

**SIF - FARMACOGENETICA****Newsletter Numero 49 – Marzo 2013**

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

Sommario

- *Trial* farmacogenetico randomizzato nella dipendenza da cocaina: effetti del disulfiram in soggetti con polimorfismo per il gene che codifica per la dopamina β -idrossilasi
- Studio dell'associazione tra variazioni genetiche nel TBC1D1 ed aumento di peso indotto da antipsicotici
- Associazione del polimorfismo F158V del gene FCGR3A con la risposta al trattamento con rituximab in pazienti spagnoli affetti da malattie sistemiche autoimmuni
- Dal singolo SNP al locus esteso (*wide-locus*): studi di associazione *genome-wide* per l'identificazione di geni funzionalmente correlati e regioni intrageniche in studi con un piccolo numero di campioni
- Fattori prognostici per il trattamento del cancro al pancreas con regime di polichemioterapia a base di gemcitabina-cisplatino: rivalutazione del polimorfismo Lys751Gln nel gene della riparazione XPD
- La ripetizione CA nell' introne 1 di EGFR è correlata con ricorrenza e sopravvivenza nel cancro esofageo trattato esclusivamente in modo chirurgico
- Le varianti geniche della proteina implicata nella resistenza ai farmaci (ABCC1/MRP1) predicono la tossicità ematologica in pazienti con tumore della mammella che ricevono una chemioterapia adiuvante con 5-fluorouracile, epirubicina e ciclofosfamide (FEC)
- Approfondimento del ruolo dell'aplotipo UGT1A nella tossicità ematologica in pazienti affetti da cancro colon rettale trattati con il regime terapeutico 5-fluorouracile/irinotecan (FOLFIRI)
- Marker molecolari del *pathway* genetico degli ormoni sessuali associati all'efficacia della terapia di deprivazione androgenica per il trattamento del cancro della prostata
- Gli effetti delle varianti nel promotore di MATE1 e MATE2 sulla farmacocinetica e farmacodinamica della metformina

TRIAL FARMACOGENETICO RANDOMIZZATO NELLA DIPENDENZA DA COCAINA: EFFETTI DEL DISULFIRAM IN SOGGETTI CON POLIMORFISMO PER IL GENE CHE CODIFICA PER LA DOPAMINA β -IDROSSILASI

A cura della Prof.ssa Patrizia Romualdi e della Dott.ssa Donatella Carretta

Il disulfiram è un farmaco utilizzato nella terapia della dipendenza da cocaina, oltre che da tempo in quella da alcol. Uno dei suoi meccanismi d'azione è l'inibizione dell'enzima dopamina β -idrossilasi (DBH), che

converte la dopamina in noradrenalina. L'inibizione della D β H riduce i livelli periferici e centrali di noradrenalina e aumenta i livelli di dopamina. La dipendenza da cocaina ha una forte componente genetica, pertanto la farmacoterapia di questa patologia dovrebbe comprendere anche un approccio di tipo genetico molecolare. La variante C-1021T (-1021C>T) del gene che codifica per la D β H è un polimorfismo funzionale che altera la trascrizione del gene *DBH* determinando la riduzione dei livelli plasmatici di D β H. Nei soggetti con questa variante, il disulfiram potrebbe essere una terapia farmacologica inefficace per la dipendenza da cocaina.

Il presente studio è un *trial* clinico randomizzato, controllato vs placebo che ha lo scopo di valutare l'efficacia del disulfiram nel ridurre il consumo di cocaina in pazienti con genotipo CC (e normali livelli di D β H) rispetto ai pazienti portatori dell'allele T (e bassi livelli di D β H).

Per lo studio sono stati arruolati 74 soggetti cocainomani e oppiacei-codipendenti in precedenza stabilizzati con metadone per 2 settimane (dose finale di mantenimento di 60 mg/die) e a cui fosse stata riscontrata almeno una volta positività alla cocaina nelle urine. Tutti i soggetti rispondevano ai criteri del DSM-IV per la diagnosi di dipendenza da oppiacei e cocaina. I criteri di esclusione erano: concomitanza di altre dipendenze da sostanze o da alcool, anamnesi positiva per patologie psichiatriche maggiori o presenza di tendenze suicide. Le donne in età fertile incluse nello studio avevano un test di gravidanza negativo e si erano impegnate ad utilizzare un'adeguata contraccezione durante tutto il corso dello studio. I pazienti sono stati randomizzati in due gruppi: ad uno è stato somministrato disulfiram (250 mg/die, n=34), all'altro placebo (n=40), per 10 settimane. La genotipizzazione del polimorfismo C-1021T del gene *DBH* è stata effettuata da un campione di saliva; i pazienti sono stati divisi in due gruppi in base al genotipo *DBH*: un gruppo senza l'allele T (gruppo con genotipo CC) ed un gruppo con l'allele T (gruppo con genotipo CT o TT). È stato quindi valutato il ruolo di questa variante genica sulla quantità di cocaina libera nelle urine a seguito del trattamento con disulfiram. La riduzione della positività alla cocaina è stata usata come indice di riduzione dell'uso di cocaina.

I risultati dello studio hanno mostrato che il tasso di positività delle urine alla cocaina dopo terapia con disulfiram differiva rispetto al placebo nei pazienti con genotipo CC [F(1,236)= 17.2, p<0.00005], ma non cambiava in quelli con genotipo CT o TT [F(1,234)=1.12, p>0.05].

La significativa riduzione della positività urinaria alla cocaina ottenuta a seguito della somministrazione di 250 mg di disulfiram è consistente con precedenti studi riportati in letteratura sull'efficacia di questo farmaco nei soggetti affetti da dipendenza alla cocaina.

Nel presente studio, i pazienti con due alleli C associati a normali livelli di D β H (CC) hanno risposto al disulfiram, mentre quelli con un genotipo che codifica bassi livelli di enzima (CT e TT) non hanno mostrato differenze rispetto al placebo. La differente risposta al disulfiram tra i pazienti con bassi ed alti livelli di D β H potrebbe essere dovuta alle differenze dello stato funzionale dei recettori della dopamina. È stato infatti dimostrato che bassi livelli di D β H riducono la dopamina basale extracellulare nel nucleo accumbens e nel caudato-putamen; tale riduzione up-regola i recettori dopaminergici post-sinaptici ad alta affinità e determina un'ipersensibilità comportamentale agli psicostimolanti. Pertanto, la modesta riduzione della trasmissione dopaminergica da parte del disulfiram potrebbe non attenuare le risposte comportamentali agli psicostimolanti in quei soggetti che hanno i recettori up-regolati a causa dei loro livelli di D β H geneticamente bassi.

I dati del presente studio sono in accordo con studi preclinici che mostrano come il disulfiram aumenti i livelli di dopamina e riduca quelli di noradrenalina nella corteccia prefrontale dei topi che hanno due alleli CC, mentre abbia scarso effetto nei topi che non hanno alcun allele C.

È stato suggerito che l'efficacia del disulfiram nella dipendenza da cocaina sia dovuta anche all'aumento dei sintomi aversivi che si ottiene sempre tramite la riduzione dell'attività della D β H. Nel presente studio, tuttavia, i pazienti non hanno riferito sintomi aversivi per la cocaina, nonostante in letteratura sia stato riportato che il disulfiram aumenta gli effetti negativi associati alla cocaina, quali ansia e paranoia, e riduce gli effetti soggettivi positivi. Bassi livelli di D β H sono, inoltre, stati associati a sintomi psicotici in malattie psichiatriche. Infine, la predisposizione genetica per bassi livelli di D β H è stata associata alla paranoia indotta da cocaina.

Questo studio ha diverse limitazioni. Primo, il campione di pazienti è troppo piccolo per poter effettuare studi genetici di associazione. Secondo, l'abuso di alcool è un problema frequente tra i soggetti cocainomani,

ma in questo studio la frequenza di questa patologia era molto bassa in quanto costituiva un criterio di esclusione dallo studio. Terzo, un meccanismo alternativo che potrebbe spiegare l'efficacia del disulfiram, oltre a quello di inibizione della D β H, comprende l'inibizione della aldeide deidrogenasi 2 che porta alla generazione di tetraidropapaverolina, la quale inibisce la tirosina idrossilasi attivata e sopprime la produzione ed il rilascio della dopamina indotte dalla cocaina. Pertanto il disulfiram potrebbe non essere il farmaco ottimale per ottenere l'inibizione della D β H; recentemente è in fase di sviluppo un altro inibitore della D β H, il nopicastat, che non inibisce l'aldeide deidrogenasi e non produce interazioni avverse con l'alcool.

In conclusione, questo studio dimostra che la genotipizzazione del gene *DBH* che codifica per la dopamina β -idrossilasi, in particolare l'identificazione del polimorfismo C-1021T, ha una potenziale utilità clinica nell'individuare i pazienti responsivi al disulfiram nell'ambito della terapia farmacologica della dipendenza da cocaina.

Parole chiave: Cocaina, dipendenza, disulfiram, geni, polimorfismo, trattamento

Riferimento bibliografico:

[Kosten TR](#) et al. *Biol Psychiatry* 2013, 73: 219-24.

STUDIO DELL'ASSOCIAZIONE TRA VARIAZIONI GENETICHE NEL *TBC1D1* ED AUMENTO DI PESO INDOTTO DA ANTIPISICOTICI

A cura della Dott.ssa Lucia Gozzo

Il trattamento con antipsicotici di seconda generazione spesso comporta un significativo aumento del peso corporeo e molti pazienti sviluppano col tempo la sindrome metabolica. Si ritiene che gli antipsicotici causino aumento di peso influenzando il controllo ipotalamico dell'introito di cibo e l'omeostasi energetica. È stato, inoltre, riportato un alterato metabolismo del glucosio in animali ed in pazienti trattati con antipsicotici di seconda generazione, soprattutto olanzapina e clozapina. Pertanto, anche l'alterazione del metabolismo del glucosio potrebbe essere alla base dell'aumento di peso legato all'assunzione di antipsicotici.

