

**SIF - FARMACOGENETICA****Newsletter Numero 55 – Ottobre 2013**

---

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

---

## Sommario

- I polimorfismi presenti in *ABCC11/MRP8* incidono sulla grave tossicità indotta da 5-fluorouracile e sull'espressione epatica
- Trattamento con panitumumab-FOLFOX-4 e mutazioni di *RAS* nel carcinoma colo-rettale
- Studio di associazione genome-wide per l'identificazione di biomarcatori per rapamicina ed everolimus utilizzando un sistema di linee cellulari linfoblastoidi
- Farmacogenetica dei trasportatori ABC e SLC in pazienti con cancro metastatico al colon retto che ricevono terapia di prima linea FOLFIRI (irinotecano, 5-fluorouracile, leucovorin)
- I polimorfismi degli enzimi Glutathione S-Transferasi T1, O1 ed O2 sono associati alla sopravvivenza nei pazienti con carcinoma vescicale infiltrante
- Il polimorfismo nel gene codificante per l'enzima paraoxonase-1 non influenza la variabilità di risposta al clopidogrel ma è associato con gli outcome clinici dopo intervento percutaneo coronarico
- Lo stato di metilazione nel gene dell'interleuchina-11 predice la risposta clinica agli antidepressivi nei pazienti arruolati nello studio GENDEP
- Polimorfismi di VEGF e outcome clinico in pazienti affetti da cancro al seno metastatico trattati settimanalmente con docetaxel

---

## **I POLIMORFISMI PRESENTI IN *ABCC11/MRP8* INCIDONO SULLA GRAVE TOSSICITÀ INDOTTA DA 5-FLUOROURACILE E SULL'ESPRESSIONE EPATICA**

A cura della Dott.ssa Cheli Stefania

Da oltre 50 anni, il 5-fluorouracile (5-FU) rappresenta la colonna portante dei regimi chemioterapeutici per il trattamento di una vasta gamma di tumori, con circa due milioni di pazienti ogni anno trattati in tutto il mondo. Tuttavia la resistenza farmacologica e le gravi tossicità, tra cui mucosite, diarrea, neutropenia, nausea e vomito, riscontrate in circa il 15-20% dei pazienti trattati, sono ancora uno dei problemi più rilevanti nell'uso clinico di questo farmaco. Nonostante la forte evidenza di polimorfismi nel gene *DPYD*, risultati associati al rischio di tossicità da 5-FU, per potenziare la strategia di trattamento personalizzato è necessario individuare altri marcatori genetici predittivi. La classe dei geni coinvolti nell'assorbimento o nell'efflusso cellulare dei farmaci antitumorali e/o dei loro metaboliti, rappresenta un gruppo interessante di studio. Tra questi, il gene *ABCC11* che codifica per il trasportatore *MRP8* è un buon gene candidato in

quanto MRP8 è coinvolto nell'efflusso di 5-FdUMP, il principale metabolita intracellulare attivo del 5-FU. Nel gene ABCC11 sono stati descritti polimorfismi funzionali etnicamente distinti. Correlazioni genotipo-fenotipo sono state riportate per il polimorfismo rs17822931 (538 G>A, Gly180Arg) che determina il cerume secco (SNP cerume), tratto mendeliano più frequente negli asiatici che in altre popolazioni. Gli stessi autori hanno inoltre identificato un polimorfismo intronico nel gene ABCC11 che è risultato essere significativamente associato ad una maggiore espressione dell'mRNA di MRP8 (eQTL SNP) in campioni di fegato umano di una coorte di pazienti caucasici.

Scopo del presente studio è stato la valutazione del ruolo dei polimorfismi del gene ABCC11 in relazione alla tossicità indotta da 5-FU e all'espressione epatica. Sulla base dell'analisi di *linkage disequilibrium* (LD), sono stati selezionati 12 polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs *tag*) che coprono circa 65 kb della regione genomica di ABCC11 sul cromosoma 16. L'associazione degli SNP *tag* con la tossicità è stata valutata in una coorte di 672 pazienti in monoterapia con 5-FU. L'impatto funzionale dei polimorfismi di ABCC11 sull'espressione dell'mRNA e della proteina è stato valutato in 150 campioni di fegato umano e mediante esperimenti *in vitro*. L'*end point* primario è stato il valutare l'insorgenza di tossicità generale e specifica, tra cui mucosite, diarrea e leucopenia; le tossicità sono state classificate secondo i criteri di tossicità WHO. I pazienti sono stati divisi in due gruppi in base alla gravità della loro tossicità: bassa (grado 0-2) o alta (grado 3 o 4). Le frequenze genotipiche ottenute sono state testate per deviazione dell'equilibrio di *Hardy-Weinberg*. L'analisi di regressione logistica è stata effettuata mediante R-2.15.0 con SNPAssoc-1.8-1, applicando tre diversi modelli genetici: dominante, recessivo e additivo. Gli *odds ratio* (OR) sono stati calcolati con intervallo di confidenza al 95%. Per quanto riguarda l'analisi statistica della coorte epatica, la correlazione tra mRNA o proteina di MRP8 e ciascuno degli SNP scelti è stata eseguita tramite analisi della varianza (ANOVA) in combinazione con la regressione multipla. I fattori non genetici considerati hanno compreso: sesso, età, nicotina (fumatori vs non fumatori), consumo di alcool (sì vs no), esposizione pre-chirurgica al farmaco (sì vs no), colestasi (sì vs no), bilirubina sierica (normale vs elevata), proteina C-reattiva (CRP, normale vs elevata), funzione epatica identificata mediante gamma-glutamyl transpeptidasi epatiche (GGT, normale vs elevate) e diagnosi che ha portato alla resezione epatica (lesione primaria vs metastasi tumorale). La significatività statistica è stata definita come  $p < 0.05$ .

**Genotipi di ABCC11 e tossicità indotta da 5-FU.** Nessuna associazione statisticamente significativa è stata osservata con i tre modelli genetici, tra SNP selezionati e grado di tossicità generale da 5-FU. Anche i polimorfismi funzionali del gene ABCC11, precedentemente identificati (SNP cerume e SNP QTL), non sono risultati associati con il grado di tossicità complessiva. Tuttavia, quando sono state considerate le singole tossicità (leucopenia, mucosite e diarrea), l'analisi statistica ha rivelato un'associazione significativa tra il polimorfismo rs7194667 (g.48242898, T> G) e l'insorgenza di leucopenia (modelli genetico additivo e dominante). Gli individui portatori della variante G (TG o GG) hanno mostrato un rischio più elevato di sviluppare leucopenia ( $p = 0,034$ ). Utilizzando gli stessi modelli genetici, anche l'analisi multivariata, corretta per covariate quali sesso, modalità di somministrazione, assunzione di acido folico e polimorfismi in DPYD, TYMS e MTHFR (per le quali, in questa coorte, è già stata dimostrata l'associazione con grave tossicità generale indotta da 5-FU) ha confermato l'associazione tra SNP rs7194667 e grave leucopenia [modello dominante:  $p=0,021$ ,  $OR=3,31$  (1,26-8,66); modello additivo:  $p=0,03$ ,  $OR=2,96$  (1,19-7,32)]. Tale associazione resta significativa anche quando tutte le varianti del gene DPYD (DPYD\*2A, DPYD\*4, DPYD\*6, DPYD\*9, DPYD-G40A e DPYD-D949V) sono state combinate come unica variabile di rischio. Nessuno degli altri SNPs ha mostrato associazioni statisticamente significative con la tossicità, globale o specifica con i tre modelli genetici utilizzati.

▪ **Analisi dell'aplotipo per identificare il polimorfismo causale.** L'analisi dell'aplotipo ha mostrato che il polimorfismo rs7194667 è in perfetto LD ( $r^2=1$ ) con cinque SNPs, tra i quali il polimorfismo non-sinonimo rs17822471 (g.48242379G> A, T546M) già identificato come probabile SNP funzionale attraverso due algoritmi di analisi dei polimorfismi. Pertanto, è stato ipotizzato che rs17822471 possa essere il polimorfismo causale. La genotipizzazione rs17822471 (T546M) nei campioni di fegato della coorte trattata con 5-FU rivela una concordanza del 100% con rs7194667.

