

**SIF - FARMACOGENETICA****Newsletter Numero 57 – Dicembre 2013**

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

Sommario

- Uno studio di associazione *genome-wide* identifica una regione del cromosoma 11q14.3 associata all'insorgenza di sanguinamento rettale indotto da radioterapia in pazienti affetti da carcinoma prostatico
- Le varianti genetiche della TPMT sono associate ad un aumento del rigetto nel trapianto di cuore con l'utilizzo di azatioprina
- Mutazione *D538G* del recettore α per gli estrogeni: un nuovo meccanismo di resistenza endocrina acquisita nel tumore della mammella
- Le varianti genetiche comuni dei geni RAD51, XRCC2 e XPD non sono associate con l'outcome clinico in pazienti affetti da sarcomi dei tessuti molli
- Un trial randomizzato per stabilire la dose stabile di warfarin sulla base del genotipo del paziente
- Dosi elevate di imatinib superano la risposta insufficiente associata ad aplotipo sfavorevole di ABCG2 in pazienti affetti da leucemia mieloide cronica
- Studio di associazione dei polimorfismi genetici nel recettore dei glucocorticoidi con l'efficacia di questi farmaci nel lupus eritematoso sistemico: uno studio di coorte prospettico
- Associazione tra il polimorfismo CYP2C9*2 e il danno epatico indotto da bosentan

UNO STUDIO DI ASSOCIAZIONE *GENOME-WIDE* IDENTIFICA UNA REGIONE DEL CROMOSOMA 11Q14.3 ASSOCIATA ALL'INSORGENZA DI SANGUINAMENTO RETTALE INDOTTO DA RADIOTERAPIA IN PAZIENTI AFFETTI DA CARCINOMA PROSTATICO

A cura della Dott.ssa Sarah Cargnin

La radioterapia da sola o in combinazione con la chirurgia radicale risulta efficace nel trattamento del carcinoma prostatico, una delle neoplasie più frequenti tra gli individui di sesso maschile con età superiore a 50 anni. Nonostante l'evoluzione tecnologica della radioterapia abbia consentito negli ultimi anni notevoli progressi nella precisione del trattamento stesso, la terapia radiante induce in alcuni pazienti la comparsa di effetti avversi tardivi, tra cui il sanguinamento rettale. L'incidenza di tale effetto avverso sembra essere correlato, almeno in parte, alla dosimetria ed alle caratteristiche cliniche del paziente. Studi precedenti hanno evidenziato una correlazione tra l'insorgenza del sanguinamento rettale post-radioterapico ed alcune varianti in geni implicati nei meccanismi dell'infiammazione e della risposta al danno del DNA. Tuttavia, un recente

studio condotto su 637 pazienti con carcinoma prostatico in trattamento radioterapico non ha confermato nessuna delle associazioni precedentemente riportate. In questo studio gli Autori hanno utilizzato un approccio *genome-wide* allo scopo sia di validare le associazioni riportate in letteratura che di identificare nuove possibili varianti genetiche correlate con l'insorgenza di sanguinamento rettale indotto da radioterapia in pazienti affetti da carcinoma prostatico.

Questo studio multicentrico è stato condotto su due coorti di pazienti, di cui una *esploratoria* (79 casi, 289 controlli) ed una di *validazione* (108 casi, 673 controlli). I pazienti arruolati erano affetti da adenocarcinoma prostatico confermato tramite biopsia ed in trattamento radioterapico. Il follow-up minimo dei pazienti è di un anno ed è stata valutata l'insorgenza tardiva di sanguinamento rettale ad almeno 90 giorni dal trattamento radioterapico. La valutazione clinica del sanguinamento rettale è avvenuta tramite l'impiego delle scale di valutazione RTOG oppure NCI-CTCAE versione 3, a seconda del centro di reclutamento dei pazienti. I pazienti affetti da sanguinamento rettale di grado ≥ 2 sono stati considerati "casi" mentre i soggetti con sanguinamento di grado 0 o 1 sono stati classificati come "controlli". Il DNA genomico è stato estratto da linfociti. Il DNA dei pazienti appartenenti alla coorte esploratoria è stato analizzato mediante una piattaforma Affymetrix comprendente ~900.000 SNPs. Dall'analisi sono stati esclusi gli SNPs con una MAF $< 5\%$ o con una deviazione significativa dall'equilibrio di Hardy-Weinberg ($P < 1 \times 10^{-5}$).

Dei 1572 pazienti arruolati nello studio, 188 (12%) hanno manifestato sanguinamento rettale tardivo di grado ≥ 2 . L'analisi statistica univariata non ha evidenziato differenze significative nelle caratteristiche cliniche delle due coorti (esploratoria e di validazione), ad eccezione della tipologia di trattamento radioterapico. Nello specifico, la coorte esploratoria risulta essere prevalentemente trattata con brachiterapia (radioterapia interna) mentre la coorte di validazione riceve maggiormente radioterapia esterna, a basso dosaggio. Dopo controllo di qualità, 614.453 SNPs sono stati valutati in relazione con l'insorgenza di sanguinamento rettale radio-indotto nei pazienti appartenenti alla coorte esploratoria. Di questi polimorfismi, 491 SNPs aventi un P-value di associazione compreso tra 3.1×10^{-10} e 9.9×10^{-4} sono stati analizzati nella coorte di validazione. Solo lo SNP rs7120482, localizzato nella regione cromosomica 11q14.3, raggiunge una significatività statistica *genome-wide* sia nella coorte esploratoria che in quella di validazione (combined $P = 5.4 \times 10^{-8}$). Inoltre, 3 varianti (rs17630638, rs10519410 e rs10255878), localizzate rispettivamente nella regione cromosomica 11q14.3 ed in prossimità dei geni PCDH18 e ACN9, raggiungono una significatività statistica prossima a quella *genome-wide* in entrambe le coorti (combined $P = 6.9 \times 10^{-7}$; combined $P = 1.3 \times 10^{-6}$; combined $P = 3.6 \times 10^{-6}$, rispettivamente). Inoltre, dall'analisi emerge una forte correlazione tra l'insorgenza di sanguinamento rettale radio-indotto ed il numero di alleli a rischio per i 17 top SNPs (coorte esploratoria: $P = 1.6 \times 10^{-28}$; coorte di validazione: $P = 5.0 \times 10^{-12}$). Infine, l'analisi genome-wide non conferma nessuna delle varianti geniche correlate, in studi precedenti, al sanguinamento rettale radio-indotto.

