR-beta potrebbe esserci un rischio maggiore di resistenza al trattamento con GC.

Questi risultati suggeriscono che il rapporto delle isoforme GR-alfa/GR-beta e l'espressione di miR-124 giocano un ruolo importante nella sensibilità ai GC nei linfociti T di pazienti con sepsi e potrebbero contribuire a chiarire il meccanismo di resistenza al trattamento steroideo.

Parole chiave: insufficienza steroidea legata ad una malattia critica (CIRCI), resistenza ai glucocorticoidi, regolazione dei microRNA, miR-124.

Riferimento bibliografico

[Ledderose C](#) et al. *Crit Care Med* 2012, 40 (10), 2745–53.

UN POLIMORFISMO DI STAT3 PUÒ PREDIRE LA RISPOSTA A TERAPIA CON INTERFERONE-A IN PAZIENTI CON CARCINOMA RENALE METASTATICO

A cura della Dott.ssa Gloria Ravegnini

Il carcinoma renale (RCC) è uno dei tipi di cancro più comuni nell'adulto, con un'incidenza negli USA di 58240 nuovi casi nel 2011. Nonostante i recenti progressi nel comprendere i meccanismi biologici e lo

sviluppo di farmaci basati su target molecolari, molti urologi continuano a somministrare interferone- α a pazienti con RCC metastatico (mRCC).

Considerando il basso tasso di risposta e i sostanziali effetti collaterali, l'identificazione di markers predittivi per la risposta a IFN- α è essenziale per stabilire strategie di trattamento ottimali per questi pazienti.

Allo scopo di identificare un marker genetico che potesse predire la risposta ad esso, precedentemente era stato condotto uno studio di associazione retrospettivo di 463 SNPs su 33 geni candidati e trovato che polimorfismi di STAT3 erano significativamente associati ad una risposta migliore (Ito N et al., *J Clin Oncol* 2007, 25(19):2785-91). Le proteine STATs sono fattori trascrizionali ligando-inducibili, attivati in risposta a fattori di crescita o citochine come IFN- α . STAT3 in particolare risulta over-espresso in molti tumori e quindi riconosciuto come oncogene.

Lo scopo di questo studio è stato quello di confermare la correlazione tra la risposta clinica a terapia con interferone- α e SNPs del gene STAT3 riportata nello studio precedente; sono stati coinvolti un totale di 211 pazienti affetti da mRCC, ma solo 180 sono stati giudicati eleggibili per l'analisi della correlazione tra SNPs e risposta clinica ad interferone. L'*endpoint* primario è stato quello di confermare l'associazione tra il marker genetico di STAT3 (rs1905341) e la risposta a terapia con IFN; l'*endpoint* secondario è stato invece quello di investigare la correlazione tra altri 10 SNPs in 8 geni, selezionati sulla base dello studio precedente (STAT3-2 rs1905341, STAT3-0 rs2293152, SCOS3-1 rs2280148, IL4R-34 rs1805011, PTGS1-3 rs1213264, PTGS1-4 rs1213265, PTGS1-5 rs1213266, PTGS2-12 rs2745557, IRF2-67 rs2797507, ICSBP-38 rs2292982, TAP2-5 rs2071466). I pazienti sono stati seguiti per 2 anni allo scopo di definire la data di morte o l'*overall survival* (OS).

Il periodo minimo stabilito per analizzare la correlazione tra SNPs e terapia è stato di 12 settimane; 24 settimane è stato invece il periodo di tempo considerato come criterio per suddividere i pazienti non in progressione, (*stable disease*, SD, o *no change* NC) SD/NC, in long e short-time SD/NC.

Durante questo periodo, i pazienti che dopo il periodo minimo di 12 settimane andavano in progressione (PD, *progression disease*) prima della ventiquattresima settimana, erano inclusi nel gruppo *short-term*; i pazienti che invece rimanevano nello stato SD/NC anche dopo 24 settimane erano inclusi nel gruppo *long-term*.

La risposta tumorale nei pazienti è stata valutata mediante tomografia computerizzata ogni 12 settimane e classificata come completa (CR), parziale (PR), SD/NC, in progressione (PD) a seconda della percentuale di riduzione della massa tumorale in risposta a tre dosi settimanali di IFN- α .

Sono state condotte due diverse valutazioni, A e B, usando diverse definizioni di risposta clinica ad IFN: nella valutazione A, pazienti con risposta CR + PR sono stati considerati responsivi; nella valutazione B, il gruppo dei responsivi comprendeva CR + PR + SD/NC *long-term*. OS e PFS sono state calcolate rispettivamente dall'inizio della terapia fino alla morte o all'ultimo follow up e alla progressione.