▪ **Associazione del polimorfismo rs17822471 (T546M) con l'espressione di MRP8 nei campioni di fegato.** L'analisi univariata ha rilevato un'associazione significativa dei polimorfismi rs17743256, rs7203695, rs8056100 (eQTL SNP) e rs8047091 con una maggiore espressione dell'mRNA di MRP8 (modello genetico dominante), mentre il polimorfismo rs12443685 è risultato associato ad una minore espressione dell'mRNA. Il polimorfismo non-sinonimo rs17822471 (T546M) è stato visto significativamente

associato con un'espressione inferiore della proteina MRP8 nel modello genetico dominante. SNPs rs17743708 (modello additivo) e rs8047091 (modello dominante) hanno mostrato un'associazione marginalmente significativa con una diminuita espressione della proteina MRP8. L'analisi multivariata dopo correzione per le covariate non genetiche è stata eseguita per confermare le associazioni significative identificate. Ad esclusione del polimorfismo rs12443685, tutti gli SNPs associati con l'espressione dell'mRNA nell'analisi univariata sono rimasti significativi. Anche l'associazione del polimorfismo rs17822471 (T546M) con la diminuita espressione della proteina è restata significativa ( $p=0.002$ , modello dominante). Gli individui con l'allele polimorfico sia in omo che in eterozigosi presentano una riduzione dei livelli di proteina epatica di 1.7 volte rispetto al genotipo di riferimento.

▪ **Influenza del SNP rs17822471 (T546M) sull'espressione della proteina ricombinante MRP.** L'effetto del polimorfismo rs17822471 sull'espressione di MRP8 è stato valutato attraverso ricombinazione sito-specifica in cellule HEK del cDNA *wild-type* e della variante T546M. Contrariamente al fegato, dove MRP8 è presente come forma deglicosilata (150 kDa), nell'estratto proteico di cellule HEK si individuano 2 bande (150 e 180 kDa, deglicosilata e glicosilata rispettivamente). L'espressione della variante MRP8 T546M risulta diminuire di due volte solo la forma deglicosilata rispetto al *wild-type*. La forma proteica glicosilata non è persa significativamente influenzata dal SNP.

Attraverso un approccio SNPs *tag*, è stato identificato un polimorfismo non sinonimo (rs17822471, T546M) nel gene ABCC11 significativamente e specificamente associato con grave leucopenia nei pazienti trattati in monoterapia con 5-FU. I pazienti portatori della variante allelica (genotipo GA o AA) mostrano un rischio triplicato di sviluppare una leucopenia grave rispetto ai pazienti con genotipo *wild-type* (GG). L'associazione non è stata confermata rispetto alle altre tossicità. Inoltre, questa variante è risultata associata a livelli più bassi di proteina MRP8 nella coorte caucasica di campioni di fegato umano e ad una riduzione dell'espressione di MRP8 in cellule HEK stabilmente trasfettate. Il lavoro qui riportato rappresenta il primo studio che valuta l'effetto delle varianti alleliche del gene ABCC11 sulla tossicità indotta da 5-FU e sulla variabilità di espressione di MRP8 nel fegato umano. Un'aumentata espressione di MRP8 è stata già correlata in precedenza con un peggior esito clinico in pazienti affetti da leucemia mieloide acuta (AML) trattati con citarabina. Gli autori hanno ipotizzato che l'alta espressione di MRP8 abbia determinato un'estrusione del farmaco dai blasti AML con conseguente resistenza alla terapia. Inoltre, è stato dimostrato che MRP8 è espressa nei leucociti isolati di individui normali. Pertanto, è stato proposto che la bassa espressione di MRP8 nei leucociti normali e nei blasti midollari determini un accumulo intracellulare di 5-FdUMP con conseguente aumento di effetti altamente citotossici fino ad arrivare a gravi leucopenie.

Sia l'analisi univariata che quella multivariata hanno identificato il polimorfismo rs17822471 (G>A, T546M) come fattore di rischio per leucopenia grave. Inoltre, una minore espressione di MRP8 nei blasti midollari e nei leucociti può portare ad un accumulo intracellulare di 5-FdUMP con conseguente aumento del rischio di leucopenia.

**Parole chiave:** 5-fluorouracile, ABCC11, MRP8, leucopenia.

#### Riferimento bibliografico

[Magdy T](#) et al. *Pharmacogenomics* 2013, 14(12):1433-48.

## TRATTAMENTO CON PANITUMUMAB-FOLFOX-4 E MUTAZIONI DI RAS NEL CARCINOMA COLO-RETTALE

A cura della Dott.ssa Lucia Gozzo

La mutazione del *RAS* rappresenta un *marker* di resistenza alla terapia anti-*epidermal growth factor receptor* (EGFR) nei pazienti con carcinoma colo-rettale metastatico. In particolare, i pazienti con mutazioni dell'esone 2 del *KRAS* non presentano una risposta clinica adeguata agli anti-EGFR e possono avere un *outcome* negativo se la terapia è associata ad un regime chemioterapico a base di oxaliplatino.

Una selezione più accurata dei pazienti secondo lo status mutazionale tumorale potrebbe migliorare il profilo beneficio-rischio della terapia anti-EGFR. Mutazioni attivanti del *KRAS* o dell'*NRAS*, in aggiunta a quelle dell'esone 2 del *KRAS*, sono state individuate come possibili *marker* negativi di risposta alla terapia mirata.

Le mutazioni di *KRAS* ed *NRAS* a livello dei codoni 12, 13, 61, 117 e 146 causano un aumento dei livelli di proteine RAS legate alla guanosina trifosfato ed i tumori del colon-retto possono presentare mutazioni in questi codoni, che tendono ad essere mutualmente esclusive. Le mutazioni dell'*HRAS*, terzo membro della famiglia *RAS*, sono, invece, meno frequenti nel tumore del colon-retto. Anche i risultati degli studi clinici, in cui la maggior parte dei pazienti con mutazioni di *KRAS* ed *NRAS* non ha risposto alla terapia anti-EGFR, hanno individuato i geni *RAS* come fattori possibili prognostici negativi. Inoltre, altri studi suggeriscono che la mutazione *V600E* del *BRAF* potrebbe rappresentare un fattore prognostico, anche se non chiaramente predittivo di risposta agli anti-EGFR. Precedenti studi con la terapie anti-EGFR in combinazione con regimi a base di oxaliplatino hanno mostrato *outcome* negativi in un sottogruppo di pazienti con mutazioni dell'esone 2 del *KRAS* e l'identificazione di altri sottogruppi di pazienti potrebbe influenzare la scelta della terapia.

In questo articolo vengono presentati i risultati di un'analisi prospettica-retrospettiva dei *marker* di efficacia, condotta nell'ambito di uno studio randomizzato di fase 3 in pazienti con tumore colo-rettale precedentemente non trattati e sottoposti a terapia con panitumumab+oxaliplatino, fluorouracile e leucovorin (FOLFOX4) o FOLFOX4 da solo. In particolare, è stato valutato l'effetto dello spettro completo di mutazioni attualmente caratterizzate di *RAS* (*KRAS* ed *NRAS*) e *BRAF* sulla *progression-free survival* (PFS) e sulla *overall survival* (OS).

Il *Panitumumab Randomized Trial in Combination with Chemotherapy for Metastatic Colorectal Cancer to Determine Efficacy* (PRIME) ha confrontato l'efficacia e la sicurezza in prima linea di panitumumab-FOLFOX4 versus FOLFOX4 da solo, secondo lo status mutazionale dell'esone 2 del *KRAS*, avendo come *endpoint* primario la PFS e come *endpoiont* secondari la OS e la sicurezza. Sono stati selezionati i campioni di tumore non mutati per l'esone 2 del *KRAS*. Sulla base di studi precedenti, sono state selezionate per la valutazione le mutazioni dell'esone 3 (codone 61) e 4 (codone 17 e 146) del *KRAS*, dell'esone 2 (codone 12 e 13), 3 (codone 61) e 4 (codoni 117 e 146) dell'*NRAS* e dell'esone 15 del *BRAF* (codone 600).

