

**SIF - FARMACOGENETICA****Newsletter Numero 50 – Aprile 2013**

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

Sommario

- Associazione tra polimorfismi dei geni per il recettore della vitamina D e della megalina e cambi cognitivi seguiti nel tempo in una popolazione di americani adulti
- Farmacogenetica della psoriasi: l'HLA-Cw6, ma non la delezione LCE3B/3C né il polimorfismo del TNFAIP3, predispone alla risposta clinica al bloccante dell'IL12/23, ustekinumab
- Polimorfismi nel gene ABCB1 sono associati ad intossicazioni letali di soggetti positivi all'assunzione di venlafaxina, ma non di citalopram
- Varianti genetiche associate con l'efficacia e la tossicità nell'artrite reumatoide allo stadio iniziale: risultati dal trial per il trattamento aggressivo dell'artrite reumatoide precoce
- L'analisi combinata dei livelli circolanti di β -endorfine con polimorfismi nei geni OPRM1, CACNAD2 e ABCB1 rivela una possibile correlazione con la sensibilità agli oppiacei e gli effetti collaterali indotti dagli oppiacei
- Polimorfismi a singolo nucleotide associati con *outcome* nei carcinoma metastatici delle cellule renale trattati con sunitinib
- Un polimorfismo nel gene del recettore dell'ormone tiroideo è associato negli asmatici alla risposta ai broncodilatatori
- Profilo fenotipico delle varianti della DPD importanti per la sensibilità al 5-fluorouracile tramite analisi cellulare in Real Time e misurazione dell'attività enzimatica in vitro

ASSOCIAZIONE TRA POLIMORFISMI DEI GENI PER IL RECETTORE DELLA VITAMINA D E DELLA MEGALINA E CAMBI COGNITIVI SEGUITI NEL TEMPO IN UNA POPOLAZIONE DI AMERICANI ADULTI

A cura della Dott.ssa Valeria Conti

Studi recenti hanno evidenziato gli effetti della vitamina D (vit D) sul funzionamento del sistema nervoso, soprattutto in termini di neuroprotezione. Nell'uomo il deficit di vit D è stato correlato a disturbi dell'umore e delle capacità cognitive e, nei topi, problemi a carico del funzionamento del recettore per la Vitamina D (VDR) sono stati messi in relazione con comportamenti di tipo ansioso.

Nonostante tali evidenze, non esistono studi che hanno ricercato la possibile relazione del funzionamento della vit D e del suo recettore con le variazioni delle abilità cognitive nell'uomo.

Un'altra molecola che lega il VDR, nota come megalina o *Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 2* (LRP2) è espressa nelle cellule epiteliali incluse quelle del plesso coroideo e fa parte della famiglia dei recettori per le LDL. La megalina lega anche l'apolipoproteina E (ApoE) il cui genotipo è stato associato con il declino cognitivo e con forme di demenza come quella caratterizzante l'*Alzheimer Disease* (AD).

Nel plesso coroideo la megalina partecipa direttamente alla clearance della β -amiloide ed è coinvolta nel processo di neuroprotezione attraverso il legame con il fattore di crescita insulinico (IGF-1) e l'espressione della megalina è modulata dai livelli sierici di vit D. Nonostante sia plausibile un coinvolgimento tra megalina e patogenesi dell'AD, solo 2 studi hanno investigato l'eventuale relazione tra i polimorfismi della megalina e l'incidenza dell'AD.

Questo è il primo studio longitudinale che ricerca le associazioni tra gli SNPs del VDR e della megalina con i cambiamenti della funzione cognitiva in soggetti adulti americani.

Lo scopo di questo studio è determinare la possibile associazione tra 4 SNPs nel gene per il VDR e 3 nel gene per la megalina con le variazioni delle performance cognitive nel tempo.

Nei partecipanti allo studio è stata valutata la presenza e l'anno d'insorgenza di demenza attraverso 2 set di analisi e, per le valutazioni delle capacità cognitive, sono stati utilizzati 6 test standardizzati. In particolare, per valutare l'entità dei cambi cognitivi è stato utilizzato l'indice LARCC (*longitudinal annual rates of cognitive change*) considerando tutti i punti di score (predizione I) o i punti precedenti all'insorgenza di una demenza (predizione II). Inoltre sono stati determinati una classe di latenza, gli aplotipi ed è stata condotta un'analisi di regressione, OLS (*ordinary least squares*).

Uno screening genetico di tipo *genome-wide* è stato eseguito su 1231 campioni di sangue utilizzando la tecnica dell'Illumina. Per il gene VDR sono stati analizzati i seguenti polimorfismi: rs11568820 (CdX-2 (T/C)), rs1544410 (BsmI (G/A)), rs7975232 (ApaI (A/C)) e rs731236 (TaqI (G/A)) e, per la Megalina, rs3755166 (G/A); rs2075252 (C/T) e rs4668123 (C/T).

Da un numero iniziale di 3500 soggetti, che avevano partecipato al Baltimore Longitudinal Study of Aging (BLSA) con un'età compresa tra 17 e 97 anni, i soggetti eleggibili sulla base di numerosi criteri di esclusione, sono stati 2321. Alla fine, sono stati inclusi nello studio 702 soggetti bianchi non ispanici per i quali è stata ottenuta una caratterizzazione completa dal punto di vista antropometrico e genetico.

I numerosi risultati di questo studio si possono riassumere in questo modo: l'aplotipo Megalin₂ [rs3755166 (-)/rs2075252(TT)/rs4668123(T2)] è stato associato con un grado più avanzato di declino cognitivo tra gli uomini (in predizione II) per quanto attiene alla memoria verbale a breve termine rispetto all'aplotipo Megalin₁ ([rs3755166(-)/rs2075252(CC)/rs4668123(-)].

Differenze dipendenti dal sesso sono state riscontrate anche per l'aplotipo VDR₁ [BsmI (G-)/ApaI (C-)/TaqI(A-); baT] che, nelle donne, è stato correlato a un più importante grado di declino nella valutazione della scioltezza nel linguaggio (predizione I). L'aplotipo per la megalina (GCC) è stato messo in relazione con un più alto grado di disfunzione della memoria verbale a breve termine e dell'immediatezza del ricordo nelle donne, ma con un più lento declino per il ricordo ritardato negli uomini (predizione I e II). Inoltre, nelle donne, la combinazione megalin (ACC) è stata associata con un declino più lento nella scioltezza del linguaggio (predizione II). Un altro risultato è quello dell'aplotipo per la megalina (rs3755166:G/A) che è stato associato con un più importante declino nella capacità cognitiva globale in entrambi i sessi e nella memoria verbale a breve termine negli uomini.

Quattro studi recenti hanno esaminato i polimorfismi del VDR e della megalina come marcatori di rischio per il deficit cognitivo, o più specificamente, per l'AD. Considerando globalmente i risultati di questi studi il rischio suddetto è stato associato con vari SNPs e aplotipi sia del gene per la megalina, che per il VDR, ma i risultati, sebbene interessanti, rimangono incerti. Un punto di forza di questo studio è l'utilizzo di test multipli per valutare i cambi nel tempo delle capacità cognitive individuali. Le differenze legate al sesso che si sono evidenziate con gli aplotipi della megalina sono ascrivibili con l'interazione che questa proteina ha con gli

estrogeni e con la Vit D (entrambi fattori importanti nel determinare le performance di tipo cognitivo). Uno dei limiti di questo studio, sebbene ben strutturato, è la mancanza di informazioni adeguate sullo stile di vita (dieta, assimilazione di calcio e vitamina D) e su altri fattori di probabile confondimento come l'attività fisica e la somministrazione di farmaci.

Altri Studi potrebbero aiutare a chiarire l'eventuale associazione tra i polimorfismi considerati e l'incidenza di demenza, AD e declino cognitivo confrontando tra loro differenti popolazioni.

Variazioni sesso-specifiche nei geni codificanti per il recettore della vit D e della megalina, descritte in una popolazione di americani adulti, possono modificare il declino cognitivo dipendente dall'invecchiamento.