Questo studio ha identificato un'associazione *genome-wide* tra la variante genica rs7120482, localizzata nella regione cromosomica 11q14.3, e l'insorgenza di sanguinamento rettale indotto da radioterapia in pazienti affetti da adenocarcinoma prostatico.

Il sanguinamento rettale indotto da radioterapia è una condizione di microangiopatia caratterizzata da proliferazione vascolare. È interessante notare come alcuni geni che si collocano in prossimità dei polimorfismi risultati significativi in questo studio, codifichino per proteine contrastanti la proliferazione vascolare. Ad esempio, il gene SLC36A4, localizzato a valle degli SNPs rs7120482 e rs17630638, modula l'attività della cascata di segnale di mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1), nota per essere implicata nella regolazione dell'angiogenesi, della proliferazione e della sopravvivenza cellulare. Numerosi studi in letteratura mostrano, inoltre, come la cascata di segnale di mTOR sia coinvolta nella radiosensibilità in diverse tipologie di tumori, compreso quello alla prostata. Occorre tuttavia sottolineare alcuni limiti dello studio: a) le due coorti (esploratoria e di validazione) differiscono in maniera significativa per la tipologia di trattamento; b) la valutazione clinica del sanguinamento rettale è stata effettuata tramite l'utilizzo di differenti scale di valutazione della tossicità radio-indotta, introducendo così il rischio di misclassificazione; c) il numero limitato di pazienti arruolati nelle due coorti riduce il potere statistico dello studio. Ulteriori ampi studi sono pertanto necessari per valutare quali degli SNPs marginalmente significativi siano effettivamente associati al rischio di sanguinamento rettale radio-indotto.

Parole chiave: radioterapia, carcinoma alla prostata, 11q14.3

Riferimento bibliografico

[Kerns SL](#) et al. *Radiother Oncol* 2013, 107(3):372-6.

LE VARIANTI GENETICHE DELLA TPMT SONO ASSOCIATE AD UN AUMENTO DEL RIGETTO NEL TRAPIANTO DI CUORE CON L'UTILIZZO DI AZATIOPRINA

A cura della Dott.ssa Cheli Stefania

L'azatioprina (AZA) è un farmaco immunosoppressore tutt'oggi fondamentale nella prevenzione del rigetto dopo trapianto d'organo solido, grazie al suo basso costo e all'intolleranza di alcuni pazienti al micofenolato mofetile (MMF), che può verificarsi nel 35-40% dei trapianti di cuore (HTX). L'efficacia clinica e lo sviluppo degli effetti collaterali dipendono dalla biodisponibilità di AZA, la quale è molto influenzata della variabilità genetica. Le variazioni genetiche presenti nella tiopurina S-metiltransferasi (TPMT) si traducono in una maggiore degradazione di TPMT e quindi in un deficit della sua attività enzimatica. L'80-95% della variabilità genetica funzionale osservata nella TPMT è rappresentata da tre polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) non sinonimi, A719G, G460A e G238C. Le varianti alleliche TPMT *2 (G238C), *3B (G460A), *3C (A719G), e *3A (G460A e A719G) sono presenti in circa il 10 % dei caucasici. AZA può indurre mielosoppressione, una reazione potenzialmente pericolosa per la vita che deve essere evitata nei pazienti omozigoti per gli alleli TPMT. Gli eterozigoti (HZ_S) presentano un allele disfunzionale della TPMT e quindi valori di attività dell'enzima inferiori al normale. In questi pazienti può essere necessario quindi, un dosaggio di AZA più basso per raggiungere livelli di attività dei metaboliti simili ai pazienti wild-type (WT). Due studi precedenti, condotti su individui HTX, hanno dimostrato che nei pazienti con bassa attività dell'enzima e con presenza di polimorfismi nella TPMT, vi è un'incidenza maggiore di mielosoppressione. Le recenti linee guida consigliano, infatti, quando si inizia la terapia con AZA, una regolazione del dosaggio sulla base della variabilità genetica. Tuttavia, non è stato ancora valutato l'impatto di questa variabilità genetica sull'"efficacia" clinica di AZA. Lo scopo di questo studio è stato, quindi, di indagare il rapporto tra l'attività enzimatica di TPMT e la sua variabilità genetica con l'efficacia clinica di AZA, in particolare nella prevenzione del rigetto e nella sicurezza dei pazienti HTX. Sono stati inclusi nell'analisi un totale di 93 individui (66 uomini e 27 donne; età media 49,4 anni) sottoposti a HTX alla *Mayo Clinic* (Rochester, Minnesota, USA), trattati inizialmente con AZA. Tutti i pazienti, ad eccezione di uno, hanno ricevuto una terapia di induzione iniziale con un anticorpo monoclonale (muromonab-CD3, globulina antitimocita equina o di coniglio, o globulina antilinfocitaria). L'immunosoppressione di base è stata mantenuta con triplice terapia comprensiva di inibitore della calcineurina, AZA e prednisone. Sono invece stati esclusi dall'analisi i pazienti che hanno ricevuto fin dall'inizio il MMF, gli individui che hanno ricevuto un doppio trapiantato, pazienti con amiloidosi cardiaca e individui trattati con farmaci aggiuntivi, come l'allopurinolo, che sono noti competitori del metabolismo di AZA. Questo studio si è basato su un database retrospettivo ed una revisione delle registrazioni mediche dei dati clinici riguardanti tutti i pazienti sottoposti a trapianto cardiaco e trattati con AZA. Per quest'analisi è stata ottenuta l'approvazione del *Mayo Clinic Institutional Review Board* ed i dati provenienti da ciascun paziente sono stati analizzati per i primi 6 mesi successivi al trapianto cardiaco o fino a quando è stata sospesa la terapia con AZA. La genotipizzazione è stata effettuata a posteriori dal *Mayo Core Genotyping Laboratory* per i seguenti SNPs non sinonimi: A719G, G460A, e G238, utilizzando le sonde TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) secondo le istruzioni del produttore. L'attività della TPMT nei globuli rossi (RBC) è stata dosata prima del HTX dal *Mayo Biochemical Genetics Laboratory* allo scopo di escludere i pazienti con bassa attività dell'enzima. Per quanto riguarda la tossicità, la leucopenia è stata definita come una conta leucocitaria inferiore a $4.0 \times 10^9/l$, la leucopenia grave quando inferiore a $3,0 \times 10^9$. L'epatotossicità è stata definita come un aumento delle aminotransferasi, della bilirubina, e/o della fosfatasi alcalina di tre volte superiore rispetto al limite del normale. Il rigetto cellulare acuto è stato monitorato attraverso un regolare controllo delle biopsie endomiocardiche, come da protocollo di routine. Inoltre è stato assegnato uno *score* al rigetto totale (TRS) determinato, in ciascun paziente, durante tutto il periodo di studio di 6 mesi o fino a quando è stata sospesa la terapia con AZA. Il TRS è stato calcolato dividendo la somma di tutti i gradi di rigetto (1R=1, 2=2R, 3R=3) osservati nelle biopsie per il numero totale di biopsie effettuate durante il periodo di studio. Infine, sono state documentate tutte le dosi di AZA al basale e dopo HTX, comprese tutte le modifiche del dosaggio, adeguato