Il tasso di risposta complessivo alla terapia è stato del 13.8%, con un tasso di CR del 4.4%. PFS in pazienti affetti da mRCC trattati con IFN era significativamente stratificata secondo il tipo di risposta (CR + PR vs SD/NC vs PD: $p < 0.0001$). La PFS media dei pazienti con risposta clinica (CR + PR) è stata di 561 giorni, mentre quella dei pazienti senza risposta (SD/NC + PD) di 112 giorni (CR + PR vs SD/NC + PD: $p < 0.0001$). L'analisi di Kaplan-Meier ha dimostrato una differenza statisticamente significativa tra i quattro gruppi di pazienti (CR + PR + *long-term* SD/NC vs *short-term* SD/NC vs PD: $p < 0.0001$). Inoltre la PFS media per i pazienti con risposta clinica (CR + PR + *long-term* SD/NC) è stata di 492 giorni mentre per quei pazienti senza benefici clinici (*short-term* SD/NC) è stata di 90.5 giorni (CR + PR + *long-term* SD/NC vs *short-term* SD/NC + PD: $p < 0.0001$). Nel tipo di valutazione A, i pazienti SD/NC sono stati considerati come non responsivi; la risposta di 28 pazienti (9CR e 19 PR) è stata giudicata come effettiva mentre quella di 152 (73 SD/NC, 79 PD) come non effettiva (CR + PR vs SD/NC + PD). Al contrario nella valutazione B i pazienti SD/NC > di 24 settimane sono stati anch'essi considerati effettivi; sulla base di questi criteri un totale di 163 soggetti sono stati inclusi (9 CR, 19 PR, 35 *long-term* SD/NC) e giudicati con risposta effettiva mentre 100 (21 *short-term* SD/NC, 79 PD) con risposta non effettiva (CR + PR + *long-term* SD/NC vs *short-term* SD/NC + PD).

Nella valutazione A, nessuna correlazione significativa è stata osservata tra risposta clinica ad IFN e lo SNP rs1905341, tuttavia un'associazione si è osservata nella valutazione B; i portatori dell'allele C in omozigosi mostravano infatti un'associazione significativa con l'*outcome* clinico (risposta non effettiva vs effettiva; $\chi^2 = 4.26$; $p = 0.039$; OR: 1.64; 95% CI, 1025-2622).

Successivamente è stata esaminata la correlazione tra risposta e i 10 SNPs scelti, ma nessuna associazione è stata comunque riscontrata.

Per quanto riguarda la correlazione tra OS e SNPs, il polimorfismo rs1905341 è risultato ancora significativamente associato con OS; il genotipo CC in particolare era significativamente associato con una prolungata OS se comparata con i genotipi CT e TT. Nessuna correlazione è stata riscontrata tra OS e gli altri 10 polimorfismi.

In conclusione, lo studio ha dimostrato in maniera prospettica che lo SNP di STAT3 rs1905341 è un buon candidato ad essere un marker genetico potenzialmente utile nella predizione della risposta di pazienti affetti da carcinoma renale metastatico, suggerendo un possibile ruolo di STAT3 nell'influenzare la sensibilità delle cellule tumorali all' IFN- α .

Parole chiave: carcinoma renale metastatico, terapia con IFN- α , STAT3

Riferimento bibliografico

[Eto M](#) et al. *Eur Urol* 2012 Sep 28 [Epub ahead of print]

UNO STUDIO COMPRENSIVO DEI POLIMORFISMI DI ABCB1, ABCC2 E ABCG2 NELLA RISPOSTA TERAPEUTICA E NELLA PROGNOSI DEL TRATTAMENTO CHEMIOTERAPICO DEL CANCRO DEL POLMONE