Parole chiave: recettore della vitamina D, megalina, declino cognitivo

Riferimento bibliografico

[Beydoun MA](#) et al. *Am J Clin Nutr* 2012, 95(1):163-78.

FARMACOGENETICA DELLA PSORIASI: L'HLACW6, MA NON LA DELEZIONE LCE3B/3C NÉ IL POLIMORFISMO DEL TNFAIP3, PREDISPONE ALLA RISPOSTA CLINICA AL BLOCCANTE DELL'IL12/23, USTEKINUMAB

A cura della Dott.ssa Lucia Gozzo

La psoriasi rappresenta una comune patologia cronica infiammatoria cutanea che colpisce circa il 2% della popolazione mondiale e può essere associata ad artrite psoriasica e ad un gran numero di patologie sistemiche. Le basi infiammatorie ed immunologiche di questa patologia sono state largamente descritte in letteratura (Griffiths et al, *Lancet* 2007, 370: 263–71; Lowes et al, *Nature* 2007, 445:866–73). I farmaci biologici rappresentano la terapia più avanzata ed hanno modificato la gestione della patologia. Comunque, alcuni studi clinici hanno mostrato che questi farmaci altamente selettivi non sono efficaci in tutti i pazienti e possono essere associati con importanti effetti avversi. Lo scopo della ricerca farmacogenetica è quello di identificare variazioni nel genoma che possano essere associate con la risposta clinica ad un particolare farmaco o con effetti avversi. L'interesse nella farmacogenetica della psoriasi è doppio: da un lato diverse forme cliniche di psoriasi non rispondono allo stesso trattamento, ed in pazienti con la stessa forma si hanno *responders* e *non-responders* ad un particolare farmaco. La variabilità nell'insorgenza di tossicità ai farmaci per la psoriasi è, inoltre, un altro campo promettente per l'applicazione della farmacogenetica. Anche se sono disponibili dati di farmacogenetica per molti agenti convenzionali usati nel trattamento della psoriasi, poco si sa sul legame tra farmacogenetica e farmaci biologici. Recentemente è stato scoperto che i portatori dell'allele *HLACw6*, il *marker* di suscettibilità genetica più importante, hanno una risposta significativamente maggiore all'efalizumab e che i pazienti *Cw6* negativi hanno una risposta maggiore, ma non statisticamente significativa, ai bloccanti del TNF α (Costanzo et al, *Advances in Psoriasis and Inflammatory Skin Diseases* 2011, 1(4):125-30). In uno studio recente, Tejasvi e collaboratori hanno riportato un'associazione tra la risposta ai farmaci anti-TNF α e due SNP (rs2230926 dell'esone 7 e rs610604 nell'introne 3) nel gene *TNFAIP3*, appartenente alla via del TNF α (Tejasvi et al, *J Invest Dermatol* 2012, 132:593-600). È stata trovata un'associazione significativa tra l'allele G dell'rs610604 ed una buona risposta a tutti gli anti-TNF ($p=0.050$).

È stato condotto uno studio retrospettivo per valutare il ruolo dell'*HLA-Cw6*, del polimorfismo rs610604 e della delezione del gene *Late Cornified Envelope 3B e 3C (LCE3B/3C)* come predittori della risposta clinica all'ustekinumab, bloccante dell'IL12/23.

Tra il gennaio 2011 ed il gennaio 2012 presso l'Unità di Dermatologia dell'Università Tor Vergata di Roma, sono stati reclutati 51 pazienti (37 uomini e 14 donne), con età tra 21 e 77 anni, affetti da psoriasi moderata-severa. Tutti i pazienti avevano ricevuto almeno una iniezione di ustekinumab. Il trattamento con ustekinumab

era stato iniziato in caso di non risposta o controindicazione ad almeno due trattamenti sistemici convenzionali e/o alla fototerapia. Trattamenti precedenti in 41 pazienti includevano anche terapie biologiche. L'ustekinumab è stato somministrato dopo un *washout* di tre mesi dagli altri biologici, alla dose di 45 o 90 mg in base al peso corporeo, alla settimana 0, 4 ed ogni 12 settimane in seguito. Il calcolo del PASI (*Psoriasis Area Severity Index*) è stato registrato alla settimana 4, 12, 28 e 40. Al momento dell'analisi, 51 pazienti erano alla settimana 4 e 16 di terapia; 49 pazienti hanno raggiunto la settimana 28 e 45 la settimana 40. Nessun paziente ha sospeso la terapia. L'*endpoint* primario era rappresentato dal numero di pazienti che raggiungevano una riduzione del 75% dello score PASI (PASI 75) dopo 12 settimane. Una riduzione del 90% dello score PASI (PASI 90) rappresentava l'*endpoint* secondario.

Sono stati genotipizzati 51 pazienti (37 uomini e 14 donne), trattati con ustekinumab, per la presenza dell'allele *HLA-Cw6*, per il polimorfismo rs610604 del *TNFAIP3* e per la delezione dei geni *LCE3B/3C*. La durata media della malattia era di 23.6 anni ed il PASI medio prima di iniziare il trattamento con ustekinumab era di 15.8. Ventotto pazienti erano *HLA-Cw6* positivi (*Cw6POS*) e 23 *HLA-Cw6* negativi (*Cw6NEG*). La stratificazione dei pazienti secondo la positività dell'*HLA-Cw6* ha confermato le osservazioni precedenti sul legame con una più precoce insorgenza della malattia (20.5 ± 10.6 anni nei pazienti *Cw6POS* vs 26.2 ± 13 anni nei pazienti *Cw6NEG*), ma non con un PASI basale più elevato (14.6 nei pazienti *Cw6NEG* e 14.3 nei pazienti *Cw6POS*). Questa differenza può essere dovuta all'alto numero di pazienti che sono passati dal trattamento con altri biologici alla terapia con ustekinumab, non raggiungendo il loro PASI basale prima di iniziare la nuova terapia. È interessante notare che nei pazienti omozigoti per l'allele T del *TNFAIP3* l'età d'insorgenza era significativamente più bassa rispetto agli omozigoti ed eterozigoti per l'allele G (18.6 vs 27.4 vs 23.8 anni). Per lo stesso sottogruppo di pazienti il PASI basale (18.2) era più elevato rispetto agli omozigoti ed eterozigoti per l'allele G (15.6 e 13.3 rispettivamente). I pazienti portatori di almeno un allele *LCE3B/3C* hanno mostrato un'età di insorgenza significativamente più alta rispetto ai pazienti con delezione in entrambi gli alleli, ma senza differenza significativa nel PASI basale. Quando è stata presa in considerazione la risposta al trattamento, è stata trovata una spiccata differenza nel tasso di risposta all'ustekinumab tra i pazienti *Cw6POS* ed i *Cw6NEG*, con una risposta migliore nei pazienti *Cw6POS*. È stato osservato che alla quarta settimana il PASI 50 è stato raggiunto dall'89.3% dei pazienti *Cw6POS* (25 su 28) e dal 60.9% dei pazienti *Cw6NEG* ($p=0.024$). Alla settimana 4, il PASI 75 era stato raggiunto nel 35.7% dei pazienti *Cw6POS* (10 su 28), e solo nel 4.3% dei pazienti *Cw6NEG* (1 su 23) ($p=0.022$). Dopo 12 settimane, il 96.4% dei pazienti *Cw6POS* (27 su 28) trattati con ustekinumab ed il 65.2% dei pazienti *Cw6NEG* (15 su 23) aveva raggiunto il PASI 75 ($p<0.008$, 95%), raggiunto dopo 28 settimane dal 96.3% dei pazienti *Cw6POS* (26 su 27) e dal 72.7% dei pazienti *Cw6NEG* (16 su 22) ($p=0.016$). Il PASI 75 è stato mantenuto da tutti i pazienti *Cw6POS* e dal 73.7% dei pazienti *Cw6NEG* alla settimana 40 ($p=0.014$). Inoltre, l'85.7% dei pazienti *Cw6POS* (24 su 28) ha raggiunto il PASI 90 alla settimana 12 ed il 92.3% alla settimana 40 (24 su 26), mentre solo il 56.5% (13 su 23) ed il 57.9% (11 su 19) dei pazienti *Cw6NEG* hanno raggiunto il PASI 90 rispettivamente alla settimana 12 e 40 ($p=0.02$ e $p=0.012$). La differenza nella risposta non era legata al valore di PASI basale, al precedente fallimento ad altri biologici o all'età di insorgenza della patologia. Non è stata osservata differenza nella risposta all'ustekinumab quando sono stati presi in considerazione i gruppi di pazienti con la delezione dei geni *LCE3B/3C* (PASI 75 alla settimana 12 eterozigoti vs omozigoti per la delezione $p=0.2$) e con l'SNP rs610604 del *TNFAIP3* (PASI 75 alla settimana 12 TT vs GG $p=0.75$).