in base alla valutazione dei globuli bianchi (WBC) dell'emocromo. Per l'analisi statistica dei livelli di attività della TPMT è stato utilizzato il T-test per verificare una differenza tra i genotipi. Il test di *Wilcoxon-Mann-Whitney* è stato usato per confrontare le dosi di AZA al momento del trapianto e a 6 mesi dal post-trapianto in base al genotipo. Correlazioni non parametriche di *Spearman* sono state utilizzate per testare le associazioni dei livelli di attività di TPMT e la dose di AZA al momento del trapianto e a 6 mesi post-trapianto. Il *log-rank* test è stato utilizzato per testare un'associazione tra genotipo e sviluppo di leucopenia e rigetto entro i primi 6 mesi da HTX. L'analisi di regressione logistica multivariata è stata utilizzata per valutare una possibile associazione tra il rigetto acuto e l'attività di TPMT, il genotipo è stato mantenuto dopo aggiustamento per le altre covariate importanti. I risultati delle analisi di regressione logistica sono riportati come *hazard ratio* (HR) con un intervallo di confidenza del 95% (IC).

La genotipizzazione ha individuato 10 HZ della variante TPMT e 83 pazienti WT per TPMT. Non sono stati trovati pazienti omozigoti per la variante di TPMT. L'età media dei due gruppi è risultata simile (49,4±12,5 anni per WT vs 49,8±9,8 anni per HZ, $p=0,766$), mentre è stata valutata una tendenza ad un numero maggiore di pazienti di sesso maschile nel gruppo WT rispetto al HZ (75 vs 40%, $p=0,058$). La mancata corrispondenza di genere (17 vs 11%, $p=1,00$) e il *mismatch* sierologico di infezione da citomegalovirus (CMV) (18 vs 20%, $p=1,00$) tra donatore e ricevente sono risultati simili tra i gruppi così come l'utilizzo della tripla terapia immunosoppressiva. Le frequenze dei genotipi sono state le seguenti: TPMT*1/*1, $n=83$; TPMT*1/*2, $n=1$; TPMT*1/*3A, $n=5$, e TPMT *1/*3C, $n=4$. Come previsto, gli HZ hanno mostrato livelli di attività di TPMT significativamente più bassi rispetto al WT (13.1±2.8 vs 21±4,5 U/ml RBC, $p<0,001$). La concordanza tra genotipo HZ e livello intermedio di attività enzimatica di TPMT è risultata del 89%. Non è stata invece trovata alcuna associazione significativa tra il genotipo e lo sviluppo di epatotossicità, leucopenia o grave leucopenia nei primi 6 mesi di terapia con AZA post-trapianto, nonostante i pazienti WT abbiano mostrato una tendenza ad un maggior numero basale di leucociti rispetto ai pazienti HZ (8.0±1.6×10⁹ vs 7.0±1.2×10⁹/L, $p=0,06$). La conta più bassa di leucociti, raggiunta durante l'intero periodo di studio, è risultata simile tra i due gruppi (4.6±2.1×10⁹ vs 4.7±1.7×10⁹/L, $p=0,88$). Inoltre, come il genotipo HZ, i pazienti con livelli di attività intermedi di TPMT hanno mostrato tassi simili di episodi di leucopenia ($p=0,78$) e leucopenia grave ($p=0,66$) rispetto a quelli con normale attività di TPMT. Il rigetto acuto è stato precoce sia nei pazienti HZ che WT (mediana: 29 vs 36 giorni e $p=0,046$). Il rigetto cellulare acuto si è verificato più frequentemente (70 vs 15%, $p<0,001$) e più precocemente nel gruppo HZ rispetto al WT (mediana 68 vs 180 giorni, $p<0,001$). La media del TRS è risultata significativamente più alta nei pazienti HZ che nei WT (0,9±0,6 vs 0,4±0,3, $p=0,02$). I pazienti con livelli di attività intermedia di TPMT hanno sviluppato un rigetto grave prima rispetto ai pazienti con livelli di attività normale di TPMT ($p<0,001$). Inoltre c'è una tendenza ad un aumento del TRS ($p=0,08$) nei soggetti con livello intermedio di attività di TPMT. L'analisi multivariata, dopo aggiustamento per età, sesso e *mismatch* di stato di infezione da CMV, ha identificato sia la variante in eterozigosi della TPMT che il livello intermedio di attività TPMT come predittori indipendenti del rigetto (HZ: HR=2.5, 95% CI=1,2-5,1, $p=0,01$; TPMT intermedia attività: HR=2.0, 95% CI=1,1-3,7, $p=0,02$) e di rigetto grave (HZ: HR=6.1, 95% CI=2,1-18,2, $p=0,001$; attività intermedia di TPMT: HR=4,68, 95% CI=1,6-14,1, $p=0,006$). La terapia è stata interrotta in 7 pazienti HZ (87,5%) e 19 WT (67,9%) per rigetto acuto ($p=0,40$). Gli altri motivi della sospensione di AZA sono stati la leucopenia (uno HZ, cinque WT) ed epatotossicità (0 HZ, quattro WT). Infine, non ci sono state differenze significative tra il gruppo HZ e WT nella percentuale di pazienti che hanno avuto la necessità di un aumento ($p=0,72$) o di una diminuzione ($p=0,74$) della dose di AZA durante il periodo di studio.