Un candidato per la regolazione del metabolismo del glucosio è rappresentato dal dominio TBC1 della famiglia di proteine 1 (*TBC1D1*), una proteina attivante la GTPasi-Rab coinvolta nella traslocazione del trasportatore 4 del glucosio (GLUT4) a livello della membrana cellulare. L'mRNA del *TBC1D1* è stato trovato espresso a livello del muscolo scheletrico, dell'ipotalamo, del cuore e del pancreas ed in minori concentrazioni anche a livello del tessuto adiposo, del fegato e dell'intestino. Questa proteina viene fosforilata da Akt e da proteine chinasi attivate da AMP (MAPK) in risposta all'insulina ed alla contrazione muscolare. È stato dimostrato che la clozapina attiva la MAPK cerebrale e dei tessuti periferici, portando ad un aumento dell'entrata di glucosio all'interno delle cellule (Kim et al, *Life Sci* 2010, 87: 42–48). In uno studio precedente è stata trovata un'associazione significativa tra le variazioni genetiche nei geni codificanti le subunità α -catalitica (*PRAKAA2*) e β -regolatoria (*PRKAB2*) della MAPK e l'aumento di peso da antipsicotici (Souza et al, *J Psychiatr Res* 2012, 46: 462–68). Pertanto, la proteina *TBC1D1* potrebbe rappresentare un *link* tra l'attivazione della MAPK clozapina-mediata e l'aumento dell'entrata del glucosio attraverso il GLUT4.

Le variazioni genetiche del *TBC1D1* sono state associate, inoltre, ad un maggiore deposito di grassi negli animali (Fontanesi et al, *Mol Biol Rep* 2011, 38: 1425–31; Fontanesi et al, *J Anim Sci* 2012, 90: 2450-64), ed in topi *knock-out* per questo gene è stato riscontrato un peso corporeo minore ed una ridotta captazione di glucosio a livello del muscolo scheletrico (Chadt et al, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008, 303: E524-33). Due studi indipendenti sull'uomo hanno trovato un'associazione tra la variante R125W (rs35859249) e l'obesità. È stato infine dimostrato, in vivo ed in vitro, che questa variante influenza la traslocazione del GLUT4 indotta da insulina (Peck et al. *J Biol Chem* 2009, 284: 30016–23; An et al, *Diabetes* 2010, 59: 1358–65).

Poiché gli antipsicotici sembrano causare un aumento di peso corporeo tramite l'influenza del metabolismo del glucosio e poiché il *TBC1D1* gioca un ruolo importante nel trasporto di glucosio e le sue variazioni

genetiche sono state associate ad obesità, è stato ipotizzato che le variazioni genetiche del gene *TBC1D1* possano predire l'insorgenza di questa reazione avversa.

Sono stati inclusi 195 soggetti di età compresa tra 18 e 60 anni, affetti da schizofrenia o disturbo schizo-affettivo secondo i criteri del DSM-III-R o DSM-IV. I pazienti sono stati reclutati presso le seguenti strutture: *Charité University Medicine* di Berlino (gruppo A, N= 77); *Case Western Reserve University* di Cleveland (gruppo B, N=65); *Hillside Hospital* di Glen Oaks (gruppo C, N= 53). Il gruppo A ha ricevuto diversi antipsicotici all'interno di uno studio che prevedeva la valutazione del peso corporeo per 6 settimane; il gruppo B è stato trattato con clozapina per 6 settimane, dopo aver ricevuto un trattamento con antipsicotici di prima generazione, a cui sono risultati *non responders*; il gruppo C ha ricevuto clozapina, olanzapina, risperidone o aloperidolo per 14 settimane all'interno di uno studio prospettico, in doppio-cieco.

Nei pazienti in terapia con olanzapina e clozapina è stato riscontrato il più alto aumento di peso (aumento di peso con olanzapina/clozapina: $6.01 \pm 7.08\%$, con altri farmaci: $3.31 \pm 5.15\%$; $p = 0.005$). L'aumento di peso è risultato correlato significativamente con la durata del trattamento ($p = 0.004$) ma non con il peso di partenza ($p = 0.085$). I dati sull'età di insorgenza (23 ± 8.47 anni) e la durata della malattia (11.3 ± 8.80 anni) erano disponibili per 89 pazienti, e non sono risultati associati con il valore dell'aumento di peso (età d'insorgenza: $p = 0.975$; durata della malattia: $p = 0.891$). È stata osservata una differenza significativa tra i gruppi nel peso al *baseline*, nell'età, nelle etnie, nel sesso e nelle terapie in studio. Poiché non sono state trovate differenze nelle variazioni percentuali di peso rispetto al valore iniziale tra i vari gruppi, sono state effettuate analisi statistiche comuni a tutti i gruppi e poi stratificate per i fattori di confondimento.

I polimorfismi analizzati erano in equilibrio di Hardy-Weinberg (rs9852: $p = 0.334$; rs35859249: $p = 1.000$), ma non in *linkage disequilibrium*, quindi non sono state effettuate analisi dell'aplotipo. A causa della bassa frequenza degli alleli minori, per l'analisi statistica i portatori di questi alleli sono stati unificati (CT+TT per entrambi gli alleli). I portatori in omozigosi dell'allele C dell'rs9852 hanno raggiunto un peso maggiore ($5.3 \pm 6.6\%$) rispetto ai portatori dell'allele T ($2.7 \pm 5.6\%$), anche se non è risultato significativo quando è stata effettuata un'analisi in relazione alla durata del trattamento ($p = 0.063$). È stata effettuata un'analisi nel sottogruppo di pazienti in terapia con antipsicotici ad alto rischio di determinare aumento di peso (clozapina e olanzapina, N=114), ed è stato osservato un aumento del peso significativamente maggiore negli omozigoti per l'allele C ($6.7 \pm 7.1\%$) in confronto ai portatori dell'allele T ($3.0 \pm 6.8\%$; $p = 0.024$). A causa delle differenze significative nell'aumento di peso ($p < 0.001$) e nella distribuzione del genotipo ($p = 0.009$) tra le diverse etnie, il campione è stato ulteriormente stratificato. Non è stata osservata un'associazione significativa tra l'rs9852 e l'aumento di peso né nei pazienti di origine Europea (N=68, $p = 0.144$) né in quelli di origine Africana (N= 40, $p = 0.134$) trattati con olanzapina o clozapina. Infine, è stata valutata l'influenza dell'rs9852 sul peso corporeo in base al sesso, ma non è stata trovata un'associazione significativa.

L'rs35859249 non è stato associato all'aumento di peso in nessuna delle analisi effettuate (con stratificazione in base ai farmaci assunti, all'etnia, al sesso ed alla durata del trattamento; $p > 0.05$).

Questo studio è stato il primo a valutare l'associazione tra le variazioni genetiche del *TBC1D1* e l'aumento di peso da antipsicotici. Non è stata trovata un'associazione significativa tra l'rs35859249 e l'aumento di peso, mentre l'allele T dell'rs9852 sembra avere un effetto protettivo nei pazienti in terapia con clozapina o olanzapina. Comunque, dopo la stratificazione per sesso o etnia, non è stata osservata un'associazione significativa, e ciò potrebbe essere dovuto alle piccole dimensioni del campione. Sono presenti due report sull'associazione tra l'rs35859249 e l'obesità familiare (Stone et al, *Hum Mol Genet* 2006, 15: 2709–20; Meyre et al, *Hum Mol Genet* 2008, 17: 1798–802), mentre non ci sono studi sull'associazione tra l'rs9852 e l'obesità nella popolazione generale. Questo polimorfismo è stato selezionato per la localizzazione a livello della regione 3'UTR del *TBC1D1* e per la vicinanza ad un sito di legame per un microRNA (miRNA), RNA non codificante con ruolo importante nella regolazione genica post-traduzionale. Sebbene non sia nota la funzione dell'rs9852, potrebbe essere coinvolto nell'alterazione del legame del miRNA, con conseguente variazione dell'espressione e dell'attività del *TBC1D1*. Questi cambiamenti possono influenzare la regolazione della traslocazione del GLUT4 e quindi modificare il metabolismo del glucosio a seguito della somministrazione degli antipsicotici atipici.

Questi dati potrebbero portare allo sviluppo di strategie terapeutiche nuove. Studi recenti, infatti, hanno sottolineato l'importanza del metabolismo del glucosio nell'aumento di peso da antipsicotici attraverso la

dimostrazione di un effetto preventivo con l'utilizzo di metformina (Wu et al, *Am J Psychiatry* 2008, 165: 352–58; Wang et al, *Schizophr Res* 2012, 138: 54–57).

In conclusione, questo studio indica un impatto moderato delle variazioni genetiche del *TBC1D1* sull'aumento di peso da antipsicotici. Ulteriori ricerche su *TBC1D1* e geni associati sono necessarie e possono fornire mezzi promettenti per personalizzare la prevenzione ed il trattamento dell'aumento di peso da antipsicotici.

Limiti dello studio sono la grandezza del campione, la mancanza di informazioni sul *body mass index* per tutti i soggetti e l'eterogeneità del campione in termini di caratteristiche cliniche e trattamento ricevuto. Inoltre, non sono state effettuate correzioni in base all'espressione di geni nella regolazione ipotalamica dell'omeostasi energetica, precedentemente valutati in questo campione, poiché è stata testata una nuova ipotesi a priori coinvolgente il metabolismo del glucosio.

Conflitti di interesse: alcuni autori hanno ricevuto fondi da aziende farmaceutiche

Parole chiave: aumento di peso indotto da antipsicotici, antipsicotici di seconda generazione, *TBC1D1*

Riferimento bibliografico

[Brandl EJ](#) et al. *Hum Psychopharmacol* 2013 Jan 30 [Epub ahead of print].