L'ustekinumab è un anticorpo monoclonale che lega la subunità p40 dell'IL12 e dell'IL23 inibendo l'attività di entrambe le citochine, con il risultato di un'alterata maturazione delle cellule Th1 e Th17, sottotipi essenziali per la genesi delle placche psoriasiche e di conseguenza per loro risoluzione. L'*HLA-Cw6* rappresenta il più importante gene di suscettibilità ed è stato associato ad una migliore risposta clinica all'ustekinumab, con il raggiungimento del PASI 50 nel 90% dei pazienti alla quarta settimana, dopo una singola iniezione. Una possibile spiegazione è che l'*HLA-Cw6* identifichi un sottotipo molecolare di psoriasi altamente dipendente dalla via di segnalazione dell'IL12/23 per il mantenimento e l'autoamplificazione, e quindi più sensibile al blocco selettivo di questa via. Un'ipotesi interessante è che questo sottotipo di psoriasi venga stimolata da autoantigeni presentati dall'*HLA-Cw6* alle cellule CD8+ Tc17, abbondanti nell'epidermide dei pazienti con psoriasi ed

altamente dipendenti dall'IL23. La suscettibilità alla psoriasi è anche determinata da altri geni, coinvolti per esempio nella formazione della barriera cutanea e nella regolazione del segnale delle citochine infiammatorie. Due polimorfismi in uno di questi geni, il *TNFAIP3*, sono stati associati alla risposta clinica ai bloccanti del TNF α . Il gene in questione è un target trascrizionale del fattore di trascrizione NF κ B, comunemente attivato da diversi stimoli infiammatori e da citochine, inclusi il TNF α . In questo studio non è stata trovata associazione tra il polimorfismo rs610604 del *TNFAIP3* e la risposta all'ustekinumab, supportando il ruolo di questo gene nella regolazione della via di segnalazione del TNF α e non della via dell'IL12/23. È stata, inoltre, valutata la possibilità che la delezione dei geni *LCE3B/3C* potesse associarsi con la risposta all'ustekinumab. Questi geni sono coinvolti nella formazione della barriera cutanea e nella risposta dell'epidermide al trauma, regolando le prime fasi della risposta agli insulti esterni e l'attivazione del sistema dell'immunità innata. Non essendo stata trovata una correlazione significativa tra la delezione di questi geni e la risposta all'ustekinumab, è ulteriormente rafforzata l'ipotesi che l'attività di questo farmaco sia diretta in particolare contro la risposta adattativa del sistema immunitario piuttosto che contro l'immunità innata.

In conclusione, questo studio sottolinea l'importanza dell'*HLA-Cw6* non solo come gene di suscettibilità per la psoriasi, ma anche come *marker* farmacogenetico di risposta all'ustekinumab. È stato osservato che l'allele *HLA-Cw6* è associato ad una più veloce e ampia risposta clinica a questo farmaco, mentre nessuna differenza significativa è stata osservata per la delezione *LCEB3/C3* ed il polimorfismo *TNFAIP3*.

Limite dello studio è rappresentato dal numero esiguo di pazienti, per lo più già trattati con anti-TNF, e la valutazione di un singolo gene.

Parole chiave: psoriasi, ustekinumab, *HLACw6*, *TNFAIP3*, *LCEB3/C3*

Riferimento bibliografico

[Talamonti M](#) et al. *Br J Dermatol* 2013 Mar 23 [Epub ahead of print].

POLIMORFISMI NEL GENE ABCB1 SONO ASSOCIATI AD INTOSSICAZIONI LETALI DI SOGGETTI POSITIVI ALL'ASSUNZIONE DI VENLAFAXINA, MA NON DI CITALOPRAM

A cura della Dott.ssa Eleonora Turrini

I test genetici *post mortem* sono in grado di fornire utili informazioni sull'interpretazione dei risultati di tossicologia forense e le ricerche in questo ambito si sono fino ad ora focalizzate in particolar modo sui polimorfismi del citocromo P450. Recenti studi rivolgono l'attenzione ad altri polimorfismi genetici, per esempio quelli del gene ABCB1, che codifica per la glicoproteina P (P-gp) espressa nell'endotelio dei capillari sanguigni del cervello (barriera emato-encefalica, BBB), così come nel rene e nell'intestino. Affinché un farmaco possa esercitare la sua azione a livello del sistema nervoso centrale è necessario che passi la BBB. P-gp agisce nella BBB come pompa di efflusso, è quindi in grado di riportare nel flusso sanguigno diversi farmaci con svariate strutture chimiche e meccanismi d'azione, come antidepressivi ed antipsicotici. Sia citalopram (antidepressivo appartenente alla classe degli inibitori selettivi del *reuptake* della serotonina, SSRIs) che venlafaxina (inibitore del *reuptake* sia della serotonina che della noradrenalina) sono substrati di P-gp. L'efficacia clinica degli antidepressivi così come di altri antipsicotici è stata associata ai polimorfismi di ABCB1. Tre sono i principali polimorfismi che influenzano l'attività e/o i livelli di espressione di P-gp e sono C3435T, G2677T/A e C1236T. Solo due studi sono stati precedentemente pubblicati sull'influenza del genotipo di P-gp in campioni analizzati *post mortem* e nessuno studio è stato condotto sui farmaci antidepressivi. Scopo del presente lavoro è stato quello di indagare la frequenza dei genotipi di ABCB1 nei soggetti deceduti risultati positivi all'assunzione di citalopram o venlafaxina dopo autopsia. Inoltre è stata valutata la distribuzione del genotipo di ABCB1 nei soggetti deceduti per intossicazione rispetto ai soggetti deceduti per altre cause.

La popolazione in studio era costituita da 228 casi *post mortem* positivi all'assunzione di venlafaxina (n=116) e citalopram (n=112) provenienti dal Dipartimento di Genetica e Tossicologia Forense di Linköping, Svezia che, durante lo screening tossicologico, sono stati anche genotipizzati per i polimorfismi di ABCB1. Tutti i casi sono stati classificati secondo i criteri dell'*International Classification of Disease-9* (ICD) codificati dal responsabile di patologia forense dell'Istituto e suddivisi in intossicazioni (n=73: suicidi, incidenti o indeterminati, codici ICD:E950, 980, 859, 866) e casi non correlati ad intossicazione da farmaci (n=155, comprensivi di tutte le altre cause di morte non correlate ad intossicazioni). Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico regionale di Linköping, Svezia. Le analisi tossicologiche sono state effettuate da sangue femorale attraverso gas cromatografia con detector nitrogeno-fosforo. Sono state così determinate le concentrazioni di venlafaxina e citalopram e dei loro rispettivi metaboliti. È stata inoltre valutata la presenza di etanolo. Lo screening dei polimorfismi di ABCB1 è stato effettuato tramite *pyrosequencing*.