Questo studio è stato l'unico, condotto su pazienti HTX, ad esaminare l'effetto del genotipo di TPMT sulla prevenzione del rigetto con l'uso di AZA. I risultati di questo lavoro sono completamente nuovi e contro-intuitivi nell'individuare un'associazione tra l'aumento del rischio di rigetto e le comuni varianti genetiche di TPMT.

In questo studio, gli autori hanno dimostrato che i pazienti con livelli di attività intermedia di TPMT hanno un rischio maggiore di rigetto grave e che l'attività intermedia di TPMT, aggiustata per età, sesso e stato di *mismatch* di infezione da CMV rimane un predittore significativo del rigetto

Uno dei limiti di questo studio è che non sono stati misurati i livelli dei metaboliti di AZA in quanto non sono stati regolarmente utilizzati per guidare il dosaggio nella pratica clinica.

Parole chiave: azatioprina, TPMT, HTX, rigetto

Riferimento bibliografico

[Liang JJ](#) et al. *Pharmacogenet Genomics* 2013, 23(12):658-65.

MUTAZIONE D538G DEL RECETTORE A PER GLI ESTROGENI: UN NUOVO MECCANISMO DI RESISTENZA ENDOCRINA ACQUISITA NEL TUMORE DELLA MAMMELLA

A cura della Dott.ssa Lucia Gozzo

Il recettore α per gli estrogeni (ER α) appartiene alla superfamiglia dei recettori nucleari ormonali con funzione di fattori di trascrizione attivati da ligando. Dopo il legame degli estrogeni, il recettore dimerizza e forma un complesso con co-attivatori, che viene reclutato a livello degli elementi responsivi agli estrogeni (ERE) sul promoter dei geni target. Circa il 75% dei tumori della mammella esprime l'ER α e l'azione su questa via di segnalazione, o attraverso la riduzione dei livelli del ligando o per inibizione recettoriale, rappresenta una strategia chiave di trattamento. Tuttavia, alcune pazienti con carcinoma della mammella metastatico (*metastatic breast cancer*, MBC) non rispondono a nessun trattamento endocrino (resistenza *de novo*) e virtualmente tutte le pazienti che inizialmente rispondono possono sviluppare resistenza (resistenza acquisita). I meccanismi associati allo sviluppo di resistenza acquisita includono una ridotta espressione del recettore ER α , un'alterata attività dei co-regolatori ed un'aumentata attività delle vie di segnalazione dei fattori di crescita. La mutazione dell'ER α è un evento raro, che insorge solo nell'1% dei tumori primari, mentre mutazioni recettoriali acquisite non sono state associate fino ad ora allo sviluppo di resistenza endocrina.

In questo studio è stata individuata una nuova mutazione dell'ER α che esita in una sostituzione di acido aspartico in posizione 538 con glicina (D538G). Questa mutazione è stata identificata nelle metastasi epatiche di pazienti che avevano sviluppato resistenza endocrina, ma non in campioni di tumori primari prima di iniziare il trattamento. Studi di modellistica indicano che la sostituzione crea un cambiamento conformazionale che altera l'interazione tra il recettore e gli estrogeni o il tamoxifen, ma anche mima la conformazione del recettore attivato. Studi su linee cellulari confermano l'attività costitutiva del recettore mutato.

Campioni provenienti da pazienti con tumore metastatico della mammella sono stati selezionati, a discrezione del medico, per l'analisi genetica, al fine di identificare nuovi target di trattamento.