ASSOCIAZIONE DEL POLIMORFISMO F158V DEL GENE FCGR3A CON LA RISPOSTA AL TRATTAMENTO CON RITUXIMAB IN PAZIENTI SPAGNOLI AFFETTI DA MALATTIE SISTEMICHE AUTOIMMUNI

A cura della Dott.ssa Sarah Cargnin

Le malattie sistemiche autoimmuni sono un gruppo eterogeneo di patologie genetiche complesse in cui il sistema immunitario genera una risposta immunitaria adattativa diretta contro antigeni "self" espressi ubiquitariamente nell'organismo. Presentano diverse manifestazioni cliniche ma sono accomunate da alcuni meccanismi patogenici, tra cui un'anormale regolazione dei linfociti B. I più comuni disordini autoimmuni sistemici comprendono il Lupus Eritematoso Sistemico, la Sclerosi Sistemica, l'Artrite Reumatoide, la Sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi e le Vasculiti sistemiche. L'approccio politerapico per il trattamento di tali patologie si basa sull'impiego di glucocorticoidi e di immunosoppressori, tra cui il rituximab, un anticorpo monoclonale chimerico murino/umano, specifico per l'antigene umano CD20 espresso sui linfociti B. Il legame di rituximab con l'antigene CD20 induce una deplezione dei linfociti B tramite meccanismi di citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (ADCC), citotossicità complemento-dipendente e di induzione dell'apoptosi. Nello specifico, l'interazione tra la porzione Fc dell'anticorpo monoclonale con i rispettivi recettori Fc- γ (FCGR) espressi sulle cellule citotossiche è responsabile della citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente e dei processi di fagocitosi. I recettori FCGR sono codificati da 8 geni (FCGR1 A/B/C; FCGR2 A/B/C; FCGR3 A/B) localizzati sul cromosoma 1. Il polimorfismo F158V del gene FCGR3A comporta l'aumento dell'affinità del recettore per gli anticorpi monoclonali IgG in seguito alla sostituzione di una fenilalanina con una valina in posizione 158. Studi precedenti hanno mostrato un'associazione del polimorfismo F158V del gene FCGR3A con una miglior risposta a rituximab in pazienti affetti da linfoma non-Hodgkin, artrite reumatoide e Lupus Eritematoso Sistemico. Tali risultati non sono stati, invece, confermati in soggetti affetti da sindrome di Sjögren o leucemia linfocitica cronica. Obiettivo dello studio è stato quello di valutare il possibile impatto del polimorfismo FCGR3A F158V sulla risposta clinica al trattamento farmacologico con rituximab in una popolazione di pazienti spagnoli affetti da diverse forme di malattie sistemiche autoimmuni.

Sono stati reclutati 132 pazienti spagnoli affetti da malattie sistemiche autoimmuni ed in trattamento con rituximab. Di questi 132 pazienti, 81 (61.4%) sono affetti da Lupus Eritematoso Sistemico; 16 (12.1%) presentano differenti miopatie infiammatorie tra cui polimiositi e dermatomiositi; 13 (9.8%) hanno vasculiti ANCA-associate, tra cui la granulomatosi di Wegener, la sindrome di Churg-Strauss e la poliangeite microscopica; 22 (16.7%) sono, invece, colpiti da altre malattie sistemiche autoimmuni, come la sindrome di

Sjögren, la sclerosi sistemica o l'anemia emolitica autoimmune. La maggior parte dei pazienti ha ricevuto 4 dosi di rituximab da 375 mg/m², somministrate per infusione endovenosa nei giorni 1, 8, 15 e 22; ai restanti sono state, invece, somministrate due dosi da 1000 mg di rituximab, con un intervallo di 15 giorni l'una dall'altra. La risposta clinica è stata valutata a sei mesi dalla prima infusione, secondo le raccomandazioni ACR (American College of Rheumatology) e EULAR (European League Against Rheumatism). Il DNA è stato estratto da sangue periferico e genotipizzato per il polimorfismo FCGR3A F158V tramite Real-Time PCR.

L'87.9% (n=116) dei pazienti inclusi nello studio ha risposto adeguatamente alla terapia con rituximab, mentre il restante 12.1% (n=16) non ha risposto al farmaco. Tra i pazienti *responders*, 50 pazienti (43%) hanno il genotipo *wild-type* 158FF, 45 (39%) sono eterozigoti 158FV e 21 (18%) sono omozigoti 158VV. Tra i *non responders*, 12 (75%) sono FF, 3 (19%) sono FV e 1 (6%) è VV. La frequenza dell'allele FCGR3A 158V risulta significativamente maggiore nel gruppo dei *responders* rispetto a quello dei *non responders* [*responders vs non responders*: 38% vs 16%, OR=3.24, 95% CI 1.17-11.13, P=0.01]. Rituximab è efficace nel 94% dei pazienti portatori dell'allele V e nell'81% dei pazienti con genotipo FF [OR=3.96, 95% CI 1.10-17.68, P=0.02]. Successivamente, sono stati analizzati i pazienti affetti da Lupus Eritematoso Sistemico (81/132) separatamente da quelli aventi altri disordini sistemici autoimmuni: in entrambi i gruppi è stato osservato un trend simile a quello riscontrato nell'analisi globale, ma non è stata raggiunta la significatività statistica. Infatti, la frequenza dell'allele FCGR3A-158V risulta maggiore nei *responders* rispetto ai *non responders* sia nel gruppo dei pazienti affetti da Lupus Eritematoso Sistemico [*responders vs non responders*: 49% vs 20%, OR 3.89, 95% CI 0.70-39.51, P=0.08] che nel gruppo dei pazienti con altre malattie sistemiche autoimmuni [*responders vs non responders*: 42% vs 17%, OR 3.65, 95% CI 0.71-35.81, P=0.08].

I risultati ottenuti in questo studio, relativi all'associazione del polimorfismo FCGR3A F158V con la risposta a rituximab in pazienti affetti da malattie sistemiche autoimmuni, sono in linea con quelli riportati in letteratura. Infatti, Anolik e colleghi (*Arthritis Rheum* 2003, 48:455-459) hanno riscontrato, in un gruppo di pazienti affetti da Lupus Eritematoso Sistemico, una miglior risposta a rituximab nei portatori dell'allele 158V. Analogamente, in uno studio più recente, condotto su una coorte di pazienti affetti da artrite reumatoide, i portatori dell'allele 158V hanno mostrato una miglior risposta al trattamento con l'anticorpo monoclonale (Ruyssen-Witrand et al, *Ann Rheum Dis* 2012, 71:875-877). In questo studio, invece, l'associazione tra il polimorfismo FCGR3A F158V e la risposta a rituximab è risultata statisticamente significativa unicamente sull'intera coorte di pazienti affetti da diverse malattie sistemiche autoimmuni. L'assenza di significatività nell'analisi per sottogruppi è probabilmente dovuta ad un basso potere statistico dello studio. Sulla base, quindi, dei risultati ottenuti in questo studio e di quelli riportati in letteratura, la variante F158V del gene FCGR3A potrebbe essere considerata un potenziale fattore predittivo di risposta a rituximab, comune a differenti tipologie di malattie sistemiche autoimmuni. Ampi studi prospettici sono comunque necessari per confermare questa ipotesi.

In conclusione, il polimorfismo FCGR3A F158V influenza la risposta clinica al trattamento con rituximab in pazienti affetti da malattie sistemiche autoimmuni.

Parole chiave: rituximab, FCGR3A F158V, malattie sistemiche autoimmuni, risposta alla terapia.

Riferimento bibliografico

[Robledo G](#) et al. *DNA Cell Biol* 2012, 31(12):1671-7.

DAL SINGOLO SNP AL LOCUS ESTESO (*WIDE-LOCUS*): STUDI DI ASSOCIAZIONE *GENOME-WIDE* PER L'IDENTIFICAZIONE DI GENI FUNZIONALMENTE CORRELATI E REGIONI INTRAGENICHE IN STUDI CON UN PICCOLO NUMERO DI CAMPIONI

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

Gli studi di associazione *genome-wide* (GWAS) non hanno ancora fornito i progressi scientifici e medici sperati all'inizio del loro sviluppo. Infatti, dopo successi iniziali in patologie in cui un singolo aplotipo

conferisce tutto o la maggior parte del rischio (per esempio degenerazione maculare), lo stesso approccio statistico ha spesso prodotto risultati ambigui se applicato nell'ambito di patologie complesse. Teoricamente, l'aumento del numero di campioni appare una soluzione per lo studio di patologie complesse mediante un approccio *genome-wide*, tuttavia il numero di campioni effettivamente necessario è stimato nell'ordine della decina di migliaia, soglia non praticabile per patologie e fenotipi rari; inoltre arruolare un tale numero di campioni aumenta molto la durata ed il costo della raccolta dei dati. Incrementare l'arruolamento mediante un allentamento dei criteri di inclusione determina in genere un aumento della varianza e conseguentemente la necessità di un campione ancora più grande, generando un circolo vizioso.

Diverse mutazioni all'interno di un gene possono contribuire al rischio di fenotipi complessi e diversi SNPs possono diventare associati con la stessa mutazione nel tempo. Il contributo di un fattore di rischio può dipendere dalla presenza di altri e combinazioni di mutazioni possono conferire un rischio maggiore se interessano entrambi i cromosomi (eterozigotità composta). Su queste basi, un approccio statistico basato su p-value ottenuti considerando uno SNP alla volta (ssGWAS), mal si adatta all'identificazione dei fenomeni di interazioni/epistasi a corto raggio coinvolti (con epistasi, sulla base di quanto definito da Fisher, si intende qualsiasi deviazione dall'indipendenza per gli effetti di SNP, regioni intrageniche o geni fisicamente vicini). Analizzare diplotipi (combinazioni di SNPs fisicamente vicini) in maniera completa sarebbe preferibile, tuttavia metodi tradizionali di analisi multivariata, fra cui anche la regressione lineare/logistica presuppongono l'indipendenza e l'addittività dei fattori di rischio, in modo da richiedere algoritmi semplici in termini computazionali. Presupposti non realistici, come la linearità, possono portare facilmente ad ignorare relazioni non lineari significative (falsi negativi). Ancora più importante è considerare che errori casuali, non soggetti a vincoli biologici, possono occasionalmente soddisfare questi presupposti, in modo che dei risultati molto significativi possano essere in realtà dei falsi positivi.

Gli studi di associazione GWAS, in generale, possono essere considerati delle procedure di selezione esplorativa, per generare piuttosto che confermare delle ipotesi: i p-value servono semplicemente per classificare i candidati, affinché una selezione sufficientemente grande di geni possa includere con alta probabilità quelli più interessanti. Anche piccole differenze nella composizione della popolazione in esame possono risultare nella selezione di sottogruppi diversi di geni e ognuno di questi potrebbe essere utile per la comprensione di un diverso aspetto del fenotipo complesso in esame, se confermato utilizzando studi clinici o adeguati modelli sperimentali. Quindi, la sfida nel miglioramento dei GWAS consiste nella riduzione di artefatti causati dall'applicazione di approcci troppo semplicistici a fenotipi complessi (per esempio, l'analisi di uno SNP alla volta, presuppone l'indipendenza e l'addittività degli effetti).