Lo studio ha riguardato 116 casi risultati positivi all'assunzione di venlafaxina e 112 casi positivi a citalopram. I casi in studio comprendevano 85 donne e 143 uomini tra i 18 ed i 90 anni, con età media di 56 anni. 91 sostanze diverse sono state rilevate nei vari campioni, una media di 4 farmaci per soggetto, in un *range* tra 1 e 11 sostanze presenti contemporaneamente. Solo nel 17% dei casi venlafaxina o citalopram sono stati identificati come unico farmaco assunto e nessuno di questi casi è stato classificato come intossicazione. I farmaci più frequentemente assunti in concomitanza a venlafaxina e citalopram sono stati etanolo, zopiclone e paracetamolo sia in casi di intossicazione e non e propiomazina per entrambi i farmaci ma solo per i casi degli intossicati. Secondo il patologo forense la morte era dovuta ad intossicazione nel 32% dei casi (n=73). Un totale di 103 casi sono stati classificati come suicidi, cioè il 45%, ed il 34% di questi suicidi è stato attribuito ad intossicazione (n=35). I restanti 68 casi di suicidio non sono stati associati ad intossicazione da farmaci, ma la principale causa di morte è stata l'impiccagione (n=45) seguita dall'annegamento (n=11). La morte è stata considerata naturale in 51 casi e 57 casi sono stati classificati come morte accidentale.

Tutti i 228 casi, ad eccezione di 3 per il polimorfismo C1238T, sono stati genotipizzati con successo per i polimorfismi C1238T, G1199A, C2677T/A e C3435T e non hanno mostrato deviazioni significative dall'equilibrio di *Hardy-Weinberg*. I polimorfismi C1238T e C3435T nei casi positivi all'assunzione di venlafaxina differiscono in modo significativo tra casi di intossicazione e non (C1236T, $P = 0.0173$; C3435T, $P = 0.0074$). Lo stesso *trend* è stato osservato per G2677T, ma il dato non raggiunge la significatività statistica ($P = 0.0597$). Pochi individui positivi alla venlafaxina sono risultati omozigoti per le varianti polimorfe (1236TT, 2677TT o 3435TT) nei casi di intossicazione se confrontati con gli altri casi. Le varianti genetiche 1238 e 3435 erano significativamente differenti tra intossicati e non in tutti i casi analizzati (venlafaxina + citalopram). Per quel che riguarda lo SNP G1199A si è riscontrata una bassa frequenza dell'allele A sia nei decessi per intossicazione che non (nessun individuo omozigote A/A è stato riscontrato nei casi in studio). Pochi sono i casi di portatori dell'allele 2677A, tanto che sono stati esclusi dallo studio. Nessuna differenza significativa nei polimorfismi di ABCB1 è stata riscontrata in relazione ai casi positivi all'assunzione di citalopram.

Questo studio di tossicologia forense, effettuato su 228 casi *post mortem*, indica che i polimorfismi C1236T e C3435T di ABCB1 nei casi di intossicazione da farmaci di soggetti risultati positivi all'assunzione di venlafaxina differiscono significativamente dai casi legati ad altre cause di morte, indicando che questi polimorfismi influenzano la funzionalità di P-gp, compromettendo il corretto raggiungimento della concentrazione efficace del farmaco antidepressivo a livello centrale.

Questi risultati non sono stati confermati nei casi risultati positivi all'assunzione di citalopram, indicando che gli effetti delle varianti genetiche possono essere substrato-specifici.

Questi risultati dovrebbero essere confermati in altri studi con un più ampio gruppo di casi ed analizzando anche altri antidepressivi.

Parole chiave: ABCB1, citalopram, venlafaxina, tossicologia forense, genotipizzazione *post mortem*

Riferimento bibliografico

[Karlsson L](#) et al. *Int J Legal Med* 2013 Mar 21 [Epub ahead of print]

VARIANTI GENETICHE ASSOCIATE CON L'EFFICACIA E LA TOSSICITÀ NELL'ARTRITE REUMATOIDE ALLO STADIO INIZIALE: RISULTATI DAL TRIAL PER IL TRATTAMENTO AGGRESSIVO DELL'ARTRITE REUMATOIDE ALLO STADIO INIZIALE

A cura del Dott. Gabriele Stocco

Il metotressato è un farmaco antireumatico in grado di modificare l'andamento della terapia. E' utilizzato come agente di prima linea nel trattamento dell'artrite reumatoide di intensità da moderata a severa. E' presente un'eterogeneità interindividuale considerevole nella risposta al metotressato, sia in termini di efficacia del trattamento che di comparsa di effetti avversi. Sebbene il fumo, il genere femminile, l'età giovane, la durata di malattia e la presenza del fattore reumatoide serico siano associati con una risposta ridotta alla terapia con metotressato, queste variabili spiegano una frazione piuttosto piccola della variabilità di risposta, indicando un ruolo di fattori farmacogenetici. Infatti, diversi studi hanno identificato polimorfismi nella via metabolica del metotressato come associati in maniera significativa con l'esito del trattamento con l'antimetabolita. Tuttavia, al momento, gran parte degli studi farmacogenetici hanno prodotto evidenze conflittuali; inoltre il numero di geni candidati valutati come coinvolti nel meccanismo d'azione del metotressato è piccolo, in particolare il locus per i fattori di istocompatibilità HLA-DRB1 e LTA-TNF, assieme alle *pathways* delle purine, dei folati e dell'adenosina. Determinanti genetici della risposta al metotressato possono essere valutati precocemente durante il decorso dell'artrite reumatoide, quando gli interventi farmacologici conferiscono i benefici massimi. Quindi, l'identificazione e la validazione di nuovi *markers* ha importanti implicazioni cliniche, che comprendono lo sviluppo di approcci terapeutici personalizzati, che potrebbero risultare in aumentata efficacia e ridotta tossicità.

A questo scopo, lo studio in oggetto ha impiegato la piattaforma Affymetrix dedicata al metabolismo, escrezione e trasporto dei farmaci (DMET) per esaminare in maniera esaustiva il ruolo delle varianti genetiche coinvolte nella farmacocinetica nei pazienti arruolati nel protocollo TREAT (trial per il trattamento di artrite reumatoide aggressiva allo stadio iniziale), registrato su clinicaltrial.gov (NCT00259610). Il fenotipo di artrite reumatoide precoce considerato in questa coorte ha caratteristiche uniche che lo rendono adatto all'esplorazione di associazioni farmacogenetiche, in quanto gli effetti terapeutici determinati dai farmaci anti-reumatici che modificano l'andamento della malattia è in media maggiore per partecipanti con malattia allo stadio iniziale, rispetto a quelli con malattia allo stadio avanzato, il che comporta un aumento della potenza statistica. Il trial TEAR consiste in uno studio clinico multicentrico di fase IV a doppio cieco in pazienti con artrite reumatoide allo stadio iniziale (durata della malattia inferiore ai 3 anni) caratterizzata da un fenotipo clinico aggressivo, definito dalla positività agli autoanticorpi o dalla presenza di erosioni sulle radiografie di mani e piedi; il trial ha confrontato due strategie (terapia iniziale intensiva vs graduale) e due combinazioni di farmaci (etanercept con metotressato in confronto a idrossiclorochina con sulfasalazina).