Tra dicembre 2011 e aprile 2013 sono stati valutati campioni tumorali di 13 pazienti israeliane con carcinoma duttale infiltrante metastatico ER α + che avevano fallito multiple linee di trattamento. È stata individuata nelle metastasi epatiche di 5 pazienti (38%) una nuova mutazione (A1613G) con sostituzione D538G a livello dell'ER α , che non era presente nei campioni di tumore primario valutati alla diagnosi prima di iniziare la terapia endocrina. Tutte e 5 le pazienti avevano ricevuto, prima dello sviluppo di resistenza, almeno 2 linee di terapia endocrina per un periodo prolungato (da 67 a 97 mesi). La frequenza dell'allele mutato andava dal 16% al 40% e correlava con la percentuale di cellule tumorali del campione. Solo 1 degli 8 campioni con l'ER α *wild type* (WT) era stato ottenuto da metastasi epatiche, mentre gli altri 7 provenivano dall'osso o da tessuti molli (p=0,005). In una paziente portatrice della mutazione, l'analisi simultanea delle metastasi polmonari non aveva mostrato la mutazione. Questa osservazione potrebbe suggerire o l'emergenza di questa specifica mutazione a livello epatico o la predilezione per il tessuto epatico delle cellule portatrici di questa mutazione.

L'acido aspartico 538 è posizionato in un'area critica del *ligand-binding domain* (LBD), chiamata elica 12, e sostituzioni *in vitro* con alanina o asparagina riducono l'attività recettoriale. L'acido aspartico contiene una catena laterale negativa abbastanza ampia mentre la glicina contiene solo un idrogeno. Pertanto, la sostituzione D538G potrebbe influenzare la struttura terziaria dell'ER α . Analisi della struttura del LBD nell'ER α -WT indicano il ruolo importante giocato dall'elica 12 nel mediare l'interazione tra il recettore e vari coattivatori, inclusi gli *steroid receptor coactivators* (SRC)-1 e -2. Dopo il legame dell'estrogeno, l'elica 12 si posiziona sopra la tasca di legame del ligando, formando una superficie di reclutamento per i co-attivatori. Normalmente, dopo il legame del tamoxifen, l'elica 12 viene spostata in modo da prevenire il legame dei co-attivatori. La conformazione dell'elica 12 nella proteina mutata dovrebbe essere simile a quella osservata nei WT dopo legame dell'estrogeno, assicurando un'attività costitutiva ligando-indipendente. È stato poi confrontato l'effetto della sostituzione D538G con quello della sostituzione Y537S,

che induce attività costitutiva: i legami idrogeno Y537-N348 e D351-L540 esistono nella struttura WT, ma il legame Y537-N348 non può esistere in caso di mutazione Y537S; analogamente, la sostituzione D538G previene la formazione del legame Y537-N348, ma permette quella del D351-L540. Questi cambiamenti potrebbero rendere l'elica 12 più flessibile, permettendo così il legame dei co-attivatori anche in assenza del ligando. Il modello del D538G-ER α suggerisce un cambiamento conformazionale dell'elica 12 che permetterebbe il legame dei co-attivatori in assenza di estrogeni e interferirebbe con il legame di estrogeni e tamoxifen.

Per comprendere l'attività del recettore mutato è stata studiata in un modello cellulare *in vitro* l'attività trascrizionale del recettore ER α in presenza della sostituzione D538G. I dati ottenuti mostrano chiaramente un'attività costitutiva, ligando-indipendente, delle cellule di tumore mammario con mutazione D538G dell'ER α . Altri studi *in vitro* sono stati condotti per dimostrare che la mutazione causa un aumento della proliferazione e della migrazione delle cellule tumorali.

Questo studio ha mostrato, per la prima volta, che la resistenza acquisita al trattamento ormonale nel carcinoma metastatico della mammella può dipendere da una mutazione attivante l'ER α . Nonostante il ruolo centrale di questo recettore nel tumore della mammella, la mutazione è un evento raro. Sono state descritte in precedenza due mutazioni attivanti, Y537N e K303R, ed entrambe insorgono in meno dell'1% dei tumori primari. Come sottolineato dagli autori la mutazione D538G non è stata descritta fino ad ora, e non sono attualmente note altre mutazioni acquisite dell'ER α . Sono possibili due spiegazioni: in primo luogo, studi precedenti si sono focalizzati soprattutto sulla presenza di mutazioni nel tumore primario alla diagnosi, e pertanto non potevano individuare mutazioni acquisite nelle metastasi; in secondo luogo è possibile che i metodi di sequenziamento usati in precedenza fossero meno sensibili di quelli attuali. Questa mutazione è stata individuata in 5 su 13 (38%) pazienti con tumore della mammella metastatico ER α +. È da notare che si trattava di pazienti altamente selezionate e con intenso pre-trattamento, che potrebbero non essere rappresentative della popolazione generale di pazienti con tumore mammario. La prevalenza reale della mutazione D538G deve essere determinata in larghe coorti di pazienti. Se effettivamente venisse identificata in una significativa proporzione di pazienti, un test farmacogenetico ad hoc potrebbe essere un metodo semplice ed economico per predire la risposta alla terapia ormonale.