Dei 1.183 pazienti randomizzati nello studio, 1.096 (93%) erano stati valutati precedentemente per l'esone 2 del *KRAS* (di cui 656, o 60%, non presentava mutazione e 440, o 40%, presentava mutazione). Lo stato mutazionale dei geni in studio è stato valutato in 639 dei 656 pazienti senza mutazione dell'esone 2 del *KRAS*. Lo status mutazionale del *RAS* è stato valutato in 1.060 dei 1.183 pazienti randomizzati (90%). Di questi, 512 (48%) sono stati identificati come non mutati per *RAS* (nessuna mutazione negli esoni 2, 3 o 4 di *KRAS* o *NRAS*) e 548 (52%) come mutati. Dei 620 pazienti con dati valutabili per *RAS*, 118 (17%), che erano stati in origine definiti come non aventi mutazione dell'esone 2, presentavano altre mutazioni. Le caratteristiche cliniche e demografiche al basale, incluse la razza o l'etnia, l'età, l'*Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG) *performance status score*, le caratteristiche del tumore primario ed il numero di lesioni metastatiche, erano simili tra i pazienti con e senza mutazioni di *RAS*. Dei 619 pazienti senza mutazione dell'esone 2 di *KRAS* che potevano essere valutati per il *BRAF*, 53 (9%) avevano una mutazione *V600E*. In questi pazienti, le mutazioni del *BRAF* erano mutualmente esclusive rispetto alle mutazioni del *KRAS* e dell'*NRAS*. Al momento dell'analisi primaria nel 2009, il 54% dei pazienti era deceduta. Nei pazienti senza mutazioni dell'esone 2 del *KRAS* è stato riscontrato un miglioramento della PFS nel gruppo trattato con panitumumab+FOLFOX4 rispetto al gruppo trattato con FOLFOX4 (9.6 vs. 8.0 mesi,  $P = 0.02$ ) ed un miglioramento di 4.2 mesi nella OS, anche se non significativo (23.9 vs. 19.7 mesi,  $P = 0.07$ ). Al momento dell'analisi effettuata nel 2013, l'82% dei pazienti era deceduto. Sulla base di questa analisi, panitumumab+FOLFOX4 è stato associato ad un miglioramento di OS di 4.4 mesi, statisticamente significativo (23.8 mesi vs. 19.4 mesi,  $P = 0.03$ ). Nel sottogruppo di pazienti senza alcuna mutazione del *RAS*, il panitumumab+FOLFOX4 è stato associato con un miglioramento significativo della PFS (10.1 vs. 7.9 mesi,  $P = 0.004$ ) e della OS (26.0 vs. 20.2 mesi,  $P = 0.04$ ) rispetto al FOLFOX4. Nei 108 pazienti senza mutazione dell'esone 2 ma con altre mutazioni del *RAS*, la PFS e la OS sono risultate ridotte nel gruppo trattato con panitumumab+FOLFOX4, anche se la differenza non è risultata significativa. Questi dati sono in accordo con quelli ottenuti nel sottogruppo di pazienti con mutazione dell'esone 2, in cui la PFS è risultata significativamente minore nel gruppo trattato con panitumumab+FOLFOX4 rispetto a quello trattato solo con FOLFOX4 (7.3 vs. 8.8 mesi,  $P = 0.02$ ). I risultati dell'analisi aggiuntive indicano che gli effetti del trattamento differiscono tra i sottogruppi di pazienti senza mutazioni e quelli senza mutazioni dell'esone 2 del *KRAS* ma con altre mutazioni del *RAS*, suggerendo che queste mutazioni possano rappresentare fattori prognostici negativi ( $P = 0.04$  per la PFS e  $P = 0.01$  per la OS).

Nel sottogruppo senza mutazioni del *RAS* e del *BRAF*, il trattamento con panitumumab+FOLFOX4 è stato associato con un miglioramento della PFS di 1.6 mesi e di OS di 7.4 mesi rispetto al FOLFOX4 da solo. Nel gruppo di pazienti senza mutazioni di *RAS* ma con mutazioni di *BRAF*, invece, le differenze tra i due trattamenti non sono risultate significative. Le mutazioni del *BRAF* sono state associate con una ridotta OS tra i pazienti senza mutazioni dell'esone 2 del *KRAS* e tra quelli con mutazione dell'esone 3 di *NRAS*. L'incidenza, il tipo e la severità delle reazioni avverse nei pazienti senza mutazioni di *RAS* trattati con panitumumab+FOLFOX4 erano simili a quelle riportate precedentemente nel gruppo senza mutazioni dell'esone 2 trattati con lo stesso regime terapeutico. Il profilo di sicurezza per i pazienti con mutazioni di *RAS* era simile a quello riportato per i pazienti con mutazione dell'esone 2 del *KRAS*.

La valutazione delle mutazioni dell'esone 2 del *KRAS* viene attualmente raccomandata per determinare l'eleggibilità alla terapia con anti-EGFR dei pazienti con carcinoma metastatico del colon-retto. Anche se il test del *KRAS* ha facilitato la selezione dei pazienti con maggiori probabilità di rispondere alla terapia con anti-EGFR, una grande percentuale non ne trae comunque beneficio. È auspicabile che ulteriori *markers* genetici specifici possano consentire una più accurata selezione dei pazienti che beneficeranno di un particolare trattamento, evitando quindi l'esposizione al rischio di effetti avversi in quelli in cui è improbabile una risposta terapeutica. La valutazione dei *biomarker* è stata, così, ampliata per includere mutazioni della via dell'EGFR, oltre a quelle dell'esone 2 del *KRAS*. In questo studio è stata effettuata una valutazione dell'ipotesi che mutazioni addizionali attivanti del *RAS* possano predire la non-risposta al panitumumab. È stato osservato un effetto negativo del trattamento con panitumumab+FOLFOX4 sulla PFS e sulla OS in pazienti senza mutazioni dell'esone 2 del *KRAS* ma con altre mutazioni di *RAS*. I dati ottenuti suggeriscono che i pazienti con qualsiasi mutazione attivante del *RAS* non beneficiano e potrebbero essere danneggiati dalla terapia con panitumumab+FOLFOX4. Infine, nel sottogruppo di pazienti senza mutazioni di *RAS* e *BRAF* è stato osservato un incremento di OS di 7.4 mesi nel gruppo trattato con panitumumab+FOLFOX4, confermando che le mutazioni del *BRAF* *V600E* sono indice di prognostici negativi.

In conclusione, le mutazioni del *RAS*, in aggiunta a quelle dell'esone 2 del *KRAS*, predicono una mancanza di risposta alla terapia anti-EGFR in pazienti con tumore metastatico del colon-retto. In questi pazienti, la terapia con panitumumab e oxaliplatino non si è dimostrata utile. Il rapporto beneficio-rischio di panitumumab+FOLFOX4 è stato migliorato escludendo i pazienti con mutazioni del *RAS*. Ulteriori studi o metanalisi sono necessari per confermare questi dati.

Lo studio è stato supportato da Amgen, dal *Royal Marsden Hospital*, dall'*Institute of Cancer Research*, dal *National Institute for Health Research*, dal *Biomedical Research Centre* e dalla Fondazione Onlus Oncologia Ca' Grande. Nel precedente articolo relativo allo studio PRIME (*Douillard J. J Clin Oncol 2010, 28:4697-4705*), alcuni autori hanno indicato relazioni, con compenso o meno, con alcune aziende farmaceutiche tra cui l'Amgen.

**Parole chiave:** Carcinoma colo-rettale, panitumumab-FOLFOX4, *RAS*, *BRAF*

#### Riferimento bibliografico

[Douillard JY](#) et al. *N Engl J Med* 2013, 369(11):1023-34.

---

## STUDIO DI ASSOCIAZIONE GENOME-WIDE PER L'IDENTIFICAZIONE DI BIOMARCATORI PER RAPAMICINA ED EVEROLIMUS UTILIZZANDO UN SISTEMA DI LINEE CELLULARI LINFOBLASTOIDI