Con il progredire dei sistemi informatici calcoli più complessi (per esempio, analisi fattoriale o ricampionamento) diventano realizzabili. La computazione parallela massiva ha reso realizzabili GWAS *wide-locus* basati su un approccio non parametrico (μ GWAS). Inoltre è noto che diversi "tag set" di SNPs geneticamente indistinguibili sono tipicamente distribuiti in maniera casuale lungo un blocco di linkage disequilibrium (LD). Tuttavia metodi tradizionali non possono distinguere fra i diplotipi "permutati" contenenti membri dello stesso "tag set", solo in un ordine diverso; invece, studi μ GWAS, sulla base della struttura spaziale degli SNP in un diplotipo e sulla LD attesa in riferimento alla mappa di aplotipi (HapMap) migliorano la risoluzione dei GWAS anche nelle regioni intrageniche. Per ridurre la probabilità di incorrere in artefatti, viene applicato anche il concetto di "contenuto informativo di dati multivariati" (μ IC) in diversi passaggi durante l'analisi. Con questi avanzamenti metodologici, i geni o le regioni intrageniche rilevanti per la variabilità di un fenotipo complesso, come la risposta ad un farmaco, possono essere individuati da un singolo studio, che consideri poche centinaia di casi ben caratterizzati, trasformando potenzialmente i GWAS da tecnica per individuare determinanti genetici isolati, in uno strumento utile per generare ipotesi plausibili e testabili sull'eziologia di fenotipi complessi.

Per eseguire un'analisi μ GWAS, i diplotipi sono stati trattati come dati multivariati, il che permette di evitare presupposizioni sull'indipendenza e l'importanza relativa degli SNPs: questo approccio non è stato sviluppato fino ad oggi a causa delle sue esigenze computazionali, proibitivamente elevate; l'impiego massivo di calcolatori in parallelo, ha permesso agli autori del presente studio di includere diplotipi comprendenti fino a 6 SNPs. Tradizionalmente, il risultato significativo di un singolo locus genico è più affidabile se anche loci prossimali dimostrano la stessa associazione: per questo motivo, l'approccio μ GWAS proposto considera che loci vicini dovrebbero avere effetti simili e che un locus significativo dovrebbe essere in LD con entrambi gli SNPs adiacenti, a meno che non sia presente, fra gli SNPs, un *hotspot* di ricombinazione (che segnano il confine tra i blocchi di LD). Questo approccio innovativo consente

di distinguere i diplotipi permutati, in cui cioè gli stessi SNPs compaiono in ordine differente, aumentando la potenza statistica rispetto ad approcci che combinano tutti gli SNPs di un diplotipo con un unico passaggio; inoltre non necessita della formulazione di presupposti sulla dipendenza e l'importanza relativa richiesti dall'uso di approcci basati sulla combinazione lineare (somme pesate). Un approccio comparabile è quello attuabile mediante l'uso di GWAS basati sulla regressione logistica (lrGWAS), che prevede l'aggiunta sequenziale di termini d'interazione. Per questo motivo, gli autori hanno confrontato μ GWAS non solo con ssGWAS, per effetti lineari, dominanti e recessivi, ma anche con approcci di regressione logistica *step-wise*, per valutare l'epistasi.

Lo studio ha considerato 185 pazienti pediatrici con epilessia da assenze ("piccolo male"), al fine di fare luce sui fattori di rischio genetici, in modo da individuare determinanti utili ad un'assegnazione più razionale delle terapie farmacologiche disponibili e di identificare nuovi bersagli farmacologici per i pazienti che non rispondono alle terapie attuali. I pazienti erano in prevalenza di etnia caucasica (83%) oppure ispanica (10%) con la tipica preponderanza femminile (115 femmine vs 70 maschi) caratteristica di questa patologia. L'età di insorgenza media della malattia era pari a 5,7 anni. I pazienti hanno tutti risposto alla terapia anti-epilettica. I controlli sono stati selezionati da un database disponibile pubblicamente (iControl di Illumina). Queste analisi hanno rilevato che, con un approccio ssGWAS, come atteso per una coorte con un numero limitato di pazienti, solo due SNPs hanno raggiunto un livello di significatività plausibile ($-\log_{10} p = 7.5$) all'analisi univariata. L'approccio lrGWAS, che ha considerato termini di interazione sequenziali, ha prodotto un'abbondanza di risultati significativi, di cui probabilmente molti sono falsi positivi. I metodi sono stati confrontati considerando i geni classificati entro i primi 6, ~20 e ~40 da ciascuna analisi. Solo uno dei primi 6 geni secondo i risultati lrGWAS viene classificato prima della posizione 73 dall'approccio μ GWAS. Quattro dei primi 6 risultati secondo l'approccio μ GWAS sono classificati entro i primi 22 dell'lrGWAS. Fra i primi 17 geni classificati secondo l'approccio μ GWAS (tutti inferiori ad una soglia di significatività pari a $-\log_{10} p = 7,5$), 14 (82%) sono noti per essere direttamente associati al *pathway* NOD/signaling di guida assonale/atassina, in confronto a 8 geni (36%) dei primi 22 classificati secondo l'approccio lrGWAS (soglia di significatività pari a $-\log_{10} p = 8$).

In conclusione, i risultati descritti dimostrano che fattori di rischio genetici per fenotipi complessi, come la risposta ai farmaci, non possono essere studiati in maniera adeguata solamente con un approccio ssGWAS e che l'approccio semplice dal punto di vista computazionale dei lrGWAS può essere poco sensibile per caratterizzare situazioni complesse di epistasi. Ridurre gli artefatti, evitando l'uso di modelli motivati da convenienza computazionale, invece che dalla plausibilità biologica, riduce il bisogno di studi indipendenti di validazione per tutelarsi dal rischio di falsi positivi dovuti a supposizioni errate fatte dal modello statistico impiegato. L'incorporazione nell'analisi di informazioni sulla relazione fra gli SNPs eseguita dall'approccio μ GWAS permette di identificare gruppi di geni effettivamente rilevanti in fenomeni biologici complessi e di ottenere informazioni specifiche sulle regioni di questi geni più direttamente coinvolte nella determinazione della variabilità interindividuale. E' da tenere presente che il controllo di fattori confondenti a livello genetico ed ambientale durante la selezione dei casi e controlli appropriati per uno studio genetico di un fenotipo complesso appare essenziale per identificare rilevanti fattori predittivi. Questo obiettivo è molto più facile da raggiungere arruolando poche centinaia di pazienti, piuttosto che diverse migliaia da abbinare in maniera adeguata in un disegno caso - controllo. La possibilità quindi di eseguire analisi statistiche adeguatamente disegnate, in modo da arruolare un numero più piccolo di campioni, offre quest'ulteriore vantaggio nell'ottica di individuare determinanti genetici effettivamente utili a stabilire strategie di terapia personalizzata.

L'applicazione di un approccio non parametrico ad analisi *genome-wide* di fenotipi complessi permette di evitare presupposti non plausibili biologicamente, aumentando la probabilità di individuare associazioni reali anche in popolazioni relativamente piccole di pazienti.

Parole chiave: malattia comune, epilessia, epistasi, studio di associazione *genome-wide*, statistica non parametrica

Riferimento bibliografico

[Wittkowski K](#) et al, *Pharmacogenomics* 2013, 14(4):391-401.

FATTORI PROGNOSTICI PER IL TRATTAMENTO DEL CANCRO AL PANCREAS CON REGIME DI POLICHEMIOTERAPIA A BASE DI GEMCITABINA-CISPLATINO: RIVALUTAZIONE DEL POLIMORFISMO LYS751GLN NEL GENE DELLA RIPARAZIONE XPD

A cura delle Dott.sse Sabrina Angelini e Gloria Ravegnini

L'impiego di agenti a base di platino, in regimi chemioterapici combinati, nel trattamento dell'adenocarcinoma duttale pancreatico avanzato (PDCA) è piuttosto controverso. Da un lato soffre della mancanza di un impatto significativo sull'*outcome*, dall'altro si associa ad un aumento sostanziale della tossicità sia a livello ematologico che extra-ematologico. Questo rende di fondamentale importanza l'identificazione di biomarcatori farmacogenetici, che permetta l'identificazione di quei pazienti che potrebbero beneficiare maggiormente da questi schemi terapeutici. In uno studio condotto su 122 pazienti affetti da PDCA, trattati con cisplatino-capecitabina-gemcitabina e docetaxel o epirubicina, è emerso un ruolo significativo dello SNPs Lys751Gln nel gene della riparazione XPD, come fattore predittivo indipendente di morte e rischio di progressione. Questo nuovo studio si è proposto di confermare il valore prognostico di questo polimorfismo in un nuovo gruppo di 215 pazienti (125 trattati con regimi a base di cisplatino-gemcitabina; 90 in monoterapia con gemcitabina).

Dall'analisi è emerso che nei 125 pazienti trattati con regimi terapeutici a base di cisplatino-gemcitabina in presenza di almeno un allele Lys751 l'*overall survival* mediano è di 12.0 mesi contro i 7.0 mesi dei pazienti in omozigosi per l'allele Gln751 (95% CI 10.1-13.9 vs 95% CI 4.3-9.7; Log-rank- $P = 0.01$, Wilcoxon- $P = 0.01$). L'analisi sui complessivi 247 pazienti (122 pazienti dello studio precedente e 125 di questo studio) conferma l'impatto significativo della presenza di almeno un allele Lys751 sull'*overall survival* (Log-rank- $P < 0.01$, Wilcoxon- $P < 0.01$). Analogamente, la sopravvivenza libera da progressione (PFS) mediana nei pazienti in omozigosi per l'allele Gln751 è significativamente minore rispetto quella dei pazienti che presentano almeno un allele Lys751 (Log-rank- $P < 0.01$, Wilcoxon- $P = 0.01$). In particolare nessuno dei pazienti Gln751Gln è sopravvissuto per più di 22 mesi, mentre i 10 pazienti con almeno un allele Lys751 sono sopravvissuti per più di 35 mesi, e 7 di questi pazienti non sono andati in progressione a questo tempo. L'analisi multivariata di Cox che ha incluso, oltre al genotipo XPD, fattori prognostici come sesso, *Performance status* e stadio della patologia, ha confermato il significato prognostico del genotipo XPD. In particolare, l'omozigosi Gln751 è risultata significativamente associata al rischio di morte (HR = 2.1, 95% CI, 1.4-3.3, $P < 0,01$) e il rischio di progressione (HR = 1.9, 95% CI, 1.3-2.9, $P < 0,01$). Nessuna correlazione è stata osservata nei pazienti in monoterapia con gemcitabina.