È stato dimostrato un ruolo importante dell'elica 12 del LBD nell'attivazione dell'ER, con coinvolgimento nell'interazione dell'ER con 17- β estradiolo (E2), co-regolatori ed inibitori. Sebbene non siano state trovate fino ad ora mutazioni a livello dell'elica 12, molti dati di laboratorio indicano il ruolo di specifici aminoacidi all'interno di questa regione. In particolare, la sostituzione D538A è associata con una ridotta attivazione ed un aumento della degradazione recettoriale, e diverse sostituzioni di Tyr-537 alterano l'affinità del recettore per l'E2. Alcune mutazioni di Leu-536 aumentano l'attività costitutiva ligando-indipendente, e la sostituzione di Glu-542 in alanina aumenta l'attività E2-dipendente. Pertanto l'aumento dell'attività del recettore con la mutazione D538G, osservato in questo studio, appare in linea con le conoscenze sulla struttura e la funzione dell'elica 12. La presenza della mutazione potrebbe essere frutto dell'eterogeneità genetica del tumore primario seguita dalla selezione di cloni resistenti, oppure di una mutazione *de novo* apparsa durante la progressione della malattia. Queste osservazioni chiaramente indicano che analisi genomiche dovrebbero essere condotte non solo sul tumore primario ma anche sulle lesioni metastatiche più recenti disponibili, in modo da predire la risposta alla terapia ed identificare potenziali nuovi target terapeutici. È stato osservato, infine, che concentrazioni più elevate di tamoxifen e fulvestrant possono inibire il recettore mutato, incoraggiando la ricerca di altri composti che possano legare il recettore, prevenirne l'attivazione e ripristinare la sensibilità endocrina.

In conclusione, questo studio ha identificato una nuova mutazione acquisita dell'ER α nelle metastasi di pazienti con carcinoma della mammella metastatico resistenti alla terapia endocrina. La mutazione individuata induce cambiamenti conformazionali che mimano la conformazione del recettore attivato, e conferisce un'attività ligando-indipendente e resistenza alla terapia ormonale. Questa scoperta potrebbe portare allo sviluppo di nuove terapie endocrine in pazienti resistenti ai trattamenti attualmente disponibili.

Conflitto d'interesse: gli autori A. Dvir e L. Soussan-Gutman sono dipendenti della Oncotest-Teva Pharmaceutical Industries. R. Yelensky ha interessi condivisi, inclusi brevetti, con la Foundation Medicine. M. Brown è consulente della Novartis Pharmaceuticals da cui ha ricevuto fondi di ricerca. Non sono stati dichiarati conflitti di interesse dagli altri autori.

Parole chiave: tumore della mammella metastatico, terapia ormonale, ERα

Riferimento bibliografico

[Merenbakh-Lamin K](#) et al. *Cancer Res* 2013, 73(23):6856-64.

LE VARIANTI GENETICHE COMUNI DEI GENI RAD51, XRCC2 E XPD NON SONO ASSOCIATE CON L'OUTCOME CLINICO IN PAZIENTI AFFETTI DA SARCOMI DEI TESSUTI MOLLI

A cura della Dott.ssa Gloria Ravegnini

I sarcomi dei tessuti molli (soft-tissue sarcoma, STS) sono rari e complessi tumori maligni di origine mesenchimale. Con un'incidenza di circa 11.300 nuovi casi all'anno negli Stati Uniti ed un tasso di mortalità del 35%, sono caratterizzati dalla comparsa di metastasi disseminate già negli stadi tumorali iniziali.

Negli ultimi anni, sono stati compiuti molti progressi nella conoscenza degli STS; basandosi sull'impiego di importanti database, dei fattori prognostici, tra cui età alla diagnosi, grandezza del tumore, sottotipo istologico e sito tumorale, è stato possibile caratterizzare il rischio di ricorrenza e morte cancro-relata.

Tuttavia, l'identificazione di fattori addizionali da impiegare nella predizione dell'outcome clinico, potrebbe guidare verso una stratificazione dei soggetti malati in base al rischio di ricorrenza.

Molti studi hanno messo in luce che i meccanismi di riparazione del DNA giocano un ruolo cruciale nello sviluppo iniziale del tumore e nella sua progressione; in particolare, sembrerebbe che i pathway NER (nucleotide excision repair) e HR (homologous recombination) siano i più coinvolti nel mantenimento della stabilità del genoma. In questo contesto, la presenza di polimorfismi germinali potrebbe causare alterazioni strutturali negli enzimi della riparazione e quindi nella modulazione dello sviluppo e progressione tumorale.

Ad oggi, sono stati descritti diversi SNPs nei geni RAD51, XRCC2 ed XPD, - geni chiavi nei meccanismi di riparazione-, e sono state progressivamente analizzate le loro associazioni con rischio e prognosi in differenti tipi di cancro (1-5); per quanto riguarda i pazienti affetti da STS, ci sono pochissime informazioni riguardo l'impatto dei polimorfismi su suscettibilità ed outcome clinico.

Lo scopo dello studio è stato proprio quello di investigare l'associazione tra gli SNPs RAD51 rs1801320, XRCC2 rs3218536, XPD rs13181, tempo alla ricorrenza (TTR, time to recurrence) e overall survival (OS) in pazienti STS trattati con radio o chemioterapia dopo operazione chirurgica.

Nell'analisi sono stati coinvolti un totale di 260 pazienti con STS confermato istologicamente e con un'età media alla diagnosi di 59 anni (range 18-96 anni); il follow-up medio è stato di 45.7 mesi (range 0-120 mesi). I pazienti sono stati suddivisi in base al sottotipo istologico in STS con alterazioni genetiche complesse (n = 162), con traslocazioni specifiche (n = 57), con specifiche amplificazioni e alterazioni genetiche (n = 26) o altro (n = 15).

Dei 260 soggetti, 50 (19.2%) hanno sviluppato metastasi, ed 86 (33.1%) sono morti entro un periodo di follow-up di 10 anni.

Dall'analisi è emersa un'associazione significativa tra grado tumorale e radioterapia adiuvante e tra grado tumorale ed OS.