A cura del Dott. Vittorio Simeon

Nonostante i grandi miglioramenti nel trattamento del cancro del polmone la prognosi generale di questi pazienti rimane negativa, infatti il tasso di sopravvivenza a 5 anni è del 5%/10%. I pazienti con carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) con tumore localizzato sono generalmente trattati chirurgicamente, mentre i pazienti con tumore non localizzato sono trattati con radio-chemioterapia. Il carcinoma polmonare a piccole cellule (SCLC) è solitamente trattato con chemioterapia ed eventualmente con radioterapia. Anche se i pazienti sono comparabili per referto istologico, stadio tumorale ed età, esiste una grande variabilità nella risposta alla chemioterapia, dovuta molto probabilmente al background genetico dei pazienti. I polimorfismi nei geni coinvolti nel metabolismo e nel trasporto dei farmaci chemioterapici, inclusi i trasportatori ABC, sono implicati nella risposta alla terapia. L'espressione dell'ATP-binding cassette (ABC), trasportatore multifarmaco, è implicata nella resistenza delle cellule tumorali al trattamento farmacologico, con una clearance del farmaco alterata ed un'elevata tossicità. Alcuni membri di questa famiglia, come ABCB1 (o *multidrug resistance*, MDR1), ABCG2 (o proteina di resistenza nel cancro della mammella, BCRP) o ABCC2 (o proteina 2 associata alla *multidrug resistance*, MRP2) sono stati ampiamente studiate nella resistenza ai farmaci. Nel cancro polmonare, l'espressione di ABCB1 è inizialmente bassa ma può cambiare dopo esposizione al chemioterapico. ABCB1 è in grado di conferire resistenza a farmaci citotossici come etoposide e cisplatino. ABCG2 è in grado di trasportare numerosi composti, inclusi i farmaci come doxorubicina, daunorubicina, etoposide o metotressato. L'espressione tumorale di ABCG2 può essere rilevante per la risposta farmacologica nei pazienti con NSCLC in stadio avanzato trattati con terapia a base di platino. ABCC2 è espresso ad alti livelli nel cancro del polmone suggerendo un rapido sviluppo della resistenza agli agenti antitumorali. Inoltre, ABCC2 è in grado di estrarre un numero di farmaci più ampio rispetto ad ABCB1, incluso il cisplatino, il farmaco maggiormente utilizzato nel trattamento dei pazienti con cancro polmonare.

Nello studio pubblicato da Campa D et al. su *International Journal of Cancer*, è proposta un'analisi di valutazione di questi tre geni chiave e dei suoi polimorfismi in associazione con la terapia chemioterapica. È stata analizzata l'associazione di 53 SNPs in questi tre geni con differenti *endpoint*: risposta alla terapia, tempo libero da progressione (PFS) e sopravvivenza (OS), separatamente per pazienti con SCLC e NSCLC con diverse linee di trattamento.

Sono stati reclutati 377 pazienti (206 con NSCLC e 171 con SCLC) di origine caucasica, con conferma istopatologica di cancro polmonare ed eleggibili per una prima linea chemioterapica. Tutti i pazienti sono stati reclutati nel periodo tra marzo 1999 e febbraio 2007 presso l'ospedale universitario di Heidelberg,

Germania. Lo stadio tumorale alla diagnosi è stato determinato retrospettivamente in accordo con la classificazione cTNM. Tutti i pazienti inclusi in questo studio hanno ricevuto una prima linea chemioterapica. I pazienti con NSCLC sono stati trattati con gemcitabina e/o farmaci a base di platino, mentre i pazienti con SCLC hanno ricevuto etoposide e/o terapia a base di platino. La risposta tumorale è stata valutata dopo il secondo ciclo di chemioterapia come remissione completa (CR), remissione parziale (PR), patologia stabile (SD) o patologia in progressione (PD) in accordo con i criteri RECIST per i tumori solidi.

Gli SNP sono stati selezionati utilizzando il progetto HapMap e il programma Haploview con la tecnica del tagging SNP. Il risultato di quest'analisi ha permesso di estrarre 16 tagging SNP per ABCG2, 25 tagging SNP per ABCB1 e 12 tagging SNP per ABCC2.

Dopo l'analisi di genotipizzazione con Taqman e ABI PRISM 7900HT, sono state calcolate le frequenze alleliche di tutti i polimorfismi ed è stato valutato l'equilibrio di Hardy-Weinberg. La risposta alla chemioterapia è stata valutata utilizzando l'odds ratio (OR) con un intervallo di confidenza del 95% (CI) ottenuto da un modello di regressione logistica multivariata, comparando le frequenze genotipiche nei responsivi alla terapia (CR e PR) e nei non-responsivi (SD e PD). L'hazard ratio è stato stimato utilizzando un modello di Cox per la PFS e per l'OS. Tutte le analisi sono state aggiustate per stadio tumorale, sesso ed età.