Dopo 24 settimane di terapia con metotressato, i partecipanti sono stati randomizzati per il trattamento intensivo con terapia tripla per via orale oppure metotressato con etanercept, se l'attività di malattia misurata in 28 giunture (DAS28) superava il punteggio di 3.2. Criteri di inclusione comprendevano età maggiore di 18 anni, durata della malattia inferiore ai 3 anni, diagnosi di artrite reumatoide secondo i criteri dell'American College of Rheumatology; i criteri di esclusione hanno considerato la gravidanza o l'allattamento, il trattamento con iniezioni di corticosteroidi entro 4 settimane dallo screening clinico iniziale, la diagnosi di infezione severa oppure l'uso della terapia biologica. L'esito primario del trial TEAR è stato definito dal DAS28 medio nelle settimane 48 a 102 mentre gli esiti secondari sono stati definiti da un miglioramento dei criteri ACR (ACR20, ACR50 e ACR70). I pazienti sono stati valutati durante visite effettuate ogni 6 settimane. Tutti i pazienti hanno

ricevuto acido folico, il che ha ridotto il rischio di effetti avversi, limitando la potenza statistica: per questo motivo tutti gli eventi effetto avverso sono stati raggruppati. Lo studio ha arruolato in totale 755 pazienti; la durata media di malattia andava da 2,9 a 4,5 mesi. Di questi, 630 hanno consentito all'analisi genetica; tuttavia, informazioni complete sugli effetti avversi e le covariate sono state ottenute per 471 pazienti, che sono stati inclusi nell'analisi. La genotipizzazione è stata effettuata impiegando la piattaforma DMET, che consente di caratterizzare 1936 marcatori in 225 geni coinvolti del metabolismo e trasporto dei farmaci. La genotipizzazione ha avuto successo per 1931 dei 1936 markers valutati; di questi 1068 sono risultati monomorfici nella popolazione in esame e sono stati esclusi, lasciando 863 marcatori in 224 geni per l'analisi. Per l'analisi statistica è stato utilizzato un approccio convenzionale di regressione multipla delle associazioni fra i marker genetici e la risposta (DAS28) a 24 settimane, aggiustata per il livello baseline di attività di malattia, il protocollo di trattamento, l'etnia, il genere, l'età ed il fumo. Il problema dell'aggiustamento per i falsi positivi (errori di tipo 1) legato all'esecuzione di test multipli, vista le correlazioni esistenti fra i marcatori presenti nella piattaforma DMET, non può essere risolto applicando la correzione di Bonferroni. Considerando quindi una correlazione completa dei markers all'interno di un gene, la correzione per i test multipli è stata effettuata stimando un livello di significatività α sulla base del numero di geni studiati, ovvero $\alpha = 0,05/224 \text{ geni} = 2,2 \times 10^{-4}$.

Il secondo approccio statistico per individuare markers genetici di efficacia e tossicità ha considerato la selezione di modelli predittivi. Siccome il numero di variabili indipendenti era di gran lunga superiore al numero di pazienti partecipanti allo studio, è stata impiegata una forma di regressione penalizzata (LASSO), che riduce l'associazione di markers con effetti piccoli mentre favorisce l'associazione di markers con effetti più grandi; un approccio innovativo nell'uso di questa regressione penalizzata è stata l'applicazione di una penalità non solo a livello di singolo marcatore ma anche a livello di gruppi di marcatori appartenenti allo stesso gene. Lo scopo dell'applicazione di queste penalità è limitare il numero di varianti selezionate nei modelli, in quanto chiaramente ci si può aspettare che solo una piccola minoranza degli 863 marcatori sia importante. Modelli che hanno incorporato più di 20 variabili (sia genetiche che cliniche/demografiche) non sono stati considerati.

L'età media dei pazienti arruolati è risultata pari a 49,6 anni ed il 72% erano femmine. L'associazione genetica più forte con la risposta alla terapia è stata per il gene *CHST11* (5 marcatori con $p < 0.003$), che codifica per la sulfotransferasi dei carboidrati 11 e che comunque non ha raggiunto la soglia di significatività statistica aggiustata per i test multipli. Per quanto riguarda gli effetti avversi, i marcatori genetici più significativi sono risultati nei citocromi P450 *CYP20A1* e *CYP39A1* ed i trasportatori *SLC22A2* e *SLC7A7* e il gene per l'aldeide deidrogenasi mitocondriale *ALDH2*. I marker selezionati hanno spiegato un'associazione più forte con gli effetti avversi che con la risposta clinica alla terapia; ciò è probabilmente dovuto al fatto che il contributo genetico alla risposta la metotressato è inferiore rispetto a quello per gli effetti avversi.

La valutazione esaustiva mediante analisi con piattaforma DMET di polimorfismi genetici coinvolti nel metabolismo e trasporto dei farmaci in pazienti con artrite reumatoide allo stadio iniziale trattati con metotressato, ha individuato associazioni significative per gli effetti avversi, ma non per la risposta clinica; particolarmente interessante pare l'effetto identificato dell'aldeide deidrogenasi (*ALDH2*).

Parole chiave: metotressato, artrite reumatoide, farmacogenetica

Riferimento bibliografico

[Aslibekyan S](#) et al. *Pharmacogenomics J* 2013 Apr 2 [Epub ahead of print].

L'ANALISI COMBINATA DEI LIVELLI CIRCOLANTI DI β -ENDORFINE CON POLIMORFISMI NEI GENI OPRM1, CACNAD2 E ABCB1 RIVELA UNA POSSIBILE CORRELAZIONE CON LA SENSIBILITÀ AGLI OPIACEI E GLI EFFETTI COLLATERALI INDOTTI DAGLI OPIACEI

A cura della Dott.ssa Sarah Carginin

Gli oppiacei sono composti alcaloidi derivati dall'oppio utilizzati nella pratica clinica per il trattamento di algie di intensità medio-alta, sia acute che croniche. Tale classe di farmaci è caratterizzata da un ristretto indice terapeutico e da una marcata variabilità interindividuale nella risposta, suggerendo un possibile ruolo della componente genetica nel determinare significative differenze individuali nella sensibilità agli oppiacei. Polimorfismi in geni codificanti per proteine coinvolte nell'interazione recettoriale, nel metabolismo e nel trasporto extracellulare degli oppiacei potrebbero spiegare, almeno in parte, la variabilità interindividuale nella risposta a tali farmaci. In questo studio, gli Autori hanno preso in considerazione tre varianti in geni con possibile impatto sulla risposta clinica al trattamento con oppiacei: a) il polimorfismo A118G del gene OPRM1 codificante il recettore MOP per gli oppiacei; b) la variante C3435T nell'esone 26 del gene ABCB1 che codifica per la P-glicoproteina 1, un trasportatore di membrana espresso a livello della barriera ematoencefalica in grado di limitare il passaggio nel parenchima cerebrale di farmaci (inclusi gli oppiacei) e di altri composti xenobiotici lipofili; c) il polimorfismo G>A del gene CACNA2D2 che codifica per la subunità alpha-2/delta-2 del canale del calcio, in grado di interagire con la proteina-G che media gli effetti del recettore MOP. Obiettivo dello studio è stato quello di valutare l'impatto di queste tre varianti sui livelli plasmatici di β -endorfina, sulla risposta al trattamento con oppiacei e sull'incidenza degli effetti avversi, in un gruppo di pazienti affetti da dolore cronico.

Lo studio è stato condotto su una coorte di 80 pazienti (di cui 41 di sesso femminile; età compresa tra i 25 ed i 66 anni) affetti da lombalgia cronica ed in trattamento con remifentanil. *Criteri di inclusione*: lombalgia da più di sei mesi; candidati all'intervento chirurgico di fusione spinale; età superiore ai 18 anni; punteggio di VAS (Visual Analogue Scale) di almeno 40 mm su una scala da 0-100 mm. *Criteri di esclusione*: comorbidità che possano precludere l'intervento chirurgico. Sono stati, inoltre, reclutati 56 volontari sani (di cui 31 donne; età compresa tra i 27 ed i 61 anni) costituenti la coorte di controllo. I pazienti sono stati valutati per la sensibilità agli oppiacei utilizzando un'infusione bersaglio-controllata di remifentanil, secondo la procedura descritta da Schraag *et al*, (Br J Anaesth 1998, 81:365–368). La presenza e la gravità degli effetti avversi di remifentanil (costipazione, nausea, sedazione e prurito) sono stati valutati tramite questionario EORTC-OLQ-30. Il DNA genomico è stato estratto da campioni di sangue intero. La genotipizzazione per lo SNP OPRM1 A118G è stata effettuata mediante ibridazione competitiva con sonde oligonucleotidiche allele-specifiche, mentre gli altri due SNPs sono stati analizzati tramite sequenziamento diretto. Il dosaggio dei livelli plasmatici di β -endorfine è stato effettuato attraverso saggio radioimmunologico.