Tutti i pazienti sono stati genotipizzati per gli SNPs rs1801320, rs3218536 ed rs13181 ma non sono state riscontrate associazioni significative con TTR (rs1801320: HR: 1.190; 95% CI=0.588-2.407; p=0.629; rs3218536: HR: 0.740; 95% CI=0.272-2.016; p=0.556; rs13181: HR: 0.898; 95% CI=0.579-1.393; p=0.632) e con OS (rs1801320: HR: 1.336; 95% CI=0.799-2.234; p=0.263; rs3218536: HR: 1.179; 95% CI=0.603-2.305; p=0.631; rs13181: HR: 0.720; 95% CI=0.515-1.005; p=0.054). Successivamente sono state investigate le possibili associazioni per TTR ed OS nei sottogruppi istologici precedentemente descritti ma nessuna significatività statistica è stata ulteriormente individuata.

In conclusione, i risultati sottolineano un effetto prognostico del grado tumorale e della radioterapia adiuvante in pazienti affetti da tumore dei tessuti molli ma non indicano alcuna associazione tra RAD51 rs1801320, XRCC2 rs3218536, XPD rs13181 e outcome clinico dopo trattamento chirurgico.

Parole chiave: tumore dei tessuti molli, radioterapia adiuvante, geni della riparazione del DNA.

Riferimento bibliografico

[Szkandera J](#) et al. *Cancer Epidemiol* 2013, 37(6): 1003-9

Ulteriori riferimenti bibliografici

1. Wood RD et al. *Science* 2001, 291(5507): 1284-9
2. Krupa R et al. *Mol Biol Rep* 2011, 38(2): 1163-70
3. Jiao L et al. *Am J Gastroenterol*. 2008, 103(2): 360-7
4. Synowiec E et al. *Mutat Res*. 2008, 648(1-2): 65-72
5. Nogueira A et al. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010, 66(3): 501-6.

UN TRIAL RANDOMIZZATO PER STABILIRE LA DOSE STABILE DI WARFARIN SULLA BASE DEL GENOTIPO DEL PAZIENTE

A cura della Dott.ssa Valeria Conti

I polimorfismi dei geni *CYP2C9* e *VKORC1*, insieme con l'età e l'indice di massa corporea, sono responsabili di circa il 50% della variabilità individuale nella richiesta della dose di warfarin. Ciononostante, l'analisi di genotipizzazione propedeutica alla somministrazione di tale anticoagulante orale non è ancora entrata a far parte della pratica clinica. Un cospicuo numero di studi prospettici e di trial randomizzati e controllati ha fallito nel mostrare che lo screening genetico possa migliorare il controllo dell'anticoagulazione orale con il warfarin.

Questo trial è stato condotto da un gruppo di ricercatori appartenenti al consorzio europeo "European Pharmacogenetics of Anticoagulant Therapy (EU-PACT) consortium". Pazienti con fibrillazione atriale o tromboembolismo venoso, che richiedevano un trattamento con warfarin con un INR target di 2,0-3,0, sono stati arruolati nel Regno Unito (in tre centri) e in Svezia (in due centri). La popolazione in studio era naïve per il trattamento con warfarin.

Dopo aver firmato un consenso informato, i pazienti sono stati randomizzati al gruppo "genotype-guided dosing group" o al gruppo di controllo "the standard dosing (control) group" mediante una scheda informatizzata. I pazienti erano a conoscenza del gruppo assegnatogli. Lo screening degli SNP *CYP2C9*2*, *CYP2C9*3* e *VKORC1* (-1639G→A) è stato eseguito mediante una piattaforma genetica con sonde HyBeacon (LGC), che fornisce i risultati in circa 2 ore. Nei pazienti del gruppo genotipo-guidato, lo screening dei polimorfismi è stato realizzato immediatamente dopo la randomizzazione, mentre nei pazienti del gruppo di controllo, dopo il completamento dello studio. Nel "genotype-guided group", il regime posologico per i giorni da 1 a 3 è stato determinato utilizzando un algoritmo precedentemente validato "loading-dose algorithm" (*Clin Pharmacol Ther.* 2011;90(5):701-6). Questo algoritmo predice le dosi di mantenimento riferendosi a una versione leggermente modificata dell'algoritmo del consorzio farmacogenetico internazionale per il warfarin, "International Warfarin Pharmacogenetics Consortium algorithm" (*N Engl J Med* 2009;361:1613-21). Inoltre, con questo algoritmo si può determinare la dose di warfarin in accordo al genotipo del *CYP2C9*. Per i giorni 4 e 5, le dosi sono state decise seguendo un altro algoritmo, il "dose-revision algorithm" (*Clin Pharmacol Ther.* 2010 May;87(5):572-8), basato sul valore di INR misurato al giorno 4. Entrambi gli algoritmi usati erano stati disegnati tenendo in considerazione fattori sia clinici, che genetici. Le dosi di farmaco dopo il giorno 5 sono state determinate seguendo la normale pratica clinica locale. Tutti i pazienti sono stati seguiti per tre mesi monitorando i valori di INR nei giorni 1, 4, 6, 8, 15, 22, 57, fino al giorno 85.