L'analisi complessiva ha evidenziato l'associazione significativa di tre SNP con i tre *endpoint* presi in considerazione: rs717620 di ABCC2, rs6979885 di ABCB1, e rs3109823 di ABCG2. I pazienti sono stati suddivisi in sei gruppi diversi: 1) pazienti con SCLC, 2) pazienti SCLC in terapia a base di platino, 3) pazienti SCLC in terapia con etoposide, 4) pazienti con NSCLC, 5) i pazienti NSCLC in terapia a base di platino e 6) i pazienti NSCLC in terapia con gemcitabina. Nell'analisi dei pazienti con SCLC, i portatori dell'allele T di ABCC2 rs717620 avevano una risposta peggiore alla terapia dopo il secondo ciclo, con una PFS e una OS più breve; i portatori dell'allele A di ABCB1 rs6979885 avevano una PFS ed una OS migliore ed infine, i portatori dell'allele C di ABCG2 rs3109823 mostravano una migliore risposta alla terapia, una migliore PFS ed una OS prolungata. Per i pazienti con NSCLC non sono state osservate associazioni significative tra i tre genotipi e i tre *outcome* clinici. Per tenere in considerazione il problema dei test multipli, è stato calcolato per ogni gene il numero delle variabili effettivamente indipendenti (M_{eff}) con un valore soglia finale di 0.0015. Utilizzando questo valore l'unico SNP a rimanere significativamente associato ad un *outcome* clinico era rs717620 ed in particolare con la PFS, e da analisi di Kaplan-Meier e log-rank test quest'associazione è stata confermata ($p=0.0156$). Questa scelta statisticamente così conservativa è dovuta alla ridotta numerosità campionaria e all'ampio numero di polimorfismi studiati, in modo da evitare falsi positivi. In questo modo quindi l'unica associazione è stata quella del polimorfismo rs717620, situato nel promotore di ABCC2. Si ipotizza che questo polimorfismo sia associato ad una ridotta espressione genica, con una riduzione post-trascrizionale dell'espressione proteica negli aplotipi contenenti la variante T. Da analisi stratificata dei sottogruppi di trattamento dei pazienti SCLC è emersa un'associazione fortissima particolarmente per i pazienti in terapia a base di platino. Quest'associazione è molto interessante dato il fatto che il cDNA di ABCC2 umano è stato originariamente isolato da linee cellulari di tumore resistenti al cisplatino, suggerendo in questo modo un ruolo nella resistenza al cisplatino. Rimane sicuramente da chiarire perché questo polimorfismo sia in grado di influenzare in maniera opposta la terapia nei pazienti con NSCLC e con SCLC. Questi risultati non sono del tutto inaspettati dato che SCLC e NSCLC sono molto diversi tra loro, ad esempio non condividono le stesse varianti molecolari, differiscono per aggressività, tipologia di trattamento e risposta terapeutica.

Questo pubblicato da Campa D et al. è il primo studio a prendere in considerazione tutte le variabili comuni presenti nei tre geni chiave di ABC ed ha evidenziato l'effetto del polimorfismo rs717620 di ABCC2 sulla terapia dei pazienti con SCLC. Questo studio è inoltre al momento il più grande ad aver analizzato questi polimorfismi in associazione con la sopravvivenza dei pazienti con SCLC e NSCLC.

In conclusione, numerose indicazioni ci suggeriscono che le varianti genetiche di ABCC2 sono degli importanti fattori nella sopravvivenza del cancro polmonare, ciononostante uno studio più ampio potrebbe sicuramente contribuire ad approfondire le nostre conoscenze sul come questi polimorfismi di ABCC2 siano in grado di influenzare la sopravvivenza dei pazienti con cancro del polmone.

Il polimorfismo rs717620 del gene ABCC2 influenza la risposta terapeutica e la PFS nei pazienti con carcinoma polmonare a piccole cellule ed in terapia chemioterapica a base di platino.

Parole chiave: cancro del polmone, ABCB1, ABCC2, ABCG2, platino.

Riferimento bibliografico

[Campa D](#) et al. *Int J Cancer* 2012, 131(12):2920-8.

IL GENOTIPO CC PER LA VARIANTE RS12979860 DEL GENE IL-28B NEI DONATORI È ASSOCIATO AD UN MIGLIORE *OUTCOME* CLINICO NELL'EPATITE C DOPO TRAPIANTO DI FEGATO

A cura della Dott.ssa Sarah Cargnin

Nei paesi occidentali l'infezione da virus dell'Epatite C (HCV) costituisce una delle principali cause di malattia cronica del fegato, cirrosi ed epatocarcinoma e rappresenta la più comune indicazione per il trapianto di fegato (LT). Fattori individuali come la risposta immunitaria innata ed adattativa del paziente sembrano svolgere un ruolo chiave sia nel naturale decorso dell'infezione da HCV che nella risposta alla terapia farmacologica basata sulla combinazione di interferone pegilato (PEG-IFN) e ribavirina (RBV). Diversi studi hanno evidenziato che il genotipo CC per la variante di rs12979860 a carico del gene IL-28B è un fattore associato ad un maggior tasso di risposta virologica sostenuta (SVR), definita come HCV-RNA non rilevabile a 24 settimane dal completamento della terapia. Inoltre lo SNP rs12979860 sembrerebbe essere correlato ad una rapida comparsa di fibrosi nei pazienti sottoposti a LT. Obiettivo dello studio è stato quello di valutare il ruolo del polimorfismo rs12979860, nei donatori e nei riceventi di fegato trapiantato, come fattore predittivo della risposta alla terapia con interferone e della progressione della fibrosi in un gruppo ben caratterizzato di pazienti sottoposti a trapianto di fegato.