In questo studio è anche stata effettuata un'analisi *in vitro* del danno al DNA mediante *extra-long PCR (XL-PCR)* in linfociti di volontari sani trattati con gemcitabina o cisplatino. La capacità di riparazione del danno indotto al DNA è stata valutata sulla base della riduzione di amplificazione mediante PCR di una sequenza target (β globina), e quantificata mediante TaqMan assay, nei campioni trattati normalizzati ai controlli non trattati. L'analisi ha evidenziato che l'omozigosi per Lys751 conferisce resistenza al danno indotto dal trattamento con cisplatino, infatti si osserva una amplificazione significativamente maggiore rispetto alle cellule con genotipo Lys751 omozigote ($P < 0.01$) o genotipo eterozigote ($P = 0.03$). Questi risultati suggeriscono la possibilità di una ridotta attività antitumorale del cisplatino in presenza del genotipo Gln751Gln. Tale effetto, inoltre, è ulteriormente rafforzato dalla combinazione cisplatino-gemcitabina (Gln751Gln: vs Lys751Gln $P < 0.01$ e vs Lys751Lys $P < 0.001$).

In conclusione, questo studio ha evidenziato che un sottogruppo di pazienti affetti PDCA che presentano almeno un allele Lys751 possono chiaramente beneficiare in termini di *overall survival*, PFS e rischio di morte, da regimi chemioterapici gemcitabina-cisplatino.

La presenza di un polimorfismo può essere valutata con un semplice esame del sangue, e offre uno strumento innovativo, e non invasivo, per ottimizzare la chemioterapia palliativa nei tumori pancreatici avanzati. Per la validazione di questo risultato sono necessari studi prospettici che consentano di confermare il ruolo di questo polimorfismo come nuovo biomarcatore da applicare nella pratica clinica per l'ottimizzazione e l'individualizzazione dei trattamenti attualmente disponibili nel cancro del pancreas.

Parole chiave: adenocarcinoma duttale pancreatico avanzato, regimi chemioterapici a base di gemcitabina-cisplatino, XPD

Riferimento bibliografico

[Avan A](#) et al, *Int J Cancer* 2013 Feb 7 [Epub ahead of print].

LA RIPETIZIONE CA NELL' INTRONE 1 DI EGFR È CORRELATA CON RICORRENZA E SOPRAVVIVENZA NEL CANCRO ESOFAGEO TRATTATO ESCLUSIVAMENTE IN MODO CHIRURGICO

A cura della Dott.ssa Gloria Ravegnini

Nonostante i trattamenti multimodali, il tasso di ricorrenza del cancro esofageo (EC) rimane tutt'oggi estremamente elevato, con una sopravvivenza a 5 anni raggiunta in solo il 25% dei casi. In presenza di tumore esofageo operabile, la resezione chirurgica rimane la terapia d'elezione; ciò nonostante, non è ancora possibile predire il decorso clinico di tali pazienti a causa della mancanza di mezzi efficaci. Un approccio per migliorare la scarsa prognosi include sicuramente l'introduzione di terapie dirette contro specifici target: la caratterizzazione molecolare del tumore primario ha rivelato un'elevata espressione di EGFR (*epidermal growth factor receptor*) nell' adenocarcinoma (AC) e nel carcinoma a cellule squamose (SCC) dell'esofago. Diverse sono le terapie anti-EGFR, ma solo un numero limitato di queste è stato valutato in pazienti facenti parti di studi con piccole popolazioni in stadio avanzato; il tasso di risposta è risultato essere variabile tra il 10 e il 90%- tuttavia sono necessari ulteriori parametri che possano delineare il successo clinico del trattamento.

La trascrizione del gene EGFR dipende da due elementi *enhancer*; di questi, uno è situato nell' introne 1 adiacente ad una ripetizione della sequenza CA (CA-SSR-1, *simple sequence repeat polymorphism*). Diversi studi hanno riportato una correlazione inversa tra la lunghezza di CA-SSR-1 e l'espressione di EGFR (Packeisen J et al, *J Clin Pathol* 2005, 58(10): 1101-3; Gebhardt F et al, *Histol Histopathol* 2000, 15(3):929-36; Suzuki M et al, *J Surg Oncol* 2008, 98(6):457-61).

Nel tumore dell'esofago, l'elevata espressione di EGFR è stata associata ad uno scarso *outcome* (Ferry DR et al, *Clin Cancer Res* 2007, 13(19):5869-75; Gibault L et al, *Br J Cancer* 2005, 93(1):107-15; Wang KL et al, *Cancer* 2007, 109(4):658-67), ma nessuno studio, fino ad oggi, aveva analizzato il ruolo di CA-SSR-1 in EC.

Lo scopo di questo studio è stato proprio quello di valutare la suddetta ripetizione CA-SSR-1 in una popolazione omogenea di pazienti affetti da tumore all'esofago trattati chirurgicamente ma non con trattamenti neo-adiuvanti o adiuvanti; i risultati sono stati quindi correlati con i parametri clinico-patologici, presenza di cellule tumorali nel midollo osseo (DTC) (come indicatore di micro-metastasi), e *outcome* clinico.

L'analisi ha coinvolto un totale di 241 pazienti; mediante amplificazione e sequenziamento del DNA, i genotipi sono stati suddivisi in *short* (S, alleli con un numero di ripetizioni CA $< o = a$ 18) o *long* (L, alleli con un numero di ripetizioni CA $>$ di 18) ed in base alle combinazioni alleliche, i genotipi possibili sono stati definiti SS, LL o SL.

L'età media della popolazione in studio era di 62.8 anni (range=34.5-85.1) ed il 79.7% erano maschi; 123 pazienti (51%) avevano adenocarcinoma istologicamente provato e 118 (49%) SCC; nessuno aveva ricevuto chemioterapia neo-adiuvante, adiuvante o radio-chemioterapia. Il 70% dei pazienti è stato valutato per DTC, rinvenute successivamente nel 29.9% dei soggetti. Dal punto di vista della ripetizione polimorfica CA, 57 pazienti avevano il genotipo LL (23,7%), 116 pazienti avevano il genotipo SL (48.1%), e 68 pazienti il genotipo SS (28.2%).

I tre genotipi sono stati correlati con i parametri clinico-patologici: dimensione tumorale, presenza di metastasi nodali, DTC, e tasso di ricorrenza tumorale sono risultati fortemente associati con CA-SSR-1. I pazienti LL avevano tumori più piccoli, mancanza di metastasi linfonodali e DTC. Inoltre il tasso di ricaduta in tali pazienti era significativamente più basso se comparato con quello di pazienti SL e SS.

14 pazienti sono morti durante o subito successivamente alla resezione chirurgica e sono stati pertanto esclusi dalle analisi della sopravvivenza.

Il tempo di *follow-up* medio è stato di 17.5 mesi (range=2.3-6.0). Durante il periodo di osservazione, 156 pazienti (64.7%) sono andati incontro a ricaduta e 193 (80.1%) sono morti. Il genotipo per CA-SSR-1 si è rivelato avere un impatto significativo su DFS e OS. Le analisi di Kaplan-Meier hanno dimostrato un distinto decremento di DFS e OS tra pazienti LL, SL e SS. Per esaminare ulteriormente l'impatto di CA-SSR-1 sull'*outcome* clinico, la popolazione è stata stratificata secondo istologia e stato nodale. In tutti i sottogruppi stratificati, i pazienti con genotipo LL hanno mostrato rimarcabilmente una migliore OS e DFS.

Per valutare il valore prognostico di CA-SSR-1, è stata effettuata un'analisi multivariata di Cox rispetto età, sesso, dimensione tumorale, presenza di metastasi distali e regionali rispetto ai linfonodi, differenziazione tumorale, tipo cellulare e CA-SSR-1. In entrambi i tipi di tumore esofageo, SCC e AC, CA-SSR-1 è risultato essere un forte fattore prognostico di ricorrenza tumorale e OS con un aumento di rischio tra pazienti LL, SL e SS; in particolare per SCC: HR = 2.5, 95% CI = 1.3-4.8, P = 0.005 - HR = 3.5, 95% CI = 2.1-6, P<0.0001, rispettivamente per ricorrenza tumorale ed OS e per AC: HR = 2.7, 95% CI = 1.7-4.3, P<0.0001- HR = 1.7, 95% CI = 1.2-2.8, P = 0.01, rispettivamente per ricorrenza tumorale ed OS .

In conclusione, questo studio ha indicato un possibile ruolo come marker biologico per CA-SSR-1 per ricorrenza tumorale e sopravvivenza, in pazienti affetti da cancro esofageo trattati esclusivamente in modo chirurgico.

Parole chiave: tumore esofageo, trattamento chirurgico, EGFR

Riferimento bibliografico

[Vashist YK](#) et al, *Target Oncol* 2013 Feb 2 [Epub ahead of print].

LE VARIANTI GENICHE DELLA PROTEINA IMPLICATA NELLA RESISTENZA AI FARMACI (ABCC1/MRP1) PREDICONO LA TOSSICITÀ EMATOLOGICA IN PAZIENTI CON TUMORE DELLA MAMMELLA CHE RICEVONO UNA CHEMIOTERAPIA ADIUVANTE CON 5-FLUOROURACILE, EPIRUBICINA E CICLOFOSFAMIDE (FEC)

A cura delle Dott.sse Marzia Del Re e Irene Del Re

Lo schema chemioterapico a base di 5-fluorouracile, epirubicina e ciclofosfamide (FEC) viene molto spesso utilizzato in alcuni istotipi di tumore della mammella. Nonostante il suo ampio utilizzo, molte pazienti sviluppano frequentemente reazioni di tossicità, la più importante tra tutte è l'insufficienza midollare che, se seguita da infezioni o emorragie, può mettere le pazienti in pericolo di vita, oltre alla necessità di ridurre o sospendere la terapia con le conseguenti ricadute sull'andamento della malattia. Data l'importanza e la frequenza di queste tossicità, sono stati esaminati vari fattori che possano predire la risposta delle pazienti al trattamento o lo sviluppo di tossicità, ma tutti hanno dato risultati troppo deboli per poter avere un'implicazione clinica. Lo scopo di questo studio è stato quello di analizzare un ampio gruppo di polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) in geni implicati nel metabolismo dei farmaci, in pazienti con tumore della mammella sottoposte a chemioterapia con FEC, in modo da poter mettere in relazione lo sviluppo di tossicità grave, sia a breve che a lungo termine, con il trattamento.