La risposta alla terapia con remifentanil è stata classificata buona in 16 pazienti, moderata in 44, mentre 20 pazienti sono stati classificati *non-responders*. I pazienti *responders* (n=60) presentano concentrazioni più elevate di β -endorfine (26.6 ± 3.59 fmol/ml) rispetto ai *non-responders* (n=20; 24.7 ± 3.20 fmol/ml; $P < 0.05$). I livelli plasmatici di β -endorfine nei pazienti in trattamento con remifentanil (26.2 ± 3.57 fmol/ml) risultano inferiori rispetto a quelli riscontrati nei controlli sani (28.2 ± 4.63 fmol/ml; $P < 0.01$).

I polimorfismi analizzati sono in equilibrio di Hardy-Weinberg sia nei pazienti che nei soggetti di controllo. I risultati hanno evidenziato nei pazienti maschi un'associazione con concentrazioni più elevate di β -endorfine sia nei portatori dell'allele maggiore OPRM1 118A (26.8 ± 3.25 fmol/ml) rispetto ai portatori dell'allele OPRM1 118G (24.2 ± 2.96 fmol/ml; $P < 0.05$), che nei pazienti con genotipo ABCB1 3435TT (27.4 ± 3.40 fmol/L) rispetto ai portatori del genotipo ABCB1 3435CC (25.8 ± 3.20 fmol/L). Al contrario, i pazienti di sesso femminile con genotipo ABCB1 3435CC risultano possedere livelli di β -endorfine superiori (26.4 ± 3.30 fmol/L) a quelli riscontrati nelle donne con genotipo ABCB1 3435TT (24.9 ± 3.66 fmol/L). I pazienti con genotipo ABCB1 3435TT sperimentano inoltre una maggiore incidenza di effetti avversi correlati all'utilizzo di remifentanil ($P < 0.05$). Tra i pazienti con buona risposta alla terapia con remifentanil è stata riscontrata una maggiore incidenza del genotipo CACNA2D2 GG rispetto rispettivamente ai pazienti con risposta moderata, ai *non-responders* e ai soggetti di controllo ($P < 0.05$). Infine, l'analisi multivariata, aggiustata per età e per sesso, evidenzia un'associazione significativa tra il genotipo per lo SNP CACNA2D2 G>A e la sensibilità agli oppiacei ($r = 0.247$, *adjusted* $R^2 = 0.067$, $P = 0.029$).

Questo studio evidenzia l'importanza dei fattori genetici come determinanti della risposta clinica al trattamento con remifentanil, in pazienti affetti da lombalgia cronica. Inoltre, i risultati mostrano concentrazioni inferiori di

β -endorfina, il ligando endogeno per il recettore MOP, nel plasma di pazienti con dolore cronico rispetto ai soggetti controllo, e, tra i pazienti in trattamento con remifentanil, nel plasma di pazienti *non responders*. Tali risultati sono in accordo con alcuni studi precedenti che avevano riportato una correlazione inversa tra i livelli plasmatici di β -endorfina e l'intensità del dolore in pazienti con varie sindromi dolorose. In accordo con la letteratura sono anche i risultati riguardanti l'associazione del genotipo ABCB1 3435TT con lo sviluppo di maggiori eventi avversi indotti dagli oppiacei. Inoltre, l'osservazione che tra i pazienti con una buona risposta al remifentanil non sia stato individuato nessun paziente portatore dell'allele minore per lo SNP CACNA2D2 G>A suggerisce un'associazione tra il genotipo CACNA2D2 GG con una migliore risposta al trattamento con oppiacei, come confermato nell'analisi multivariata. I risultati mostrano, infine, che il genere è un fattore clinico in grado di modificare l'effetto del polimorfismo ABCB1 C3435T sui livelli plasmatici di β -endorfina. Principale limite dello studio è rappresentato dall'assenza di correzione per confronti multipli, in relazione al numero di polimorfismi e di endpoints clinici considerati, rendendo quindi elevato il rischio di risultati falsi positivi. Per tale motivo, seppur interessanti, i risultati di questo studio devono essere considerati preliminari e necessitano, quindi, di una conferma in studi indipendenti.

In conclusione, questo studio evidenzia l'esistenza di correlazioni tra le varianti nei geni coinvolti nella farmacocinetica e farmacodinamica dei farmaci oppiacei e la risposta clinica al trattamento con remifentanil. In particolare, il polimorfismo CACNA2D2 G>A risulta associato all'efficacia del trattamento antalgico, mentre il polimorfismo ABCB1 C3435T sembra essere correlato alla comparsa di effetti avversi.

Parole chiave: β -endorfine, polimorfismi, OPRM1, ABCB1, CACNA2D2, risposta agli oppiacei, effetti avversi da oppiacei, sensibilità agli oppiacei

Riferimento bibliografico

[Rhodin A](#) et al. *Mol Brain* 2013, 6:8.

POLIMORFISMI A SINGOLO NUCLEOTIDE ASSOCIATI CON OUTCOME NEI CARCINOMA METASTATICI DELLE CELLULE RENALE TRATTATI CON SUNITINIB

A cura della Dott.ssa Gloria Ravegnini

Il carcinoma delle cellule renali (RRC) è caratterizzato dall'inattivazione del gene oncosoppressore VHL; questo porta ad elevati livelli di fattore-alfa ipossia-indotto che up-regola l'espressione di VEGF e PDGF

Terapie mirate contro alcune delle suddette proteine hanno portato a significativi miglioramenti nelle prospettive dei pazienti affetti da RRC metastatico. Tra queste c'è sicuramente sunitinib malato (SU), che è diventato il trattamento d'elezione per questo tipo di cancro. SU è un inibitore delle tirosin kinasi anti-VEGF e PDGF somministrato oralmente. Nonostante il 50% dei pazienti ricevanti sunitinib sperimentino un responso oggettivo ed il 43% una stabilizzazione della malattia, tuttavia il 7% ha una resistenza intrinseca a tale trattamento con progressione della malattia; inoltre è facile che pazienti che hanno goduto di iniziali benefici vadano poi incontro a progressione dovuta a resistenza acquisita.

L'identificazione di biomarkers responsabili della resistenza intrinseca porterebbe al risparmio di inutili costi ed effetti collaterali; d'altra parte individuare markers per la resistenza acquisita potrebbe fornire ulteriori targets per lo sviluppo di nuovi farmaci. Recentemente, diversi studi hanno ipotizzato che la variabilità genetica in geni coinvolti nella farmacocinetica e farmacodinamica di sunitinib possa alterare l'efficacia di esso (van der Veldt AA et al. *Clin Cancer Res* 2011, 17(3): 620-9; Garcia-Donas J et al. *Lancet Oncol* 2011, 12(12): 1143-50) in cancro metastatico delle cellule renali. Considerando che ognuno di questi studi ha investigato un differente gruppo di polimorfismi a singolo nucleotide, queste scoperte devono essere validate in mondo indipendente. Lo scopo di questo studio è stato proprio quello di replicare le associazioni di questi SNPs con l'outcome a sunitinib

in una coorte indipendente di pazienti affetti da cancro metastatico delle cellule renali chiare trattati in prima linea con sunitinib.

Tutti i pazienti sono stati trattati con la dose standard di 50mg al giorno mediante cicli di sei settimane (4 settimane on /2 settimane off). PFS (*progression free survival*) è stata definita come il tempo tra il primo giorno di trattamento e la data di progressione o morte; OS (*overall survival*) come tempo intercorso tra il primo giorno di trattamento e la data di morte o l'ultima data di follow up; la risposta è stata classificata come completa (CR), parziale (PR), stabile (SD) o come progressione (PD).

Sono stati genotipizzati un totale di 16 polimorfismi in 10 geni chiave (ABCB1 rs1045642, rs1128503, rs2032582, CYP3A5 rs776746, NR1/2 rs3814055, rs2276707, NR1/3 rs2307424, rs2307418, rs4073054, HIF1A rs11549467, PGDFRA rs35597368, VEGFR2 rs1870377, VEGFR3 rs307821, rs307826, FGFR2 rs2981582, rs4073, rs1126647).