Lo studio è stato condotto retrospettivamente su una coorte di 135 pazienti (età media 59.7 ± 7.7 anni, di cui 96 di sesso maschile e 112 caucasici) selezionati tra il 1996 ed il 2005 presso l'Università della Florida Gainesville (USA). Tutti i pazienti sono stati sottoposti a LT e trattati con IFN in seguito a HCV recidiva post-trapianto. L'85% dei soggetti era caratterizzato da HCV di tipo 1, il genotipo virale più diffuso in Europa e negli USA. L'interferone pegilato e ribavirina è stato somministrato ad una dose dimezzata per le prime due settimane; tale dosaggio, se tollerato, è stato aumentato fino alla dose piena. La durata prevista del trattamento era di 48 settimane per il genotipo 1 e di 24 settimane per il genotipo 2 e 3. Il DNA è stato estratto dagli epatociti del tessuto epatico sia degli organi espianati che di quelli trapiantati e genotipizzato attraverso Real-Time PCR.

La frequenza del genotipo non-CC nei donatori e nei corrispettivi riceventi è stata del 50 %, mentre quella del genotipo CC nei donatori e nei rispettivi riceventi è stata del 7%. Il tasso di SVR è stato del 100% nei donatori e nei rispettivi riceventi con genotipo CC, del 25% nel caso di donatori e riceventi con genotipo non-CC, del 61% nei donatori CC e riceventi non-CC e del 39% nei donatori non-CC e riceventi CC. L'analisi statistica ha evidenziato che i riceventi con genotipo non-CC hanno un rischio di SVR inferiore rispetto ai riceventi con genotipo CC [OR = 0.38, (95% CI 0.17–0.89, P = 0.025)]. Nei donatori non-CC la probabilità di rispondere al trattamento con interferone pegilato e ribavirina risulta inferiore a quella osservata nei donatori CC [OR = 0.16, (95% CI 0.068–0.366, P < 0.001)]. L'analisi limitata al sottogruppo di 110 pazienti con genotipo HCV di tipo 1 ha evidenziato un'associazione tra il genotipo CC e la risposta a PEG-IFN/RBV nei donatori ma non nei riceventi. Non è stata rilevata una correlazione del polimorfismo rs12979860 con la progressione della fibrosi e con la sopravvivenza.

Come mostrato da una recente metanalisi (Y. Chen et al, *Aliment Pharmacol Ther* 2012, 36: 91-103) il polimorfismo rs12979860 costituisce un fattore fortemente correlato alla clearance virale nei pazienti affetti da HCV con genotipo 1, dopo terapia con interferone pegilato e ribavirina. Questo studio ha chiaramente evidenziato che il genotipo rs12979860 sia nel donatore che nel ricevente influenza in maniera significativa la risposta al trattamento con interferone in pazienti con trapianto di fegato. Ulteriori studi sono però necessari per chiarire i meccanismi funzionali che sottostanno all'associazione tra genotipo rs12979860 e controllo dell'infezione da HCV.

In conclusione il genotipo CC per rs12979860, sia nei donatori che nei riceventi, è associato ad una migliore risposta al trattamento con interferone pegilato e ribavirina in pazienti sottoposti a trapianto di fegato. Questo studio suggerisce inoltre l'opportunità di considerare il genotipo CC dei donatori al fine di ottimizzare l'outcome clinico del ricevente.

Parole chiave: HCV, trapianto di fegato, interferone pegilato, risposta virale sostenuta, IL-28.

Riferimento bibliografico

[Firpi RJ](#) et al. *Liver Int* 2012 Oct 29 [Epub ahead of print].

TEST GENETICI *POINT-OF-CARE* PER LA PERSONALIZZAZIONE DELLA TERAPIA ANTIAGGREGANTE (*RAPID GENE*): UNO STUDIO PROSPETTICO, RANDOMIZZATO, *PROOF-OF-CONCEPT*