In questo studio sono state reclutate 1.012 pazienti con tumore della mammella, trattate, tra il 2000 e il 2010, con 3/6 cicli di FEC neoadiuvante ed adiuvante, che avevano manifestato una qualunque tossicità di grado WHO 3-4. Lo scopo primario è stato valutare la relazione tra SNPs e neutropenia febbrile (NF) ad ogni ciclo; lo scopo secondario è stato quello di valutare invece la correlazione tra lo SNP selezionato e NF al primo ciclo, neutropenia prolungata di grado 4 (<100/microl), anemia di grado 3-4, trombocitopenia di grado 3-4 e tossicità non ematologiche di grado 3-4.

Delle 1.012 pazienti trattate con FEC, 550 hanno ricevuto tre cicli di FEC (54,3%), 24 (2,4%) quattro cicli, 1 (0,1%) cinque cicli e 437 (43,2%) sei cicli. La NF si è verificata in 172 pazienti (17%), in 107 delle quali (10,6%) durante il primo ciclo. Neutropenia prolungata di grado 4 o profonda (<100/ μ l), anemia di grado 3-4, trombocitopenia di grado 3-4 e tossicità non ematologica di grado 3-4 sono state osservate rispettivamente

in 352 (34,8%), 26 (2,6%), 7 (0,7%) e 39 (3,9%) pazienti. I geni presi in esame nello studio sono stati i seguenti: *multidrug resistance protein 1* (ABCB1/MDR1); *multidrug resistance protein 2* (ABCC2/MRP2); diidropirimidina deidrogenasi (DPD); metilen-tetraidrofolato reduttasi NADPH (MTHFR); uridina-glucuronil-transferasi 2B7 (UGT2B7); citocromo P450 isoforma 2B6 (CYP2B6); citocromo P450 isoforma 3A4 (CYP3A4); glutazione perossidasi 4 (GPX4); glutazione S-transferasi alfa 1 (GSTA1); glutazione S-transferasi pi 1 (GSTP1); recettore 4 del fattore di crescita dei fibroblasti (FGFR4); chinone ossidoreduttasi 1 (NQO1); manganese superossido dismutasi-2 (SOD2); timidilato sintetasi (TS); i geni implicati nella riparazione al DNA XRCC1, XPD ed ERCC2.

Dei 50 SNPs esaminati solo alcuni correlavano con lo sviluppo di NF: tre polimorfismi dei trasportatori ABCC1/MRP1 sia in eterozigosi che in omozigosi mutanti (rs4148350, rs45511401, rs246221), un polimorfismo di UGT2B7 eterozigote per il polimorfismo rs7668282, ed un polimorfismo di FGFR4 in omozigosi mutato per lo SNP rs361855). Per quanto riguarda invece l'analisi degli obiettivi secondari è stata trovata una correlazione con il polimorfismo del trasportatore ABCB1/MRP1 rs4148350 sia in eterozigosi che in omozigosi mutato con lo sviluppo di neutropenia prolungata o di grado 4. Inoltre gli SNPs di MTHFR rs1801131 e di FGFR4 rs351855 sono stati associati sia in eterozigosi che in omozigosi per l'allele mutato a tossicità non ematologica.

In questo studio sono stati identificati tre SNPs dei trasportatori ABCC1/MRP1: rs246221, rs4148350 e rs45511201 associati a rischio di aumento di tossicità ematologica durante il trattamento con FEC. In particolare, le varianti in eterozigosi ed in omozigosi per l'allele mutato del polimorfismo rs246221 e l'omozigote mutato del polimorfismo rs4148350, sono state associate con sviluppo di NF di grado 4. Infine è stata trovata una correlazione moderata tra sviluppo di neutropenia di grado 4 o prolungata e la condizione di eterozigosi ed omozigosi dello SNP rs7668282 di UGT2B7, enzima implicato nel metabolismo inattivante dell'epirubicina.

Nello studio di C. Vulsteke et al. (2013) sono stati analizzati numerosi SNPs collocati in diversi geni implicati nel metabolismo attivante ed inattivante e nel trasporto dei farmaci 5-fluorouracile, epirubicina, ciclofosfamide, mettendo in evidenza come alcuni polimorfismi, in particolare nei trasportatori ABCB1/MRP1 siano coinvolti nello sviluppo di tossicità ematologica in seguito a trattamento con FEC. Pertanto, potrebbe essere interessante analizzare i suddetti trasportatori come screening pre-trattamento in tutte quelle pazienti per le quali è indicata una chemioterapia con 5-fluorouracile, epirubicina e ciclofosfamide al fine di prevenire o ridurre eventuali tossicità ematologiche.

Parole chiave: polimorfismi, FEC, tossicità, tumore della mammella

Riferimento bibliografico

[Vulsteke C](#) et al. *Ann Oncol* 2013 Feb 7 [Epub ahead of print].

APPROFONDIMENTO DEL RUOLO DELL'APLOTIPO UGT1A NELLA TOSSICITÀ EMATOLOGICA IN PAZIENTI AFFETTI DA CANCRO COLON RETTALE TRATTATI CON IL REGIME TERAPEUTICO 5-FLUOROURACILE/IRINOTECAN (FOLFIRI)

A cura della Dott.ssa Eleonora Turrini

L'irinotecan, inibitore della topoisomerasi I, è l'agente citotossico standard utilizzato nel trattamento di pazienti affetti da cancro al colon metastatizzato in stadio avanzato. Nonostante la sua efficacia clinica, l'irinotecan ha due principali tossicità che sono diarrea e neutropenia, che si manifestano con una severità difficilmente prevedibile e che ne condizionano la stretta finestra terapeutica. La variabilità interindividuale nella dose associata alla tossicità di irinotecan e nella risposta del tumore è stata principalmente attribuita alla variabilità genetica nel gene UGT1A1, che codifica per l'enzima UDP-glucosil transferasi, avente un ruolo chiave nel metabolismo di questo farmaco. Irinotecan è convertito *in vivo* nel metabolita più attivo 7-etil-10-idrossicamptotecina (SN-38) da una idrolisi mediata dalla carbossilasi. SN-38 è coniugato con l'acido glucuronico da UGT epatiche ed extraepatiche nella forma inattiva. Svartati studi hanno dimostrato che differenze nella capacità di glucuronidazione dell'irinotecan ne influenzano la tossicità. Molti studi

suggeriscono che pazienti omozigoti per UGT1A1*28 sono più soggetti a sviluppare una severa neutropenia dose-dipendente se confrontati ad individui con genotipo di riferimento (*1/*1). Osservazioni recenti suggeriscono come gli aplotipi combinati di UGT1A1 con UGT1A6, che ha attività catalitica verso SN-38, UGT1A7, coinvolto nel metabolismo extraepatico di irinotecan, e UGT1A9, coinvolto nella coniugazione extraepatica di SN-38, possano fornire informazioni più precise sulla farmacocinetica, farmacodinamica di irinotecan, sul tempo di progressione definito come l'intervallo tra l'inizio del trattamento FOLFIRI e la data della prima progressione della malattia opportunamente documentata o all'ultimo *follow-up*.

Nel presente studio una coorte di 167 pazienti canadesi affetti da cancro colonrettale metastatico trattati con il regime FOLFIRI è stato studiato in modo prospettico per le tossicità ematologiche e gastrointestinale (GI) in relazione ai principali polimorfismi del gene UGT1A. La prima serie di analisi ha riguardato varianti specifiche di UGT1A incluse UGT1A*28 ed i suoi aplotipi associati a severa neutropenia (Cecchin E, *J Clin Oncol* 2009, 27(15):2457-65) in una coorte di 250 pazienti italiani sempre trattati con FOLFIRI. È stata inoltre valutata l'influenza di un nuovo aplotipo associato all'assenza di neutropenia nei pazienti sia canadesi che italiani.

Lo studio coinvolge pazienti canadesi reclutati tra il 2003 e il 2012 in 3 strutture ospedaliere canadesi. I comitati etici hanno approvato il protocollo dello studio ed i pazienti firmato il consenso informato. I criteri di eleggibilità comprendono soggetti (18-90 anni) che hanno ricevuto per la prima volta irinotecan come chemioterapico con diagnosi di cancro al colon retto metastatico confermata da analisi istologica, aspettativa di vita di almeno 3 mesi ed un buono stato di performance (ECOG \leq 2). Alcuni pazienti sono stati trattati con regime terapeutico FOLFIRI modificato ricevendo irinotecan intravena (180mg/m²) per 2 h nel giorno 1 più un bolo di 5-fluorouracile (400 mg/m²) seguito da infusione continua di 5-fluorouracile (2.400 mg/m²) più leucovorin (200 mg/m²) fino a 46 h. Questo trattamento è ciclico e viene ripetuto ogni 2 settimane. 69 pazienti hanno ricevuto anche l'anticorpo monoclonale bevacizumab e altri 6 pazienti altri farmaci sperimentali o placebo. La tossicità è stata valutata sistematicamente e separatamente per neutropenia o tossicità GI.