A cura del Dott. Gabriele Stocco

La proteina mTOR, bersaglio molecolare della rapamicina in cellule di mammifero, è una chinasi che agisce a valle della pathway di PI3K/AKT ed è un regolatore critico di funzioni cellulari di base, dotato di un ruolo importante nella progressione tumorale. L'attivazione di mTOR dipende dallo stato nutrizionale della cellula

e promuove crescita, proliferazione, motilità e metabolismo, attraverso la regolazione di un ampio spettro di attività cellulari come traduzione, trascrizione e degradazione degli mRNA, la stabilità delle proteine, l'organizzazione del citoscheletro e l'autofagia. La funzione meglio studiata di mTOR nelle cellule di mammifero è la regolazione della traduzione proteica attraverso gli effettori chiave a valle del complesso mTORC1, ovvero la chinasi ribosomiale S6 (S6K) e la proteina di legame del fattore di iniziazione eucariotico 4E (4EBP1). S6K è la chinasi principalmente coinvolta nella fosforilazione di S6. La fosforilazione di S6 da parte di S6K aumenta selettivamente la traduzione di mRNA contenente un motivo caratterizzato da una sequenza di pirimidine, che codificano per proteine ribosomiali e altri regolatori della trascrizione, aumentando in questo modo la capacità traduttiva complessiva della cellula. 4EBP1 agisce come un repressore della traduzione degli mRNA attraverso il legame e l'inibizione del fattore eucariotico di iniziazione della traduzione 4E (eIF4E), che riconosce l'estremità 5' degli mRNA eucariotici. La fosforilazione di 4EBP1 da parte di mTOR determina la dissociazione di 4EBP1 da eIF4E, rimuovendo quindi l'inibizione della traduzione determinata da 4EBP1 e dipendente da eIF4E. Siccome l'attività aberrante della pathway PI3K/AKT/mTOR è osservata comunemente nel cancro, gli inibitori di mTOR (come everolimus, deferolimus e temsirolimus) sono stati studiati ed hanno un ruolo emergente come promettenti agenti terapeutici per il trattamento di vari tipi di tumore, come i carcinoma di rene, mammella, polmone non a piccole cellule ed endometrio, del glioblastoma ed del linfoma a cellule a mantello. L'uso di inibitori di mTOR è comunque associato ad effetti avversi severi come nefrotossicità, immunosoppressione, reazioni cutanee, mucosite e mielosoppressione. Molti fattori contribuiscono alla risposta agli inibitori di mTOR e la variabilità genetica ha un ruolo importante. Per massimizzare l'efficacia e la sicurezza degli inibitori di mTOR, c'è un'esigenza critica di identificare biomarcatori genetici della risposta a questi farmaci, da utilizzare per la personalizzazione della terapia con inibitori di mTOR. In questo studio, l'obiettivo è stato di identificare nuovi candidati farmacogenomici che possano contribuire alla variabilità nella risposta a due inibitori di mTOR, la rapamicina (sirolimus) e l'everolimus, utilizzando un sistema di linee cellulari costituito da 300 linee linfoblastoidi umane (LCLs) stabilizzate a partire da cellule di individui appartenenti a tre diversi gruppi etnici (africano, asiatico e caucasico). Su queste linee è stata valutata la citotossicità dei due inibitori di mTOR in termini di curve concentrazione effetto, mediante il saggio MTS, considerando in particolare l'area sotto la curva (AUC). Inoltre informazioni genomiche approfondite sono state ottenute per queste linee cellulari, comprendenti approssimativamente la caratterizzazione di 1,3 milioni di SNPs, dell'espressione di 54.613 sonde per mRNA e di 228 per microRNA. Questo sistema è stato utilizzato precedentemente con successo per l'identificazione di biomarcatori genetici associati alla risposta a diversi agenti anti-neoplastici, come per esempio la citarabina o la gemcitabina (Li et al., *Cancer Res* 2008, 68: 7050-7058), e per l'interpretazione di risultati emersi da analisi genome-wide, come per esempio quelli riguardanti la farmacogenomica degli effetti avversi indotti dagli inibitori dell'aromatasi a carico dell'apparato muscolo scheletrico (Ingle et al., *J Clin Oncol* 2010, 28: 4674-4682). Nel presente studio gli autori hanno eseguito un'analisi di associazione genome-wide fra i fenotipi di citotossicità, i polimorfismi genetici ed i livelli di espressione di mRNA e microRNA. Sono stati quindi validati 13 geni ed un microRNA, emersi come i più significativi dall'analisi di associazione, effettuando i knock-down dei geni mediante siRNA, seguito dal saggio di citotossicità MTS in linee cellulari di tumori umani (fibroblasti umani diploidi IMR-90, cellule di carcinoma renale Caki2, cellule di glioma umano U87) e da quello di formazione delle colonie (eseguito solamente sulla linea Caki2). L'analisi genome-wide ha permesso di identificare 16 probe-sets per mRNA, corrispondenti a geni, associati alla citotossicità di entrambi gli inibitori di mTOR, valutata in termini di AUC. Centoventisette e cento SNPs hanno dimostrato un'associazione con un p-value inferiore a  $10^{-4}$ , mentre 8 e 10 SNPs hanno registrato un p-value inferiore a  $10^{-5}$ , per l'AUC rispettivamente di rapamicina ed everolimus. Sette geni per la rapamicina e quattro per l'everolimus contenevano più di uno SNP associato in maniera significativa con un p-value inferiore a  $10^{-4}$ ; fra questi, il trasportatore ABCC1 e MCTP2 sono risultati in comune fra i due farmaci. Gli studi funzionali hanno indicato che 13 geni hanno alterato la sensibilità ad almeno uno dei due inibitori di mTOR testati in almeno uno dei modelli cellulari considerati negli esperimenti di validazione. I geni sono: *BTG2*, *FBXW7*, *STAU1*, *GIMAP7*, *PHLDA1*, *NDUFAF2*, *SLC39A9*, *GIMAP1*, *ECOP*, *MGLL*, *PBX3*, *ZNF765*, *GIMAP6*. Inoltre un microRNA, miR-10a è risultato associato in maniera significativa con i valori di AUC e si è dimostrato in grado di ridurre l'espressione di geni associati con l'AUC e desensibilizzare le cellule ad entrambi i farmaci.

L'analisi farmacogenomica basata sull'uso di un modello di linee linfoblastoidi umane ed un'analisi genomica estensiva ha permesso di identificare una serie di nuovi geni candidati e un microRNA che potrebbero contribuire alla variabilità interindividuale nella risposta agli inibitori di mTOR; questi biomarcatori innovativi necessitano naturalmente ancora di una validazione clinica.

**Parole chiave:** mTOR, farmacogenomica, associazione genome-wide, rapamicina, everolimus.

#### Riferimento bibliografico

Jiang J et al. *Front Genet* 2013, 4:166.

## FARMACOGENETICA DEI TRASPORTATORI ABC E SLC IN PAZIENTI CON CANCRO METASTATICO AL COLON RETTO CHE RICEVONO TERAPIA DI PRIMA LINEA FOLFIRI (IRINOTECANO, 5-FLUOROURACILE, LEUCOVORIN)

A cura della Dott.ssa Eleonora Turrini

La terapia di associazione irinotecano, 5-fluorouracile e leucovorin (FOLFIRI) rappresenta la terapia di prima linea per il cancro metastatico al colon retto. Di recente, bevacizumab e cetuximab sono stati aggiunti alla terapia FOLFIRI per migliorarne l'efficacia. Nonostante i tentativi di ottimizzazione della terapia, in alcuni pazienti si riscontra ancora risposta subottimale, fallimento terapeutico o effetti collaterali tossici. Negli ultimi anni, la farmacogenomica è stata estensivamente utilizzata per l'ottimizzazione della terapia in pazienti affetti da cancro al colon retto. In particolare, nelle terapie basate sull'irinotecano è stato validato il polimorfismo rs8175347 in UGT1A1 per la valutazione della tossicità del farmaco. Polimorfismi in geni che codificano per SLC ed ABC si sono dimostrati avere un ruolo critico nella modulazione del profilo farmacocinetico e nell'accumulo del farmaco nel tessuto target per molti farmaci, incluso l'irinotecano, con un impatto sulla tossicità e sulla risposta del tumore in differenti modelli clinici. Scopo del presente studio è stato quello di valutare il valore predittivo/prognostico di polimorfismi nei trasportatori SLC ed ABC sulla risposta e sull'*overall survival* (OS) di pazienti bianchi affetti da cancro al colon retto e trattati con terapia FOLFIRI. Inoltre, scopo secondario è stato quello di valutare il ruolo di questi *marker* genetici sul rischio tossicologico legato a questo trattamento.