A cura della Dott.ssa Virginia Paribello

L'approccio standard nei pazienti sottoposti a intervento coronarico percutaneo (PCI) è il trattamento con aspirina e clopidogrel. Molti pazienti sottoposti a questa doppia antiaggregazione piastrinica restano comunque vulnerabili a gravi eventi avversi cardiovascolari (Steinhubl SR et al. *JAMA* 2002, 288: 2411–20). Questa vulnerabilità risulta essere associata ad alti livelli di reattività piastrinica, caratterizzata da inadeguata inibizione del recettore piastrinico P2Y₁₂ dell'ADP, dopo trattamento con clopidogrel (Angiolillo DJ et al. *J Am Coll Cardiol* 2007, 49: 1505–16). Ad oggi, pur essendo state individuate diverse variabili cliniche, l'allele CYP2C19*2 (rs4244285) risulta essere il più efficace predittore di aumento dei maggiori eventi avversi cardiovascolari in pazienti trattati con clopidogrel, eventi dovuti a perdita di funzionalità dell'attività enzimatica con una riduzione fino ad un terzo della farmacodinamica e della farmacocinetica del clopidogrel. Questa variante genetica è comune a quasi il 30% della popolazione caucasica, a circa il 40% della popolazione afroamericana e al 50% della popolazione asiatica. Due ampie meta-analisi (Mega et al. *JAMA* 2010, 304: 1821–30; Hulot JS et al. *J Am Coll Cardiol* 2010, 56: 134–43) hanno dimostrato che l'allele CYP2C19*2 è associato a significativo aumento del rischio di eventi avversi cardiovascolari (hazard ratio 1,55) e trombosi dello stent (2,67). Prasugrel e ticagrelor sono nuovi inibitori del recettore P2Y₁₂ dell'ADP capaci di determinare una più potente inibizione piastrinica rispetto al clopidogrel. Tuttavia, essi sono stati associati a maggiori eventi avversi emorragici e di maggiore entità (Mega JL et al. *Circulation* 2009, 119: 2553–60; Wallentin L et al. *Lancet* 2010, 376: 1320–28). L'identificazione in tempi rapidi del paziente portatore dell'allele CYP2C19*2 potrebbe consentire la personalizzazione della doppia terapia antiaggregante dopo PCI e ridurre con successo al minimo gli eventi avversi cardiovascolari ed emorragici. E' stato sviluppato un test genetico *point-of-care*, con un tampone buccale, per identificare l'allele CYP2C19*2. Il dispositivo *point-of-care* è stato convalidato prima della sua utilizzazione in ambito clinico e l'identificazione mediante il test del paziente portatore della variante CYP2C19*2 è stata confrontata con i convenzionali test genetici basati sul sequenziamento diretto del DNA.

Obiettivo dello studio di Jason D Roberts et al. è la valutazione della fattibilità clinica e dell'efficacia farmacodinamica, con un approccio farmacogenetico, nella terapia duplice antiaggregante in pazienti dopo PCI. E' stato utilizzato un test genetico *point-of-care* per identificare i portatori del allele CYP2C19*2.

In questo studio prospettico, randomizzato, *proof-of-concept* sono stati arruolati 200 pazienti, di età tra i 18-75 anni, per il 95% di origine caucasica, sottoposti a PCI presso l'Università di *Ottawa Heart Institute* tra il 26 agosto 2010 e il 7 luglio 2011. Tutti i pazienti hanno fornito consenso informato scritto e hanno rispettato la strategia di trattamento assegnato. Tutti i pazienti sono stati trattati con un 600 mg in bolo di clopidogrel, almeno 24 ore prima della PCI, in linea con le indicazioni di pratica clinica dell'istituto. Sono stati esclusi i pazienti che avevano ricevuto altro antiaggregante come trattamento, quali aspirina e/o warfarin o dabigatran, così come pure quelli che avevano avuto ictus, attacco ischemico transitorio, un peso corporeo inferiore a 60 kg, conta piastrinica inferiore 100.000 per microL, diatesi emorragica nota, ematocrito inferiore al 30% o più del 52%, grave disfunzione epatica e insufficienza renale (clearance della creatinina <30 ml/min). Sono stati escluse le donne incinte. La farmacoterapia, adiuvante durante la PCI, è stata