Tutti i pazienti sono stati valutati mediante un'analisi univariata per associazione con PFS e OS tramite Kaplan-Meier e mediante un'analisi multivariata tramite modello proporzionale di Cox.

Lo studio ha coinvolto un totale di 88 pazienti con un'età media di 59 anni (*range* 38-84); la maggioranza dei pazienti (>94%) erano di origine caucasica. Al momento dell'analisi, 57 pazienti (64.8%) avevano raggiunto la progressione e 48 (54.5%) erano morti; il tempo di follow-up medio è stato di 46 mesi (*range* 1-73) dopo l'inizio di sunitinib. La PFS media è stata di 15 mesi e l' OS media di 29 mesi.

La risposta è stata assegnata in 82 pazienti: tra questi, 7 (7.3%) hanno raggiunto una risposta completa (CR), 30 (36.6%) parziale, 36 (43.9%) stabile e 10 (11.4%) sono andati incontro a progressione.

La frequenza allelica di tutti i 16 SNPs analizzati è risultata paragonabile con quella dei database riportati (1000 *genomes project* o dbSNPs) eccetto per rs307821; nel caso di rs11549667 non si è potuto procedere all'analisi statistica data la quasi totale mancanza di eterozigoti.

L'analisi statistica multivariata ha mostrato come PFS e OS erano significativamente associati con rs1128503 in ABCB1 (P=0.027 e P=0.025), rs4073054 in NR1/3 (P=0.025 e P=0.035) e rs307821 in VEGFR3 (P=0.032 e P=0.011). PFS era inoltre associata con rs2981582 in FGFR2 (P=0.031) e rs2276707 in NR1/2 (P=0.047); OS era associata con rs2307424 in NR1/3 (P=0.048) e rs307826 in VEGFR3 (P=0.013).

Successivamente è stata valutata la distribuzione genotipica degli SNPs tra i pazienti aventi PD vs SD, PR o CR; in base a regressione logistica è stato osservato come la presenza di differenziazione sarcomatoide, una conta di riferimento dei neutrofili, e genotipo di VEGFR3 rs307826 sfavorevole (GA/GG) erano significativamente più frequenti in soggetti con progressione se comparati con quelli raggruppati come SD, PR o CR.

Non è stato possibile invece confermare le associazioni tra i polimorfismi rs776746 in CYP3A5, rs3814055 in NR1/2, rs11549467 in HIF1A, rs1870377 in VEGFR2 e rs4073 in IL8 e *outcome*.

In conclusione, questo studio ha confermato diverse associazioni tra polimorfismi in geni coinvolti nella farmacocinetica e farmacodinamica di sunitinib e l'*outcome* terapeutico in pazienti affetti da cancro metastatico delle cellule renali in trattamento con sunitinib; queste associazioni erano state precedentemente descritte in un gruppo indipendente di pazienti trattati con sunitinib.

Parole chiave: cancro metastatico delle cellule renali, sunitinib, geni coinvolti nella farmacocinetica e farmacodinamica di sunitinib

Riferimento bibliografico

[Beuselinck B](#) et al. *Br J Cancer* 2013, 108(4):887-900.

UN POLIMORFISMO NEL GENE DEL RECETTORE DELL'ORMONE TIROIDEO È ASSOCIATO NEGLI ASMATICI ALLA RISPOSTA AI BRONCODILATATORI

A cura della Dott.ssa Virginia Paribello

Esiste una grande variabilità interindividuale nella risposta alle terapie farmacologiche per l'asma. Tale variabilità può essere attribuita in parte a fattori genetici (Duan QL et al. *Curr Pharm Des* 2009, 15: 3742–53; Panebra A et al. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007, 293: L453–L462), ma le variazioni geniche che la determinano sono solo parzialmente note.

Nel presente studio si è deciso di aumentare le conoscenze in questo campo attraverso la genotipizzazione di pazienti in altri *trial*.

Nella fase esploratoria, è stato utilizzato il Childhood Asthma Management Program (CAMP, n=403), uno studio clinico di bambini asmatici, dai 5-12 anni, in trattamento per un periodo medio di 4,3 anni (*Childhood Asthma Management Program Research Group: Control Clin Trials* 1999, 20: 91–120; *N Engl J Med* 2000; 343: 1054–1063). Nel CAMP sono stati analizzati un totale di 1.116 SNPs in 98 geni candidati per studiarne l'associazione con BDR. Da questi SNPs, sono stati selezionati i 42 polimorfismi più associati all'asma, con $p < 0.1$ associata a BDR, sia nell'analisi su base familiare (FBAT) che nell'analisi sulla popolazione (POP).

Nella fase confermativa, questi 42 SNPs sono stati genotipizzati in tre trial di adulti asmatici, da lievi a gravi, senza patologie significative concomitanti: SEPRACOR *asthma trial* (n=435), *Leukotriene Modifier or Corticosteroid or Corticosteroid Salmeterol trial* (LOCCS, n=159) e il trial per validare l'efficacia di trattamento nell'asma di basse dosi di Teofillina (LODO, n=155). Lo scopo di questo studio è quello di verificare l'associazione dei 42 SNPs nei geni dei TFs con BDR nelle popolazioni dei quattro diversi studi. I pazienti partecipanti a LOCCS sono stati precedentemente trattati con una bassa dose di corticosteroidi per via inalatoria, da 4 a 6 settimane prima della randomizzazione, per ottenere un miglioramento della funzione polmonare (85-92%). Ciò spiega in parte la BDR ottenuta in LOCCS e più normalmente distribuita (asimmetria=0.038 e curtosi=0.444). In tutte le quattro popolazioni in studio, la BDR è stata misurata come differenza percentuale in Volume Espiratorio Massimo Forzato in 1s (FEV1) prima e dopo somministrazione di due inalazioni di salbutamolo (180 mg) attraverso un inalatore predosato ($BDR = \frac{postFEV1 - preFEV1}{preFEV1}$). Tutti i partecipanti hanno fornito consenso informato scritto e tutti i protocolli dello studio sono stati approvati dal *Institutional Review Board*.

Dei 42 SNPs analizzati nelle diverse popolazioni, sono stati individuati 5 SNPs con $p < 0.1$, in più popolazioni di replica. Lo SNP rs892940 nel gene del recettore- β dell'ormone tiroideo (THRB) associato a BDR in CAMP, replicato in LODO e SEPRACOR, è risultato avere un valore combinato di $p = 0.0012$, corretta con il metodo di Bonferroni a $p \leq 0.0012$. Questo è un comune SNP con frequenza allelica minore del 41,7% nel CAMP e che si trova a 2.5 kb 5' del gene THRB. I pazienti portatori di questo allele minore mostrano il 33% in più di risposta ai beta2-agonisti rispetto a quelli portatori dell'allele maggiore, con un OR di 1,33 (95% IC: 1,11-1,58). Tuttavia la percentuale di variazione fenotipica attribuita a rs892940 è piccola, con stime del 0,75%, 0,30%, 1,04% e 0,25% in CAMP, LOCCS, LODO e SEPRACOR, rispettivamente. Utilizzando i dati genotipici del *hapmap CEU population* (www.hapmap.org) questo SNP è risultato essere in *Linkage Disequilibrium* (LD) con un altro SNP (rs4858119), a 2.8 kb 5' di THRB. Anche se in CAMP sono stati identificati ulteriori significativi SNPs in diversi geni candidati (RUNX1, TCF12, PARP1 e AP3) associati a BDR, nessuna di queste associazioni sono state replicate nelle altre popolazioni in studio. Due SNPs nel recettore della vitamina D, con il più basso valore di p in CAMP, sono risultati associati a BDR in LODO ma non hanno raggiunto i criteri di significatività quando i valori sono stati corretti con il metodo di Fisher. Analogamente, l'rs3858444 nel tumore di Wilms l'isoforma B è risultato moderatamente associato a BDR in CAMP e replicato solo in LODO, ma ha ottenuto una p combinata elevata. Infine l'rs2249650 in TF1 (RUNX1), replicato in SEPRACOR, non è risultato significativo quando sono stati combinati i dati.