La popolazione del presente studio è la stessa reclutata dallo studio precedentemente condotto da Toffoli e colleghi sulla farmacogenomica di UGT1A (Toffoli e coll, 2006). I pazienti sono stati seguiti da Febbraio 2002 fino a Novembre 2005, sul loro DNA è stato valutato un *panel* di polimorfismi codificanti per i geni SLC/ABC con lo scopo principale di valutare la risposta al trattamento (RR). Un totale di 267 pazienti sono stati trattati con regime FOLFIRI e RR è stata valutata in pazienti che sono stati sottoposti ad almeno 4 cicli di terapia. Per RR intendiamo l'intero gruppo di pazienti che manifestano quindi sia risposta parziale (PR) che risposta completa (CR). La tossicità è stata classificata come ematologica (neutropenia, anemia, leucopenia e trombocitopenia) e non ematologica (diarrea, nausea, vomito, astenia, alopecia, anoressia, infezioni). Le informazioni sulla sopravvivenza e sulla progressione della malattia sono state ottenute da un *follow-up* sempre attivo. OS è stata misurata dalla prima somministrazione della terapia fino alla morte del soggetto o all'ultimo *follow-up*. Il tempo alla progressione della patologia (TTP) è stato calcolato come il tempo dalla prima somministrazione terapeutica alla data della prima progressione o all'ultimo *follow-up*. Dei 267 pazienti arruolati, 250 sono stati considerati idonei ed inclusi nello studio per l'analisi dei polimorfismi nei trasportatori verso OS e tossicità. Di questi 250 pazienti, 238 raggiungevano RR e 232 potevano essere analizzati per TTP. Sono stati valutati 39 *marker* molecolari, che includono polimorfismi in geni dei trasportatori ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCG2 e SLCO1B1.

Le caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti ed i dati inerenti la farmaco genetica di UGT1A sono stati resi noti nella precedente pubblicazione di Toffoli. Tutte le varianti in esame sono risultate in equilibrio di Hardy-Weinberg. Alcune varianti genetiche del trasportatore ABCG2 sono risultate correlate in modo significativo a RR. In particolare, ABCG2 -15622C>T è stato associato ad una minor risposta del tumore al trattamento ( $P = 0.0087$ ), mentre rs7699188 è stato associato con una migliore risposta ( $P = 0.0071$ ). Per analizzare le interazioni tra fattori genetici e non genetici, utili soprattutto quando si ha a che fare con fenotipi multifattoriali e complessi come la risposta del tumore alla terapia, è stata usata un'analisi di classificazione e regressione ad albero (CART) che confronta i pazienti responsivi con i non responsivi alla

terapia FOLFIRI. Il metodo CART porta alla suddivisione dei pazienti in 7 sottogruppi in base al genotipo/aplotipo e caratteristiche clinico-demografiche con differenti probabilità di ottenere risposta parziale al trattamento. Si ottengono 3 gruppi altamente responsivi, uno a risposta intermedia e 3 gruppi con bassa risposta. Il metodo CART mette in relazioni prima di tutto l'aplotipo II di UGT1A che ha interazioni significative con i *marker* genetici ABC/SLC.

Al termine dello studio l'88,8% dei pazienti era andata incontro a progressione del tumore, mentre l'11,2% no. Nessuno dei *marker* genetici ABC/SLC in studio è stato correlato a TTP in maniera significativa. All'ultimo *follow-up* il 48% dei pazienti era ancora vivo, mentre il restante 52% era morto. Il polimorfismo rs2032582 del gene ABCB1 è risultato l'unico associato in modo significativo a OS ( $P = 0.0074$ ), in particolare ad una più lunga sopravvivenza, anche in seguito a *log-rank test* ( $P = 0.0051$ ). Per quel che riguarda l'associazione dei polimorfismi in studio con la tossicità della terapia, rs7699188 in ABCG2 è stato associato a severa tossicità ( $P < 0.01$ ), in particolare al rischio di sviluppare il grado 3-4 di tossicità non ematologica al primo ciclo di chemioterapia, in accordo a un modello genetico recessivo ( $P = 0.0012$ ). Inoltre, è stata investigata l'associazione tra questi polimorfismi risultati significativi ed i parametri farmacocinetici. I dati relativi ai parametri farmacocinetici erano disponibili per soli 71 pazienti e non sono state trovate correlazioni significative con la farmacocinetica dell'irinotecano.

Lo studio dimostra che due polimorfismi nel gene ABCG2, -15622C>T e rs7699188 sono associati alla risposta al trattamento con irinotecano (regime terapeutico FOLFIRI) in pazienti con tumore metastatico al colon retto. Inoltre, rs7699188 è stato correlato ad una severa tossicità non ematologica del trattamento. L'indagine sulla relazione tra i *marker* genetici dei trasportatori ABC/SLC, i polimorfismi su UGT1A e i parametri clinici di base indica che varianti di ABC/SLC hanno particolare rilevanza per pazienti non omozigoti per l'aplotipo II di UGT1A. Infine, è emerso che la variante rs2032582 in ABCB1 migliora la OS dei pazienti.

Sebbene lo studio includa numerosi pazienti trattati secondo la stessa terapia, si tratta di uno studio retrospettivo e conferme in *trial* futuri sono necessarie per meglio chiarire il ruolo di questi polimorfismi nella regolazione dei geni e nella risposta al trattamento. Questo è particolarmente interessante quando si considera la complessità della risposta del fenotipo tumorale in quanto deriva da un sistema multifattoriale e complesso. Un gruppo di controllo di pazienti non trattati o trattati con differente terapia sarebbe necessario per discriminare i *marker* genetici associati in modo predittivo e prognostico alla sopravvivenza del paziente. In conclusione, questo studio dimostra come polimorfismi nei geni ABC/SLC, responsabili del trasporto del farmaco, abbiano un ruolo cruciale nella risposta alla terapia FOLFIRI. Questo rappresenta un ulteriore contributo verso la terapia personalizzata.

**Parole chiave:** cancro al colon retto, terapia FOLFIRI, trasportatori ABC/SLC

#### Riferimento bibliografico

[De Mattia E](#) et al. *Pharmacogenet Genomics* 2013, 23(10):549-57.

## I POLIMORFISMI DEGLI ENZIMI GLUTATIONE S-TRANSFERASI T1, O1 ED O2 SONO ASSOCIATI ALLA SOPRAVVIVENZA NEI PAZIENTI CON CARCINOMA VESCICALE INFILTRANTE

A cura del Dott. Vittorio Simeon

Le glutatione transferasi (GST) sono una superfamiglia di enzimi detossificanti di fase II, fondamentali per la biotrasformazione degli xenobiotici endogeni ed esogeni. La famiglia delle GST citosoliche ha differenti classi: Alpha (GSTA), Mu (GSTM), Pi (GSTP), Omega (GSTO) e Theta (GSTT). È noto dalla letteratura che una modificazione dell'espressione di GSTA1, GSTM1 e GSTO1 è in grado di influenzare il rischio del carcinoma a cellule transietti (TCC) della vescica. Infatti, un'attività up-regolata delle GST è elemento caratteristico di un fenotipo maligno della TCC ed è considerato importante per la progressione fenotipica maligna della forma tumorale. L'attività enzimatica delle proteine GST può modificare l'efficacia di numerosi farmaci antitumorali utilizzati nel trattamento dei pazienti con TCC. È di conseguenza ragionevole

ipotizzare che polimorfismi noti a carico delle GST possano avere un ruolo prognostico e/o farmacogenomico nei pazienti TCC, specialmente nel caso dei tumori infiltranti (muscolo-invasivi).

Sia i protocolli MVAC (metotressato, vinblastina, doxorubicina e cisplatino) che GC/Cis (gemcitabina e cisplatino) utilizzati nel trattamento dei pazienti tumore infiltrante contengono farmaci (cisplatino e doxorubicina) substrati di GSTP. Il polimorfismo Ile105Val di GSTP1 influenza significativamente l'attività enzimatica dello stesso ed è associato all'outcome clinico di pazienti in chemioterapia a base di platino. In aggiunta a GSTP1, il genotipo attivo di GSTT1 influenza la capacità della doxorubicina e della ciclofosfamida di produrre danno ossidativo al DNA. Recentemente, è stato suggerito che i polimorfismi a carico dei geni codificanti per i membri della classe omega GSTO1-1 e GSTO2-2 possono influenzare il livello di stress ossidativo, sebbene il meccanismo di differente funzione proteica delle varie isoforme non sia ancora ben chiaro. L'ipotesi è che anche i polimorfismi a carico delle GST omega possano comportare differenze interindividuali nella risposta ai protocolli chemioterapici della TCC.

Nello studio proposto da Djukic TI et al. su *Plos One* è stata esaminata l'associazione dei polimorfismi a carico delle singole GST (GSST1 attivo/nulla, GSTP1/rs1695, GSTO1/rs4925, GSTO2/rs156697, GSTM1 e GSTA1/rs3957357) con la sopravvivenza a 5 anni di 105 pazienti con tumore della vescica muscolo-invasivo.