limitata a bivalirudina. I pazienti sottoposti a PCI, per sindrome coronarica acuta o angina stabile, sono stati assegnati in modo casuale alla genotipizzazione rapida *point-of-care* e al trattamento standard. I pazienti appartenenti al gruppo di genotipizzazione rapida sono stati sottoposti a screening per l'allele CYP2C19*2 mediante il test *point-of-care* e quelli identificati come portatori dell'allele CYP2C19*2 sono stati trattati con 10 mg/die di prasugrel, invece che con clopidogrel dopo angioplastica (PCI). I pazienti non portatori dell'allele e quelli del gruppo di trattamento standard hanno ricevuto 75 mg/die di clopidogrel. Hanno completato il follow-up 187 pazienti (91 per il gruppo genotipizzazione rapida, 96 per il trattamento standard). Al follow-up, 23 (25%) dei 91 pazienti assegnati al gruppo della genotipizzazione sono risultati portatori di almeno una copia dell'allele CYP2C19*2, ugualmente presente in 23 (24%) pazienti dei 96 nel gruppo di terapia standard. Tra i pazienti che presentavano l'allele CYP2C19*2, quattro (4%) pazienti nel gruppo di genotipizzazione rapida e tre (3%) nel gruppo di trattamento standard sono risultati omozigoti. Confrontando i dati con il sequenziamento diretto del DNA, un paziente del gruppo di genotipizzazione rapida è stato erroneamente identificato come paziente portatore dell'allele CYP2C19*2. Il dispositivo ha mostrato una sensibilità del 100% (95% CI 92,3 -100) e una specificità del 99,3% (96,3 -100), determinando una precisione finale del 93,6%. Al basale, nei due gruppi i valori medi di unità di reattività piastrinica (PRU, marker associato a maggiore rischio di eventi cardiovascolari) non erano significativamente differenti. Tuttavia, la media di PRU dei pazienti con CYP2C19*2 (198,8 [SD 85,6]) è stata significativamente più alta rispetto ai non portatori (143,8 [100,5]; $p=0,0011$). La PRU media dei 23 pazienti individuati dal test come portatori dell'allele CYP2C19*2 e trattati con prasugrel ad 1 settimana dall'intervento è risultata significativamente inferiore ($p=0,0092$) rispetto alla media dei 7 (30% con PRU>234) dei 23 pazienti del braccio standard, trattati con il clopidogrel e comunque portatori dell'allele CYP2C19*2 ($p=0,05$). 18 (13%) dei 141 pazienti non portatori della variante in entrambi i gruppi, trattati con clopidogrel, hanno avuto alta reattività piastrinica durante e dopo 7 giorni di trattamento. Tutti i pazienti sottoposti a PCI sono stati inclusi nell'analisi dei risultati clinici e di sanguinamento. Non sono stati osservati esiti clinici avversi ischemici in entrambi i gruppi a 7 e 30 giorni. Non c'è stata differenza nella frequenza di sanguinamenti minori nei due gruppi: 6% dei 91 pazienti del gruppo di genotipizzazione rapida rispetto al 2% dei 96 in trattamento standard ($p=0,2693$). Un sanguinamento maggiore si è verificato in due pazienti (2,2%) di genotipizzazione rapida e uno (1%) di trattamento standard ($p=0,6134$). Dei due pazienti del gruppo di genotipizzazione rapida uno è stato trattato con clopidogrel.

In conclusione, il potenziale clinico della farmacogenetica è sempre più evidente in diverse aree della medicina, ma l'integrazione della farmacogenetica nella pratica clinica, come strumento guida di ausilio per definire il trattamento, incontra numerosi ostacoli in ambito clinico. Una limitazione è l'accessibilità dei dati in tempi rapidi. Questa difficoltà emerge in modo particolare nei pazienti con sindrome coronarica acuta sottoposti a PCI urgente, dove è necessaria una rapida valutazione del trattamento da sottoporre al paziente.

Questo test genetico individua i soggetti la cui risposta al clopidogrel è determinata, a prescindere dai livelli del farmaco allo steady-state. Questo studio canadese *RAPID GENE*, fornisce la prima evidenza pubblicata di validazione e applicazione clinica di un test genetico *point-of-care* in medicina: un test rapido da effettuare al letto del paziente per identificare i portatori dell'allele CYP2C19*2 (*non responder* alla terapia con il clopidogrel) e scegliere, conseguentemente, l'antiaggregante più adeguato in base al genotipo.

Inoltre dimostra, in modo inequivocabile, che la conoscenza della variante allelica del gene chiave per il metabolismo di clopidogrel permette di scegliere il trattamento più adeguato per ottenere un miglioramento della soppressione piastrinica, marker che si è sempre dimostrato, ad oggi, correlato agli *outcomes* clinici negli studi su PCI. Sebbene l'allele CYP2C19*2 è un forte predittore di fallimento di terapia con clopidogrel dopo PCI, l'integrazione nell'analisi genetica di ulteriori varianti genetiche migliorerebbe la possibilità di identificare il rischio genetico dei pazienti e quindi evidenziare quelli a maggiore rischio.

Ulteriori studi, con test genetici in associazione basati su strategie farmacogenetiche valide, potrebbero contribuire a ottimizzare il trattamento dei pazienti sottoposti a PCI. Questo studio sottolinea l'importanza dell'integrazione della genetica nella clinica ed eseguito su larga scala consentirà di valutarne e validarne il valore nelle strategie farmacogenetiche.

Test genetici *point-of-care* dopo PCI possono essere validi strumenti di identificazione in tempi rapidi di pazienti portatori dell'allele CYP2C19*2 e essere di ausilio a definire il trattamento con prasugrel per ridurre l'alta reattività piastrinica durante il trattamento.