Un limite di questo studio può essere stato la dimensioni della popolazione degli asmatici, soprattutto per LOCCS (n=159) e LODO (n=155), e questo potrebbe aver ridotto la possibilità di individuare associazioni genetiche. Comunque resta da spiegare se e come questi SNPs regolano l'espressione di THRB.

Questo studio ha identificato un nuovo locus che potrebbe giustificare la variabilità interindividuale in BDR negli asmatici e aggiunge una nuova variabile nella gestione del rischio clinico per il trattamento dell'asma.

Ulteriori studi sono necessari per determinare se l'associato SNP e/o qualsiasi ulteriore variante in LD con esso regola l'espressione o l'attività del gene THRB in risposta ai broncodilatatori. In conclusione, questo SNP nel gene del recettore- β dell'ormone tiroideo è un candidato per la regolazione della risposta nella terapia dell'asma.

Lo SNP non codificante rs892940, a 2.5 kb 5' del gene THRB 5', è associato alla risposta dei beta2-agonisti nei pazienti asmatici.

Parole chiave: beta2-agonisti, recettore β dell'ormone tiroideo, BDR, asma

Riferimento bibliografico

[Duan QL](#) et al. *Pharmacogenomics J* 2013, 13: 130-36.

PROFILO FENOTIPICO DELLE VARIANTI DELLA DPD IMPORTANTI PER LA SENSIBILITÀ AL 5-FLUOROURACILE TRAMITE ANALISI CELLULARE IN REAL TIME E MISURAZIONE DELL'ATTIVITÀ ENZIMATICA IN VITRO

A cura della Dott.ssa Marzia Del Re

Il 5-fluorouracile (5-FU) è un farmaco ampiamente utilizzato per il trattamento di molti tumori come quello del colon-retto e della mammella. Solo il 3-5% del 5-FU viene convertito a metabolita attivo, mentre l'85% del farmaco viene inattivato dalla diidropirimidina deidrogenasi (DPD) a 5-fluoro-diidrouracile (5-FDHU). Per questo motivo, una ridotta attività enzimatica a carico della DPD può essere responsabile del verificarsi di gravi tossicità a carico del paziente, di ordine gastro-intestinale ed ematologico, che talvolta possono portare anche al decesso. In letteratura sono state studiate molte varianti a carico della DPD, la più studiata è la DPYD*2A: una variante che si trova in un sito di *splicing* e che, quando presente, determina la trascrizione di una proteina incompleta e con forte riduzione dell'attività enzimatica. Oltre alla DPYD*2A sono riportate 96 mutazioni non-sinonimo e 2 mutazioni con *frameshift*, ma per molte di queste i risultati riportati non sono chiari e molti di questi sono contraddittori. Lo scopo del lavoro di Offer et al. è stato quello di sviluppare e validare un rapido sistema cellulare di fenotipizzazione della DPD, in grado di identificare le varianti associate a maggior sensibilità al 5-FU.

Nello studio di Offer et al. sono state transfettate le linee cellulari di mammifero HEK293T/c17 e HCT116 perché non esprimono la DPD utilizzando pIRES-neo3 expression Vector. Con il Phusion Site-directed Mutagenesis Kit (Finnzymes) sono stati generati i costrutti per le varianti: *2A, C29R, S534N, I543V, I560S, V732I. I parametri analizzati sono stati: espressione ed attività enzimatica della DPD tramite western-blot e rapporto con 5-FDHU; stabilità, morfologia e proliferazione cellulare tramite un sistema Real Time PCR.

I costrutti transfettati nelle HEK293T/c17 sono stati utilizzati per valutare l'attività delle cellule di convertire il 5-FU in 5-FDHU sia in condizioni *wild-type* che in presenza della mutazione *2A. La capacità delle cellule che esprimevano la DPD *wild-type* di inattivare il 5-FU risultava normale, mentre per le cellule portatrici della mutazione *2A la conversione del 5-FU a 5-FDHU era completamente assente, anche se l'espressione della DPD era la stessa. Per confermare che l'espressione transgenica della DPD era cataliticamente attiva anche in vivo, è stata determinata la IC₅₀ per il 5-FU. Le cellule transfettate con la DPD *wild-type* mostravano una resistenza al 5-FU significativamente maggiore rispetto alle non transfettate, mentre quelle portatrici della DPD mutata erano significativamente più sensibili al 5-FU rispetto a quelle *wild-type*. Il risultato più impressionante che è stato ottenuto è che la variante S534N mostrava un'attività della DPD del 36% più alta rispetto al *wild-type*. Anche la variante C29R era significativamente più attiva rispetto al *wild-type* del 13%, mentre le varianti I543V e V732I non modificavano significativamente l'attività enzimatica; la variante I560S ha mostrato diminuire sostanzialmente l'attività DPD, mostrandone una riduzione del 75% rispetto al *wild-type*. Per approfondire i

risultati ottenuti sono stati osservati i profili di sensibilità cellulare al 5-FU: le cellule che esprimevano la DPYD*2A mostravano una forte riduzione dell'indice cellulare dopo trattamento con 5-FU rispetto a quelle non trattate; in generale, la sensibilità delle cellule *wild-type* e di quelle con la mutazione I560S era simile, se non per un leggero aumento delle *wild-type*. Inoltre le cellule esprimenti la variante S534N avevano sensibilità alla tossicità molto più alta rispetto alle *wild-type*, a quelle portatrici della I560S o *2A.

La variante DPYD*2A ha confermato essere cataliticamente inattiva. Rispetto al *wild-type*, due varianti, la S453N e la C29R, hanno mostrato un significativo aumento dell'attività enzimatica, in particolare, le cellule che esprimevano la mutazione S534N, erano più resistenti alla tossicità da 5-FU rispetto alle *wild-type*.

I risultati ottenuti in questo studio supportano l'ipotesi che le varianti S534N e C29R abbiano un ruolo protettivo contro la tossicità da 5-FU, e, come conseguenza, potrebbero diminuire l'efficacia terapeutica del 5-FU. Questi dati spingono a rivedere i dati clinici riportati in letteratura ed ad approfondire ulteriormente le casistiche esaminate: le cinque varianti studiate sono state scelte perché in molti casi clinici riportati in letteratura erano state associate alla tossicità in seguito a trattamento con 5-FU, soprattutto la I560S. Il ruolo delle altre quattro varianti in relazione alla tossicità da 5-FU risulta invece essere meno chiaro. In particolare la variante I543V da molti non è considerata essere associata alla tossicità perché è un polimorfismo molto comune, mentre due casi in letteratura suggerirebbero il contrario. La variante S534N, invece, ha un'associazione con la tossicità non del tutto chiara: mentre studi condotti precedentemente la attribuivano ad una maggiore sensibilità al farmaco, studi recenti condotti su grandi numeri di pazienti hanno ottenuto risultati controversi. La variante V732I si è dimostrata implicata nello sviluppo di tossicità solo se la M166V non è presente. Infine, la C29R è stata identificata in un paziente con deficit DPD ed ha mostrato una inattività catalitica, invece, altri studi clinici hanno fallito nello stabilire un'associazione tra questa variante e la sensibilità al 5-FU. Altri studi ancora riportano che questa variante conferisca un allele "protettivo" contro la tossicità da 5-FU. Resta comunque da valutare come queste varianti si combinino tra loro e quale sia il loro effetto finale in vivo non solo sulla tossicità, ma anche sull'outcome clinico dei pazienti.

Parole chiave: DPD, 5-FU, polimorfismi, tossicità

Riferimento bibliografico

[Offer SM](#) et al. *Cancer Res* 2013, 73(6):1958-68.



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@sigr.it; sif.informazione@sigr.it; sifcese@comm2000.it.

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 Cargnin (Università del Piemonte Orientale) Dott.ssa Valeria Conti (Università di Salerno) 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 Ravagnini (Università di Bologna) 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.