Sono stati genotipizzati 21 polimorfismi nel gene UGT1A nella coorte dei 167 pazienti canadesi in relazione alle tossicità ematica e GI. Le frequenze alleliche osservate risultano in accordo con analisi di precedenti studi e tutti i polimorfismi in esame sono risultati in equilibrio di Hardy-Weinberg, ad eccezione di rs10929302 ($P = 0.01$). Gli autori hanno osservato che l'aplotipo HII, caratterizzato dalla presenza di alleli suscettibili incluso UGT1A1*28, è associato con un aumentato rischio di sviluppare neutropenia (OR=2.43; $P = 0.004$) risultato che si era confermato anche nello studio sui pazienti italiani. L'aggiunta del polimorfismo localizzato nella regione 3'-UTR di UGT1A descrive due aplotipi, chiamati HIIa ed HIIb. Mentre HIIb è indifferentemente distribuito tra pazienti che hanno sperimentato neutropenia oppure no, l'allele HIIa è associato alla protezione da severa neutropenia sia nella coorte di pazienti canadesi che in quella di pazienti italiani (OR=0.55; $P = 0.038$). Le analisi univariate mostrano che le varianti alleliche sono correlate a severa neutropenia ma non mostrano alcuna relazione con la tossicità GI. Una severa neutropenia è stata associata a numerose varianti con MAF>5% nel locus di UGT1A ($P<0.05$), incluse varianti funzionali che codificano per UGT1A6 e UGT1A7, 3 polimorfismi nella zona del promotore di UGT1A9 (c.-1212 (G/A), c.-688 (A/C), c.-440 (C/T), il comune allele del promotore UGT1A*28 (c.-54_-53 TA6/7) e la variante c.3156 (G/A), la maggior parte dei quali sono stati associati a una diminuzione dell'espressione o della funzionalità genica. L'allele UGT1A*28 è stato associato con un aumento di 1.84 volte del rischio di sviluppare neutropenia ($P = 0.045$). Anche gli alleli UGT1A6 c.181A e UGT1A7 c.208C sono risultati predittivi in modo significativo di neutropenia ($P = 0.045$ e 0.025 , rispettivamente). Dai risultati dell'analisi multivariata, nessun polimorfismo localizzato nel primo esone UGT1A10 nella sua regione promotrice inclusi gli alleli UGT1A1*28 e c.-3156A rimangono significativi nella coorte di pazienti canadesi. Comunque 3 *marker* situati nella regione centrale di UGT1A sono stati associati con un aumento di 2 volte nello sviluppare neutropenia di grado 3-4 e sono localizzati nella regione promotrice di UGT1A9 alla posizione -688, e nel primo esone sia di UGT1A7 che UGT1A6. In una seconda analisi degli aplotipi, questi tre polimorfismi sono stati associati con quello nella regione 3'UTR e rivelano un aplotipo protettivo HI ($P = 0.048$) e due aplotipi di rischio HII e HIII, caratterizzati rispettivamente dalla presenza di 2 o 3 alleli sfavorevoli ($P = 0.014$ e 0.030), rivelando un effetto dose dipendente. Questa combinazione non è stata testata nella coorte italiana a causa della mancanza dei dati relativi al genotipo -688 di UGT1A9.

Oltre al già noto UGT1A1*28, i polimorfismi del gene UGT1 A9/A7/A6 e della sua regione 3'UTR, sono associati a variazioni nella tossicità a livello ematico di irinotecan, e potrebbero essere considerati per migliorare la predittività dei test farmacogenetici.

Parole chiave: cancro colonrettale metastatico, irinotecan, polimorfismi di UGT1A

Riferimento bibliografico

[Lévesque E](#) et al. *J Pharmacol Exp Ther* 2013 Feb 5 [Epub ahead of print].

MARKER MOLECOLARI DEL *PATHWAY* GENETICO DEGLI ORMONI SESSUALI ASSOCIATI ALL'EFFICACIA DELLA TERAPIA DI DEPRIVAZIONE ANDROGENICA PER IL TRATTAMENTO DEL CANCRO DELLA PROSTATA

A cura del Dott. Vittorio Simeon

Il *pathway* del *signaling* degli ormoni sessuali gioca un ruolo importantissimo nello sviluppo del cancro della prostata. La terapia di deprivazione androgenica (ADT) è tutt'oggi il trattamento standard per il cancro avanzato della prostata, infatti, la maggioranza dei pazienti trattati con ADT mostra un miglioramento clinico. Sfortunatamente molti pazienti soffrono di ricadute della malattia sotto forme più aggressive e questo stadio è denominato "carcinoma prostatico resistente alla castrazione" (CRPC). Sono stati proposti numerosi meccanismi per spiegare lo sviluppo della CRPC. Il recettore degli androgeni (AR) è amplificato in un terzo dei casi, in più l'alterazione dei coattivatori trascrizionali e l'attivazione del *signaling* ormonale, o mutazioni a carico del recettore, possono far sì che il recettore sia in grado di rispondere anche a bassi livelli di androgeni. Inoltre, rilevazioni dirette di androgeni intraprostatici in pazienti con CRPC hanno mostrato che i livelli non sono significativamente ridotti se comparati con la prostata normale, indicando in questo modo che le cellule cancerose sono in grado di generare livelli significativi di ormoni attivi intracellulari per stimolare la propria crescita. Le varianti genetiche a carico dei geni del *pathway* degli ormoni sessuali sono state valutate come fattori di rischio a carico del cancro della prostata in numerosi studi di associazione, tuttavia pochi studi hanno valutato la loro associazione con la progressione e la sopravvivenza del cancro prostatico.

Nel presente studio pubblicato da Chia-Cheng Yu su *Plos One* è stato valutato il significato prognostico di varianti comuni nei geni del *pathway* degli ormoni sessuali rispetto alla progressione della patologia ed alla mortalità specifica per cancro della prostata (PCSM).

Lo studio è stato condotto in una coorte di 645 pazienti con cancro della prostata, reclutati tra il 1995 e il 2009 in tre diversi centri medici a Taiwan. Tutti i pazienti sono stati trattati con ADT (orchietomia o agonisti dell'ormone rilasciante l'ormone luteinizzante (LHRH), con o senza antiandrogeni) e seguiti prospetticamente per valutare l'efficacia di ADT. Sono state raccolte le caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti al baseline e durante il follow-up, così come per l'esito di trattamento: tempo alla progressione e PCSM. Il nadir dell'antigene prostatico specifico (PSA) è stato definito come il valore più basso di PSA raggiunto durante il trattamento ADT. Il tempo per il PSA nadir è stato definito come la durata del tempo necessario per raggiungere il livello più basso di PSA dopo l'inizio della terapia. La progressione della patologia è stata definita come l'aumento seriale del PSA in almeno due analisi (lontani tra loro almeno di una settimana) rispetto al PSA nadir. L'inizio del trattamento secondario ormonale dovuto all'aumento del PSA è stato considerato come evento di progressione. Dopo analisi della letteratura sono stati selezionati 18 polimorfismi in 12 geni del *pathway* degli androgeni e degli estrogeni associati funzionalmente al tumore della prostata. Il DNA è stato estratto da sangue periferico e la genotipizzazione è stata eseguita grazie all'utilizzo della piattaforma Sequenom iPLEX. La percentuale media di genotipi individuati è stata del 93% e ogni polimorfismo era all'equilibrio di Hardy-Weinberg. Data la difficoltà nello stabilire la funzione e il modello genetico ottimale per questi polimorfismi, i dati della genotipizzazione sono stati analizzati utilizzando una serie di modelli genetici (recessivo; dominante; additivo). Per valutare l'interconnessione dei polimorfismi e dei fattori prognostici noti, come età alla diagnosi, stadiazione clinica, Gleason score, PSA ad inizio terapia, PSA nadir, tempo al raggiungimento del PSA nadir e modalità di trattamento, è stata effettuata un'analisi multivariata utilizzando un modello di COX.

Lo stadio clinico, il Gleason score, il PSA nadir, il tempo al PSA nadir, e la modalità di trattamento era associati in modo significativo con il tempo di progressione e con PCSM ($p \leq 0.007$). Il PSA ad inizio terapia era associato con la sola PCSM. L'analisi dei genotipi selezionati, utilizzando un test di log-rank, ha evidenziato l'associazione di uno dei polimorfismi per il tempo di progressione e di due polimorfismi per PCSM.

Il polimorfismo a carico dell'AR caratterizzato per una variazione di lunghezza di una tripletta CAG (*AR-CAG*) era associato ($p=0.023$) al tempo di progressione ed era stato analizzato in quartili di lunghezza (<21, 21, 22-23, >23). Dopo aggiustamento per i fattori prognostici clinici noti, l'effetto di *AR-CAG* era attenuato nei confronti della progressione della malattia.

I polimorfismi rs12529 di *AKR1C3* e *AR-CAG* erano associati con PCSM ($p \leq 0.029$), ed anche dopo aggiustamento per i fattori prognostici noti continuavano ad essere dei predittori significativi di PCSM in pazienti in terapia con ADT ($p \leq 0.04$). È stato osservato un effetto combinato dei genotipi rispetto a PCSM, con un trend di aumento del rischio (hazard ratio - HRs) per PCSM all'aumentare del numero dei genotipi sfavorevoli (HR 2.24, 95% CI 1.20 – 4.18, p for trend = 0.011). In più, gli individui portatori di due di questi polimorfismi avevano un HR di 13.7 (95% CI 3.60 – 52.4, $p < 0.001$) per associazione con PCSM se comparati con gli individui non portatori di alcun genotipo. Inoltre, il genotipo combinato aveva un effetto particolarmente significativo su PCSM in pazienti con metastasi distanti (p for trend = 0.007; rispetto ai pazienti senza metastasi distanti), suggerendo che questi due polimorfismi possono essere dei predittori indipendenti di *outcome* clinico insieme ad altri fattori clinici noti in seguito a terapia ADT.

Numerosi studi hanno indicato che *AKR1C3* è overespresso nel cancro prostatico e la sua espressione aumenta con la progressione della patologia. Il polimorfismo rs12529 è in grado di alterare un motivo di *splicing* esonico che può causare effetti regolatori di *splicing* alternativo. Questo *splicing* alternativo potrebbe regolare la funzione del gene ed influenzare l'efficacia di ADT.

L'AR gioca un ruolo fondamentale nello sviluppo del cancro della prostata e nella sua progressione. Il dominio di attivazione trascrizionale N-terminale della proteina AR contiene una ripetizione CAG, altamente polimorfica in lunghezza che può modificare la funzione di transattivazione di AR, comportando un'overespressione del recettore.