Lo studio GENE RAPID è stato finanziato da Spartan Biosciences.

Lo sponsor di questo studio non ha avuto alcun ruolo nel disegno dello studio, nella raccolta dei dati, nell'analisi dei dati, nell'interpretazione dei dati e nello scrivere la pubblicazione. L'autore ha avuto pieno accesso a tutti i dati dello studio e la responsabilità finale nella decisione di pubblicarlo.

Parole chiave: PCI, clopidogrel, prasugrel, ticagrelor, CYP2C19.

Riferimento bibliografico

[Roberts JD](#) et al. *Lancet* 2012, 379: 1705–11.



Sostieni la Società Italiana di Farmacologia

La Società Italiana di Farmacologia è tra i beneficiari dei proventi del 5 per mille dell'IRPEF.

È sufficiente apporre la propria firma ed indicare, sulla dichiarazione dei redditi, nel riquadro associazioni di volontariato, onlus, associazioni di promozione sociale e da altre fondazioni e associazioni riconosciute, 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: tel. 02-29520311.

sif.farmacologia@segr.it; sif.informazione@segr.it; sifcese@comm2000.it.

SIF – FARMACOGENETICA

Newsletter del Gruppo di lavoro sulla Farmacogenetica della Società Italiana di Farmacologia

Registrazione del Tribunale di Milano n° 180 data 31/03/2010

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

Direttore	Prof. Emilio Clementi (Università di Milano)
Coordinatore	Dott.ssa Valentina Boscaro (Università di Torino)
Web Editor	Dott. Federico Casale (Università di Torino)
Hanno contribuito a questo numero:	Dott.ssa Sarah Cargin (Università del Piemonte Orientale) Dott.ssa Sara De Iudicibus (Università di Trieste) Dott.ssa Marzia Del Re (Università di Pisa) Dott.ssa Lucia Gozzo (Università di Catania) Dott.ssa Virginia Paribello (Università di Salerno) Dott.ssa Gloria Ravegnini (Università di Bologna) Dott.ssa Michela Santoro (Università di Pisa) Dott. Vittorio Simeon (IRCCS – CROB) Dott. Gabriele Stocco (Università di Trieste) Dott.ssa Eleonora Turrini (Università di Bologna)
Supervisione	Prof. Diego Fornasari (Università di Milano) Prof. Armando Genazzani (Università del Piemonte Orientale)

Archivio SIF-Farmacogenetica Edicola Virtuale SIF

<http://edicola.sifweb.org/edicola/farmacogenetica/pagina/archivio>

Contatti: webmaster@sifweb.org

DISCLAMER – Leggere attentamente

SIF, Società Italiana di Farmacologia, si propone di pubblicare sul proprio sito internet www.sifweb.org informazioni precise ed aggiornate, ma non si assume alcuna responsabilità né garantisce la completezza ed esaustività delle informazioni messe a disposizione. In particolare, SIF precisa che le risposte fornite ai quesiti medico / tossicologici sono fornite sulla base della raccolta di fonti bibliografiche esistenti (rispetto alle quali non si garantisce la esaustività). Pertanto, dalle risposte ai quesiti non devono essere tratte conclusioni se non un mero richiamo alle fonti presenti in letteratura. La SIF, inoltre, avvisa gli utenti che le informazioni contenute nel proprio sito e le risposte ai quesiti hanno finalità meramente divulgative, informative ed educative e non possono in alcun modo sostituire la necessità di consultare il Ministero della Salute, l'Istituto Superiore di Sanità e più in generale le Istituzioni nazionali ed internazionali attive in materia. IL SITO INTERNET DI SIF E LE RISPOSTE AI QUESITI NON DEVONO IN ALCUN MODO ESSERE CONSIDERATI PARERI MEDICI. SIF, quindi, declina ogni responsabilità circa l'utilizzo del proprio sito, delle informazioni in esso contenute e delle risposte ai quesiti ed avverte l'utente che ogni e qualsiasi contenuto ed informazione del sito (comprese le risposte ai quesiti) sarà utilizzata sotto diretta e totale responsabilità dell'utente stesso. Né SIF, né alcuna altra parte implicata nella creazione, realizzazione e pubblicazione del sito internet di SIF e nelle redazioni delle risposte ai quesiti possono essere ritenute responsabili in alcun modo, né per alcun danno diretto, incidentale, conseguente o indiretto che deriva dall'accesso, uso o mancato uso di questo sito o di ogni altro ad esso collegato, o di qualunque errore od omissione nel loro contenuto. Le informazioni fornite nelle newsletters, 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>, sulle relative newsletters, 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. Non sono ammesse la divulgazione e la diffusione di "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.