I pazienti con tumore della vescica infiltrante sono stati selezionati da una coorte più ampia di 200 pazienti di nuova diagnosi per TCC reclutati in uno studio precedente presso la Clinica di Urologia di Belgrado. Tutti i partecipanti hanno provveduto a fornire consenso informato scritto e il protocollo di studio è stato approvato dal comitato etico della facoltà di medicina di Belgrado. Per l'analisi di sopravvivenza a 5 anni, il follow-up è iniziato con la diagnosi della malattia ed è terminato con il decesso del paziente o alla conclusione dello studio che è avvenuta il 1° Novembre 2012. Tutti i pazienti arruolati hanno ricevuto la terapia neoadiuvante MAVC o la combinazione gemcitabina e cisplatino. Dopo aver isolato il DNA da sangue periferico, i polimorfismi sono stati determinati mediante le tecniche di PCR-RFLP (polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism) e di multiplex PCR. Il valore predittivo dei differenti genotipi di GST per la sopravvivenza generale è stato analizzato tramite un modello di regressione di Cox, aggiustato per i fattori di confondimento clinici.

Il follow-up medio dei pazienti era di  $38.22 \pm 23.1$  mesi (con un range da 1 a 66 mesi). Dei 105 pazienti, l'analisi genotipica di tutti i polimorfismi è stata completata in 101 casi. Dei 101 pazienti genotipati, 62 pazienti sono deceduti (61.4%) per il carcinoma alla vescica e 12 pazienti (11.9%) sono stati persi durante il follow-up. La distribuzione dei genotipi era in accordo con i dati di letteratura.

La presenza del genotipo attivo di GSTT1 era un fattore predittivo indipendente di alto rischio di mortalità generale tra i pazienti con TCC (HR=2.5, 95% CI: 1.1 – 5.5; P=0.028). Per quanto riguarda il polimorfismo GSTP1, i portatori dell'allele *Ile* avevano un rischio più alto di mortalità (HR=2.1, 95% CI: 0.7 – 5.9; P=0.175), ma questo rischio non era statisticamente significativo. Nell'analisi del polimorfismo di GSTO1, la presenza di due alleli mutanti (Asp140Asp) era un fattore indipendente di rischio per la mortalità generale (HR=2.9, 95% CI: 1.2 – 7.4; P=0.022). Analogamente a GSTO1, la presenza di entrambi gli alleli mutanti di GSTO2 (Asp142Asp) era un predittore indipendente di elevato rischio. Questo genotipo ha mostrato l'effetto più pronunciato in termini di rischio di mortalità (HR=3.9, 95% CI: 1.8 – 8.9; P=0.001). Non è stata evidenziata invece alcuna associazione con la sopravvivenza dei pazienti per i polimorfismi degli enzimi GSTM1 e GSTA1.

Nel presente studio è stato messo in evidenza come il genotipo attivo di GSTT1 e i genotipi omozigoti mutanti di GSTO1 e GSTO2 siano associati ad una peggiore prognosi ed una sopravvivenza inferiore nei pazienti con cancro della prostata muscolo-invasivo trattati con chemioterapia a base di cisplatino o doxorubicina.

Ci sono alcune limitazioni in questo studio che devono essere prese in considerazione. Il numero relativamente piccolo dei pazienti e dei polimorfismi studiati potrebbe essere fonte di bias, tale da influenzare i risultati dello studio. In più, i pazienti sono stati trattati con regimi polichemioterapici e di conseguenza è difficile stabilire l'effetto dei polimorfismi delle GST sull'outcome clinico per ogni singolo farmaco. Ciononostante, questo studio può offrire alcune informazioni importanti ed essenziali che possono essere da base per futuri studi longitudinali specialmente per quanto riguarda i polimorfismi della classe omega, che nello studio di Djukic et al. hanno mostrato l'associazione maggiore come fattori predittivi di mortalità.

Il genotipo attivo di GSTT1, le varianti Asp140Asp di GSTO1 e Asp142Asp di GSTO2 sono associate ad una prognosi peggiore ed una sopravvivenza inferiore in pazienti con carcinoma della vescica infiltrante trattati con chemioterapia a base di cisplatino o doxorubicina

**Conflitto d'interesse:** gli Autori non dichiarano alcun conflitto di interesse.

**Parole chiave:** Glutazione Transferasi, carcinoma vescica, cisplatino, doxorubicina

#### Riferimento bibliografico

[Djukic TI](#) et al. *PLoS One* 2013, 8(9):e74724.

## IL POLIMORFISMO NEL GENE CODIFICANTE PER L'ENZIMA PARAOXONASE-1 NON INFLUENZA LA VARIABILITÀ DI RISPOSTA AL CLOPIDOGREL MA È ASSOCIATO CON GLI OUTCOME CLINICI DOPO INTERVENTO PERCUTANEO CORONARICO

A cura della Dott.ssa Valeria Conti

Il clopidogrel, in combinazione con la cardioaspirina, rappresenta la terapia di prima linea per la prevenzione degli eventi ischemici nei pazienti con malattia coronarica (Coronary Artery Disease, CAD) specialmente in quelli che hanno subito un intervento coronarico percutaneo (Percutaneous Coronary Intervention, PCI). Nonostante il suo utilizzo sia molto diffuso, esiste una grande variabilità interindividuale nella risposta al clopidogrel ed è stato suggerito che il 70% di tale variabilità sia attribuibile a fattori genetici. Recentemente è stato osservato che lo SNP Q192R nel gene codificante per l'enzima antiossidante Paraoxonase-1 (PON-1) è strettamente correlato alla bio-attivazione del clopidogrel, al suo effetto sulla reattività piastrinica e, più in generale, agli out-come clinici relativi agli eventi trombotici. Studi successivi non hanno confermato l'esistenza di un'associazione tra lo SNP e la variabilità di risposta al clopidogrel, ma alcuni ricercatori hanno suggerito che il genotipo PON-1 possa essere correlato con gli esiti clinici a lungo termine nei pazienti con CAD. Questo studio è stato pianificato per verificare l'esistenza di tale associazione in pazienti con CAD dopo un intervento d'impianto di uno stent medicato.

Dal giugno 2006 al Giugno 2010 sono stati arruolati 1676 pazienti coreani cui era stato impiantato uno stent medicato. I criteri di esclusione comprendevano l'esistenza di controindicazioni all'uso di aspirina, clopidogrel o eparina, la somministrazione per via sistemica d'inibitori del recettore per la glicoproteina IIb/IIIa entro cinque giorni precedenti il test di reattività piastrinica, l'uso concomitante di cilostazolo e la tendenza al sanguinamento. Per valutare l'effetto inibitorio del clopidogrel sulla reattività piastrinica è stato utilizzato il test "VerifyNow P2Y12". Inoltre, su campioni di sangue prelevati a digiuno il giorno dell'intervento di PCI è stato valutato il profilo lipidico mediante la quantizzazione del colesterolo totale, LDL, HDL e dei trigliceridi. L'analisi genetica del polimorfismo di PON-1 (Q192, rs662) è stata svolta mediante Real time PCR con sonda TaqMan. L'end-point primario, fissato a dodici mesi, comprendeva dati relativi a morte cardiaca, infarto del miocardio non fatale e trombosi.

Considerati i criteri di esclusione, 1336/1676 pazienti sono stati ritenuti eleggibili per questo studio e la genotipizzazione dello SNP Q192R è stata eseguita con successo nel 98% dei casi. Le frequenze alleliche osservate (in equilibrio di Hardy-Weinberg) sono state QQ (13,4%); QR (47,6%) e RR (39%). L'end-point primario è stato registrato nell'1,4% dei campioni, ossia in diciannove soggetti, durante il primo anno. Dopo aggiustamento per i fattori comuni di rischio cardiovascolare, il genotipo QQ/RR è stato riconosciuto come un predittore indipendente di eventi trombotici. Al contrario, lo stesso genotipo non è stato associato con l'azione del clopidogrel sulla reattività piastrinica, ma con la presenza di alti livelli di LDL con piccolo diametro. L'aumento del rischio trombotico è risultato molto più elevato nei pazienti per i quali l'indicazione all'intervento era la sindrome coronarica acuta (Acute Coronary Syndrome, ACS) rispetto ai non ACS.