Gli autori finiscono facendo notare che nonostante la maggior parte dei pazienti con cancro della prostata avrà una forma indolente di questa malattia, la forma aggressiva di cancro prostatico è ancora un'importante causa di morte. Nuovi biomarker per migliorare la classificazione tra cancro prostatico indolente e letale sono di grandissimo interesse. In questo studio sono stati evidenziati due polimorfismi nel gene *AKR1C3* e *AR* associati con PCSM. La coorte in studio è composta da soli pazienti di origini cinese e i risultati riportati qui sono limitati se lo scopo è quello di compararli con altre popolazioni. Saranno sicuramente necessari studi futuri per caratterizzare al meglio questi polimorfismi, anche in altre popolazioni, e per determinare l'iter di trasferimento di queste conoscenze alla pratica clinica.

Il polimorfismo *AR-CAG* è associato al tempo di progressione in pazienti con cancro della prostata in terapia di deprivazione androgenica.

I polimorfismi rs12529 di *AKR1C3* e *AR-CAG* sono associati alla mortalità specifica per cancro della prostata anche dopo analisi multivariata con altri fattori prognostici.

Parole chiave: cancro della prostata, terapia di deprivazione androgenica, recettore androgeni

Riferimento bibliografico

[Yu CC](#) et al. *PLoS One* 2013, 8(1):e54627.

GLI EFFETTI DELLE VARIANTI NEL PROMOTORE DI MATE1 E MATE2 SULLA FARMACOCINETICA E FARMACODINAMICA DELLA METFORMINA

A cura della Dott.ssa Virginia Paribello

La metformina è tra i farmaci di prima scelta nella terapia del diabete di tipo 2. Circa il 50% di una dose orale di metformina è assorbita nel sangue e distribuita rapidamente nei vari tessuti. La metformina viene

eliminata nelle urine come farmaco immodificato. La clearance renale della metformina è maggiore della velocità di filtrazione glomerulare, suggerendo un contributo significativo alla sua eliminazione da parte della secrezione tubulare. E' stata osservata una notevole variabilità interindividuale nella clearance renale di metformina in volontari sani (150-700 ml/min, Graham G.G. et al, *Clin Pharmacokinet* 2011, 50: 81-98) e ciò è in parte dovuto dovuto ad una predisposizione genetica (Yin O.Q. et al, *J Clin Pharmacol* 2006, 46: 157-63; Leabman M.K. et al. *Pharmacogenetics* 2003, 13:581-84). Alla variabilità interindividuale nella farmacocinetica della metformina si associa anche una variabilità nella risposta, con $\geq 30\%$ dei pazienti, trattati in monoterapia con metformina, classificati come *non responder* (Cook M.N. et al, *Diabet Med* 2007, 24: 350-58). L'assorbimento della metformina viene mediato da diversi trasportatori di cationi organici (OCT), in particolare OCT1 e OCT2, e trasportatori per l'estrusione di farmaci e tossine 1 e 2 (MATE1 e MATE2). MATE1 e OCT1 sono considerati trasportatori determinanti della risposta alla metformina, principalmente perché MATE1 è altamente espresso nel rene e fegato, con una minore espressione nel muscolo scheletrico e nel tessuto adiposo, mentre OCT1 è prevalentemente espresso nel fegato. Recentemente Choi J.H. et al. (*Clin Pharmacol Ther* 2011, 90: 674-84) hanno dimostrato che una comune variante nel promotore di MATE2 (g.-130G→A, rs12943590) aumenta l'attività luciferasica in vitro ed è associata ad una ridotta risposta alla metformina nei pazienti diabetici. Inoltre, un'altra variante nel promotore di MATE1 (g.-66T→C, rs2252281) riduce l'attività luciferasica in vitro ed è associata a ridotta espressione dei trascritti di MATE1 nel rene umano. Stocker SL et al., autori di questo studio, hanno ipotizzato che queste due varianti potessero essere determinanti per la clearance renale e la risposta antidiabetica alla metformina in volontari sani e in pazienti diabetici. Poiché le due varianti possono avere effetti opposti, sono state anche considerate le interazioni gene-gene in studi di associazione.

Dopo un periodo iniziale di 3 giorni di dieta controllata ricca di carboidrati (200-250g/die), volontari sani sono stati ammessi al General Clinical Research Center del General Hospital di San Francisco e vi sono rimasti per tutta la durata dello studio (72h). I volontari, sia maschi che femmine, sono stati reclutati in popolazioni etnicamente diverse (asiatici n=18, afro-americani n=33, e caucasici n=6). I partecipanti sono stati arruolati solo dopo aver fornito il consenso informato e sono stati inseriti nello studio i volontari con età ≥ 18 anni, dopo anamnesi familiare, esame fisico e di laboratorio (completo emocromo, elettroliti, azotemia, creatinina, albumina e enzimi epatici) e che non assumevano farmaci diversi dalle vitamine e/o contraccettivi orali. Sono stati esclusi i volontari con aumento degli enzimi epatici, anemia, elevate concentrazioni di creatinina o dopo test di gravidanza positivo. I pazienti diabetici, di origine caucasica o afro-americana, sono stati reclutati in uno studio multicentrico retrospettivo, come descritto da Choi J.H. et al. (*Clin Pharmacol Ther* 2011, 90: 674-84). I volontari sono stati trattati con 1000mg di metformina la sera della prima giornata di studio e con 850mg la seconda giornata studio. Pasti standardizzati sono stati forniti in entrambe le giornate di studio. Dopo la dose di metformina, i volontari sono stati invitati a bere 8 once di acqua ogni 2 ore per mantenere il flusso di urina e il pH. Per la determinazione delle concentrazioni plasmatiche di metformina sono stati raccolti campioni di sangue a 0, 0.5, 1, 2 e 11 h dalla somministrazione di metformina nel primo giorno e a 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.25, 2.5, 2.75, 3, 3.5, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 h nel secondo giorno. Per lo studio farmacodinamico della metformina (Glucosio/concentrazioni insulina) i campioni di sangue sono stati raccolti a 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 180 minuti dopo la somministrazione di glucosio. Un ulteriore campione di sangue è stato raccolto a 12 h dalla seconda dose di metformina per determinare la creatinina.

I volontari sono stati genotipizzati per MATE2 (g.-130G→A, rs12943590), OCT1 (R61C, rs12208357; G401S, rs34130495; 420del, rs72552763; G465R, rs34059508) e OCT2 (A270S, rs316019) utilizzando procedure standard TaqMan, mentre MATE1 (g.-66T→C, rs2252281) è stato genotipizzato mediante PCR seguita da sequenziamento della regione del promotore. Le varianti di OCT1 (R61C, G401S e G465R) sono state genotipizzate solo nella coorte diabetica. Tutti gli alleli erano in equilibrio di Hardy-Weinberg.

Il genotipo MATE1 (g.-66T→C) nei volontari non è risultato avere effetti significativi sulla farmacocinetica della metformina, anche dopo aggiustamento per clearance della creatinina. La farmacocinetica della metformina è rimasta simile anche dopo esclusione dei volontari portatori dei polimorfismi di OCT1 e/o OCT2. Le clearance renali e secretorie della metformina sono risultate più elevate (22% e 26%, rispettivamente) nei pazienti omozigoti per MATE1 di riferimento (n=32) e con la variante MATE2 (P < 0,05). Entrambi i genotipi di MATE sono risultati essere associati alla risposta della metformina. I volontari sani portatori della variante di MATE1 sono risultati avere un maggiore risposta alla metformina (P < 0,01),

mentre i portatori della variante di MATE2 sono risultati avere una risposta ridotta ($P < 0,05$). Coerentemente con questi risultati, i pazienti con diabete di tipo2 (N=145) portatori della variante di MATE1 hanno mostrato una risposta potenziata alla metformina. Questi risultati suggeriscono che le varianti nel promotore di MATE1 e MATE2 sono importanti determinanti della biodisponibilità e della risposta alla metformina nei volontari sani e nei pazienti diabetici. I dati dimostrano che, in assenza della variante nel promotore di MATE1, la variante nel promotore di MATE2 è associata ad aumento della clearance renale della metformina. Entrambe le varianti sono associate a effetti ipoglicemizzanti della metformina nei volontari sani e in pazienti diabetici, ma in direzioni opposte. Ad oggi, questo è il primo studio che dimostra che i polimorfismi nel promotore in MATE1 e MATE2 contribuiscono alla variazione della risposta e alla biodisponibilità di metformina sia nei volontari sani che in pazienti diabetici di tipo2. Il fatto che la variante nel promotore di MATE1 risulti influenzare la farmacodinamica, ma non la farmacocinetica della metformina sottolinea l'importanza del trasportatore nel tessuto specifico di distribuzione del farmaco. Questi risultati suggeriscono anche che la variante MATE1 ha un effetto notevole nei pazienti con diabete di tipo 2. Il paziente diabetico con HbA1c al basale di circa 8% in monoterapia con metformina (1000mg/die), con variante allelica MATE1 e OCT1 mostra una diminuzione ulteriore dell'HbA1c del 1,2%. L'entità di questo effetto ha un grande significato clinico, dal momento che, in media, la monoterapia con metformina diminuisce l'HbA1c del 1,12% entro il primo anno di terapia (Little R.R. et al, *J Diabetes* 2011, 3: 3–6; Hirst J.A. et al. *Farmer Diabetes Care* 2012, 35: 446–54 Se questi risultati saranno confermati in altre studi, la genotipizzazione per il polimorfismo di MATE1 potrebbe imporsi come metodo di base per la personalizzazione della terapia con metformina.

Le varianti genetiche nel promotore di MATE1(g.-66T→C, rs2252281) e MATE2(g.-130G→A, rs12943590) producono un effetto significativo sulla farmacocinetica e farmacodinamica della metformina in volontari sani e in pazienti diabetici.

Parole chiave: MATE1, MATE2, OCT1, metformina, SNPs

Riferimento bibliografico

[Stocker SL](#) et al, *Clin Pharmacol Ther* 2013, 93(2):186-94.



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 Sabrina Angelini (Università di Bologna) Dott.ssa Sarah Cargnin (Università del Piemonte Orientale) Dott.ssa Donatella Carretta (Università di Bologna) Dott.ssa Sara De Iudicibus (Università di Trieste) Dott.ssa Irene Del Re (Università di Pisa) 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) Prof.ssa Patrizia Romualdi (Università di Bologna) 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

DISCLAIMER – 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.