La relazione tra PON-1 Q192R e gli esiti clinici in pazienti con CAD è stata ricercata nel corso di altri studi producendo però, risultati controversi. I dati dello studio, qui recensito, sono in linea con alcuni degli studi precedenti nei pazienti con CAD, ma si riferiscono a una popolazione selezionata di soggetti con CAD che avevano subito l'impianto di PCI con uno stent medicato. Alcuni autori avevano già osservato una stretta relazione tra la variante Q192R di PON-1 e il metabolismo del clopidogrel e con gli out-come trombotici identificando nell'attività enzimatica del paraoxonase-1 una tappa cruciale per la bio-attivazione del farmaco

antiaggregante. Comunque, queste evidenze non spiegavano l'associazione tra il genotipo PON-1 e gli esiti clinici in molti pazienti che non erano in terapia con il clopidogrel e, inoltre, studi successivi (compreso il presente) hanno posto seri dubbi sull'effettiva esistenza di tale associazione. PON-1 è un enzima associato alle lipoproteine ad alta densità (HDL) che possiede attività antiossidante e anti-aterogena. E' ben noto che livelli bassi delle HDL e alti delle LDL (lipoproteine a bassa densità) sono associati con l'aumento del rischio cardiovascolare. In questo studio è stata trovata una relazione importante tra l'allele Q di PON-1 Q192R e l'aumento della concentrazione di LDL con piccolo diametro. Questo dato potrebbe spiegare il motivo per cui i soggetti QQ/QR son esposti a un rischio trombotico più alto dei wild type, RR.

Questo studio ha diverse limitazioni. Una di queste è la mancanza di una misura dell'attività di PON-1, anche se altri autori hanno mostrato che l'allele 192Q è associato con un'attività bassa dell'enzima. Inoltre, le frequenze alleliche trovate sono molto differenti da quelle riportate in altre popolazioni e i dati non possono essere quindi estrapolati agli individui occidentali e viceversa. Infine, i risultati non possono essere applicati a tutti i pazienti con CAD perché si riferiscono esclusivamente ai soggetti con CAD dopo intervento d'impianto di stent medicato.

Il polimorfismo Q192R del gene PON-1 può rappresentare un marker di peggioramento degli esiti clinici cardiovascolari, indipendentemente dalla funzione piastrinica, in pazienti con sindrome coronarica acuta dopo intervento d'impianto di uno stent medicato. Inoltre, tale variante genica è associata a livelli più elevati delle LDL con piccolo diametro. Il genotipo PON-1 potrebbe essere considerato come un nuovo fattore di rischio per gli eventi avversi dopo PCI.

**Parole chiave:** clopidogrel, Paraoxonase-1, reattività piastrinica, stent medicato, LDL.

#### Riferimento bibliografico

[Park KW](#) et al. *PLoS One* 2013, 8(2):e52779.

---

## LO STATO DI METILAZIONE NEL GENE DELL'INTERLEUCHINA-11 PREDICE LA RISPOSTA CLINICA AGLI ANTIDEPRESSIVI NEI PAZIENTI ARRUOLATI NELLO STUDIO GENDEP

A cura della Dott.ssa Sarah Carginin

Gli antidepressivi costituiscono una classe eterogenea di farmaci utilizzati per il trattamento di prima linea del disturbo depressivo maggiore. Circa due terzi dei pazienti in terapia non risponde al trattamento con il primo farmaco antidepressivo prescritto e la remissione viene raggiunta da solo un terzo dei pazienti trattati. Recentemente, lo studio di associazione genome-wide *Genome-based Therapeutic Drugs for Depression* (GENDEP) ha evidenziato il ruolo del polimorfismo rs1126757 nel gene dell'interleuchina-11 (IL-11) come fattore predittivo di risposta ad escitalopram, un inibitore selettivo della ricaptazione di serotonina (Uher R et al, 2012). Studi successivi hanno dimostrato come, in seguito al trattamento con escitalopram, si verifichi una riduzione dell'espressione dell'IL-11 nei pazienti responder alla terapia. Tale variazione dell'espressione genica sembra essere inoltre parzialmente influenzata dallo SNP IL-11 rs1126757. È noto in letteratura come anche lo stato di metilazione del DNA influisca sulla trascrizione, sull'espressione genica e sulla patofisiologia dei disturbi dell'umore. Pertanto, gli obiettivi di questo studio sono stati:

- 1) valutare lo stato di metilazione del DNA come fattore predittivo della risposta agli antidepressivi, indipendentemente dal farmaco somministrato e dal genotipo del paziente
- 2) determinare il ruolo dello stato di metilazione del DNA come fattore predittivo di risposta allo specifico farmaco somministrato (escitalopram o nortriptilina)
- 3) analizzare una possibile interazione tra il genotipo del polimorfismo rs1126757 e lo stato di metilazione del DNA come fattore predittivo della risposta al trattamento con antidepressivi.

Lo studio è stato condotto su 113 pazienti Caucasiche affetti da depressione maggiore e selezionati in modo random tra quelli arruolati per il progetto GENDEP (N=868), uno studio farmacogenetico, multicentrico, in aperto, a due bracci terapeutici (escitalopram/nortriptilina).

*Criteri di esclusione dello studio GENDEP:* storia personale o familiare di schizofrenia o disturbo bipolare; dipendenza da sostanze di abuso; resistenza primaria ad escitalopram/nortriptilina accertata in terapia antecedente l'inizio dello studio. Dei 113 pazienti in esame, 80 erano in trattamento con escitalopram e 33 con nortriptilina. La risposta alla terapia antidepressiva è stata valutata come variazione percentuale del punteggio della scala MADRS al termine della dodicesima settimana di trattamento: maggiore è la variazione percentuale del punteggio, migliore è la risposta alla terapia. Lo studio di associazione genome-wide GENDEP ha originato i dati relativi al genotipo dei pazienti per il polimorfismo rs1126757. L'analisi dello stato di metilazione del DNA è avvenuta tramite sequenziamento con tecnologia EPiTyper Sequenom MassARRAY.

Sono state analizzate 18 unità CpG nell'isola CpG dell'IL-11; di queste, solo 11 hanno superato le analisi di controllo di qualità. La regressione lineare univariata ha rivelato che un basso grado di metilazione dell'unità CpG numero 5 è associato ad una migliore risposta al trattamento con antidepressivi, indipendentemente dal farmaco somministrato e dal genotipo del paziente ( $P=0.005$ ,  $q=0.055$ ). Lo stato di metilazione dell'unità CpG numero 4 è risultato essere un fattore predittivo della risposta allo specifico farmaco somministrato: infatti, un elevato grado di metilazione dell'unità CpG numero 4 è risultato significativamente associato ad una migliore risposta ad escitalopram ed a una peggiore risposta a nortriptilina ( $P=0.005$ ,  $q=0.055$ ). In aggiunta a ciò, è emerso che l'interazione tra lo stato di metilazione dell'unità CpG numero 11 ed il genotipo del polimorfismo rs1126757 è un fattore predittivo della risposta al trattamento con antidepressivi ( $P=0.002$ ,  $q=0.055$ ). I pazienti con genotipo GG e con un elevato grado di metilazione dell'unità CpG numero 11 rispondono meglio al trattamento rispetto ai soggetti con genotipo AA. Non è stato, invece, riscontrato tale effetto nei pazienti con genotipo AG.

*Limiti dello studio:* a) le differenze rilevate nel grado di metilazione dell'isola CpG in IL-11 sono piccole e unità-specifiche; b) il grado di metilazione del DNA estratto da sangue potrebbe essere differente da quello riscontrato nel DNA cerebrale; c) la metodica utilizzata non ha consentito di rilevare lo stato di metilazione di tutti i siti CpG.

A fronte di questi limiti, questo studio dimostra per la prima volta il potenziale utilizzo di biomarkers farmaco-epigenetici come fattori predittivi della risposta al trattamento con farmaci antidepressivi. Lo stato di metilazione di specifiche unità nell'isola CpG del gene IL-11 è risultato essere un fattore predittivo della risposta alla terapia e del tipo di farmaco antidepressivo somministrato. Numerosi studi in letteratura riportano un'alterazione dei livelli di citochine pro-infiammatorie (IL-1 $\beta$ , IL-6, INF- $\gamma$ ) nei pazienti affetti da depressione maggiore, suggerendo l'up-regulation della risposta infiammatoria come uno dei meccanismi patofisiologici del disturbo depressivo. E' inoltre crescente l'evidenza dell'impatto della terapia antidepressiva sul release di citochine anti e pro-infiammatorie. Nello specifico, elevati livelli sierici di IL-6 e TNF- $\alpha$  sono stati riscontrati nei pazienti affetti da depressione maggiore ed in quelli resistenti al trattamento con escitalopram. L'interleuchina-11 e IL-6, funzionalmente correlate ma geneticamente indipendenti, appartengono alla famiglia delle citochine neuropoietiche ed interferiscono con la trasmissione serotoninergica, inducendo i neuroni del rafe a produrre acetilcolina al posto della serotonina. Tale meccanismo è inibito dalla repressione dell'espressione genica di IL-6 ed IL-11. La metilazione di siti specifici nell'isola CpG di IL-11 induce repressione dell'espressione di IL-11, promuovendo così la trasmissione serotoninergica e la risposta ad escitalopram, un inibitore selettivo della ricaptazione di serotonina.

Lo stato di metilazione dell'isola CpG nell'interleuchina-11 è un fattore predittivo di risposta al trattamento con farmaci antidepressivi.

**Parole chiave:** antidepressivi, depressione maggiore, IL-11

**Riferimento bibliografico:**

[Powell TR](#) et al. *Transl Psychiatry* 2013 Sep 3;3:e300.

## **POLIMORFISMI DI VEGF E OUTCOME CLINICO IN PAZIENTI AFFETTI DA CANCRO AL SENO METASTATICO TRATTATI SETTIMANALMENTE CON DOCETAXEL**

A cura della Dott.ssa Gloria Ravegnini

L'angiogenesi ha un ruolo significativo nella patogenesi di molte malattie, incluso il cancro. Tra i pathway più importanti che sono coinvolti in questo processo c'è sicuramente quello di VEGF (fattore di crescita vascolare endoteliale), i cui principali mediatori sono VEGF-A e il suo recettore, VEGFR 2. Docetaxel si è dimostrato altamente attivo nel trattamento del cancro al seno metastatico, come agente singolo o in combinazione con altri farmaci. Fino ad oggi, non vi sono evidenze che la somministrazione tre volte per settimana sia più efficace del corrispondente regime terapeutico somministrato in unica volta; al contrario, sembra che quest'ultimo mostri un migliore profilo di tossicità e che docetaxel a basse dosi abbia un'attività anti-angiogenica. Una proporzione sostanziale di pazienti che ricevono il trattamento settimanale non risponde alla terapia; in aggiunta, nonostante la somministrazione sia generalmente ben tollerata, una piccola percentuale sviluppa seria tossicità. Di conseguenza, appare sempre più importante poter identificare quella porzione di soggetti che potrebbe beneficiare di questa tipologia di trattamento. La variabilità genetica potrebbe infatti servire come biomarker predittivo per agenti con attività anti-angiogenica e ad oggi non è stato ancora definito alcun biomarker che possa predire eventuali benefici da trattamenti con i suddetti agenti. Lo scopo di questo studio è stato proprio quello di valutare l'associazione tra genotipo di VEGF ed efficacia del trattamento settimanale con docetaxel, in una serie di pazienti con cancro al seno metastatico.

Nell'analisi genotipica sono stati inclusi un totale di 86 pazienti, facenti parte di uno studio clinico più ampio di 173 pazienti, per un pannello di 22 polimorfismi di VEGF: rs69994 VEGF -2578, rs833061 VEGF -1498, rs1570360 VEGF -1554, rs3025039 VEGF +936, rs34376996 VEGF -2646, rs12664104 VEGF -2593, rs35161294 VEGF -2502, rs144854329 VEGF -2551\_-2534 -DEL, rs135864111/rs71833140 VEGF -2430/-2425 INS, rs1005230 VEGF -2471, rs149983590 VEGF -1636, rs833062 VEGF -1455, rs28357093 VEGF -1179, rs13207351 VEGF -1190, rs79469752 VEGF -1203, rs59260042 VEGF -1210, rs149179279 VEGF +903, rs112256643 VEGF +895, rs112005313 VEGF +869, rs187429037 VEGF +838, rs111933757 VEGF +794.

Tra i 173 pazienti, 38.4% hanno mostrato una risposta obiettiva (95% CI: 30.8%-46.4%), 4.4% una risposta completa, 34% una risposta parziale, mentre il 32.7% è stato definito con malattia stabile; la coorte eleggibile di 86 pazienti aveva un profilo altamente simile a quello dell'intero gruppo.

Per quanto riguarda l'associazione con le caratteristiche clinico-patologiche, lo SNP rs13207351 GG è risultato essere meno frequente in pazienti con tumore alla diagnosi in stadio avanzato, ed un'età > di 60 anni. Nessun'altra correlazione con le caratteristiche tumorali è stata riscontrata.

Successivamente sono state analizzate eventuali associazioni del genotipo con outcome clinico e tasso di risposta (RR, response rate). Il polimorfismo rs1570360 GG (VEGF -1154) era significativamente più frequente nei pazienti che non rispondevano al trattamento rispetto a quelli responsivi (42.9% vs 0.0%,  $p = 0.048$ ). Nessun'altra correlazione genotipo - RR è stata riscontrata.

Da un'analisi univariata è emerso che il genotipo AA per rs699947 era associato con una maggiore PFS (progression free survival) se comparato con pazienti con genotipo CC (HR = 0.40; 95% CI:0.17-0.98;  $p = 0.0457$ ). Una PFS peggiore era anche correlata con la presenza della delezione di 18bp in omozigosi (rs144854329) e con l'inserzione di 1bp (rs135864111/rs71833140).

Il genotipo rs13207351 GG è risultato essere associato con un aumentato rischio di progressione rispetto ai genotipi GA ed AA (HR = 3.85; 95% CI: 1.20-12.50;  $p = 0.0224$ ).

Inoltre pazienti omozigoti CC per rs833061 esibivano una prolungata OS (overall survival) se comparati con i genotipi alternativi CT e TT (HR = 0.27; 95% CI:0.08-0.89;  $p = 0.0311$ ).

Tutti gli altri polimorfismi analizzati non hanno evidenziato ulteriori significatività.

Nell'analisi multivariata di Cox, solamente lo SNP rs699947 AA, VEGF -2578, ha mantenuto la sua significatività con PFS ( $p = 0.0220$ ) quando aggiustato con predittori patologici e clinici significativi.

In conclusione, questo è il primo studio che ha valutato l'associazione dei genotipi di VEGF con l'efficacia del trattamento settimanale con docetaxel, in pazienti affetti da cancro al seno metastatico.

I dati emersi da questa analisi supportano l'associazione di specifici genotipi di VEGF con outcome clinico al regime terapeutico con un farmaco potenzialmente anti-angiogenico. Tra tutti i polimorfismi analizzati, in particolare, VEGF -2578, rs699947, sembra essere quello più significativo, data la sua associazione con PFS.

**Parole chiave:** cancro al seno, docetaxel, VEGF

#### Riferimento bibliografico

[Koutras AK](#) et al. *Pharmacogenomics J* 2013 Sep 24 [Epub ahead of print].



#### 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](mailto:sif.farmacologia@segr.it); [sif.informazione@segr.it](mailto:sif.informazione@segr.it); [sifcese@comm2000.it](mailto: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 - ISSN 2282-4758

[http://www.sifweb.org/gruppilavoro/sif\\_gruppo\\_farmacogen.php](http://www.sifweb.org/gruppilavoro/sif_gruppo_farmacogen.php)

Direttore	Prof. Emilio Clementi (Università di Milano)
Coordinatore	Dott.ssa Valentina Boscaro (Università di Torino)
Web Editor	Dott. Federico Casale (Università di Torino)
Hanno contribuito a questo numero:	Dott.ssa Sarah Cargin (Università del Piemonte Orientale) Dott.ssa Lucia Gozzo (Università di Catania) Dott.ssa Gloria Ravagnini (Università di Bologna) Dott. Vittorio Simeon (IRCCS – CROB) Dott. Gabriele Stocco (Università di Trieste) Dott.ssa Eleonora Turrini (Università di Bologna) Dott.ssa Valeria Conti (Università di Salerno) Dott.ssa Stefania Cheli (Azienda Ospedaliera Polo Universitario “L. Sacco” di Milano)
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](mailto:webmaster@sifweb.org)

---

### **DISCLAMER – Leggere attentamente**

SIF, Società Italiana di Farmacologia, si propone di pubblicare sul proprio sito internet [www.sifweb.org](http://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](mailto:sif.farmacologia@segr.it) con oggetto: CANCELLA.

---

---