427 pazienti (211 del gruppo genotipo-guidato e 216 del gruppo di controllo) per i quali erano stati ottenuti i dati di INR per almeno tredici giorni sono stati effettivamente inclusi in questo trial. La maggior parte dei soggetti erano uomini (61%) e il 98,5% erano individui bianchi; l'età media era di 67,3 anni. La fibrillazione atriale era l'indicazione più frequente (72,1%) e i soggetti con tromboembolismo venoso erano stati trattati con eparina per almeno cinque giorni dopo la diagnosi. Il 67,4% di soggetti del gruppo genotipo-guidato contro il 60,3% del gruppo di controllo rimaneva nel range terapeutico di INR. Le differenze più grandi nel valore medio di INR tra i due gruppi sono state registrate subito dopo l'inizio della terapia e diventavano meno pronunciate nei tre mesi di follow-up. Le differenze tra i due gruppi per quanto riguarda il tempo di permanenza nell'intervallo terapeutico di INR erano significative tra il quinto e il decimo giorno dall'inizio

del trattamento farmacologico. Con riferimento agli out come secondari, il tempo medio per raggiungere il valore target di INR è stato calcolato come media tra il valore alla prima e alla seconda misura. Tale valore era più basso nei pazienti appartenenti al gruppo analizzato geneticamente rispetto a quello del gruppo di controllo. Un totale di 173 pazienti (82,0%) raggiungeva una dose stabile di warfarin in tre mesi e più rapidamente rispetto ai controlli. I pazienti del gruppo genotipo-guidato erano meno suscettibili a eventi emorragici. Tre eventi di sanguinamento e uno di tromboembolismo sono stati registrati negli individui del gruppo di controllo e nessuno nei pazienti analizzati geneticamente.

Questo trial ha dimostrato che il dosaggio del warfarin pianificato sulla base dell'analisi di genotipizzazione ha permesso di aumentare di sette punti percentuali il tempo di permanenza dei pazienti nel range terapeutico di INR. Inoltre, tale approccio si è rivelato efficace nel ridurre l'incidenza di un'anticoagulazione eccessiva, il tempo richiesto per raggiungere un livello terapeutico di INR, il tempo per raggiungere la dose stabile, e il numero di aggiustamenti della dose. Questi risultati erano in accordo con quelli prodotti in altri studi sull'effetto degli SNPs di VKORC1 e CYP2C9 e con i risultati di un altro studio prospettico non randomizzato svolto da Anderson e Coll. nello stesso periodo. La differenza nei valori medi di INR tra i due gruppi era più alta all'inizio dello studio e questo confermava che il dosaggio genotipo-guidato ha un effetto decisivo durante le fasi iniziali della terapia con warfarin. Il trial è stato disegnato con l'obiettivo di riflettere in maniera pragmatica la pratica clinica eseguita nei centri in cui sono stati arruolati i due gruppi che hanno costituito la popolazione in studio. In tali centri (nel Regno Unito e in Svezia) viene adottato un algoritmo (messo a punto dagli stessi autori del lavoro qui revisionato) basato sulla stima della dose di carico del warfarin sulla base dei polimorfismi del CYP2C9. Questo algoritmo viene utilizzato con successo per ridurre la probabilità di incorrere in una eccessiva anticoagulazione (INR>4). La più grande limitazione di questo studio è che l'out come primario era rappresentato dal tempo di permanenza nel range terapeutico di INR piuttosto che dall'evenienza di episodi tromboembolici o di sanguinamento (out come clinici). A tal proposito, gli autori hanno trovato che circa il 37% dei pazienti del gruppo di controllo erano incorsi in episodi di sanguinamento, ma, per mostrare una riduzione di 5 punti percentuali dell'incidenza di eventi emorragici, avrebbero dovuto arruolare 2916 pazienti del gruppo genotipo-guidato. Tuttavia, gli episodi di sanguinamento sono associati a valori di INR superiori o uguali a 4 e il dosaggio genotipo guidato sperimentato in questo trial riduceva l'incidenza e il tempo trascorso con tali valori di INR. La maggior parte dei pazienti arruolati era di origine europea, per questo, non è possibile estendere i risultati di questo studio a soggetti di diversa provenienza etnica. Data la grande variabilità interindividuale nelle frequenze dei polimorfismi che influenzano la dose richiesta, è auspicabile sviluppare un algoritmo per migliorare il dosaggio di warfarin per garantire un'anticoagulazione sicura ed efficace in tutti i gruppi etnici.

Questo trial clinico dimostra che per decidere il dosaggio di warfarin per un'efficace e sicura anticoagulazione, un approccio basato sull'analisi genetica è superiore a quello impostato sui soli dati clinici del paziente. Nonostante questi ottimi risultati, gli autori concludono che non è ancora stato completamente chiarito il modo con il quale queste evidenze potranno essere utilizzate per migliorare gli outcome clinici nella pratica.

Parole chiave: warfarin, INR, algoritmo farmacogenetico, CYP2C9, VKORC1

Riferimento bibliografico

[Pirmohamed M](#) et al. *N Engl J Med* 2013 Nov 19 [Epub ahead of print].

DOSI ELEVATE DI IMATINIB SUPERANO LA RISPOSTA INSUFFICIENTE ASSOCIATA AD APLOTIPO SFAVOREVOLE DI ABCG2 IN PAZIENTI AFFETTI DA LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA

A cura della Dott.ssa Eleonora Turrini

Imatinib, inibitore della tirosin chinasi, ha rivoluzionato il trattamento della leucemia mieloide cronica (CML). Lo studio IRIS ha mostrato che l'88% dei pazienti trattati con imatinib, come terapia di prima linea, al *follow up* a lungo termine raggiungevano una *overall survival* di 6 anni. Due inibitori della tirosin chinasi

di seconda generazione, dasatinib e nilotinib, sono attualmente registrati come terapia di prima linea per CML in fase cronica. Studi recenti riportano dati riguardo a risposte molecolare e citogenetica più rapide e profonde, ma queste evidenze sono ancora troppo preliminari per determinare se questi farmaci diano effettivamente un vantaggio nella sopravvivenza rispetto ad imatinib. L'emergere di dati relativi alle reazioni avverse con nilotinib, arteriopatie periferiche, e dasatinib, ipertensione polmonare, così come l'arrivo del generico di imatinib, fanno sì che la terapia si muova verso un approccio personalizzato. Svariati studi sono stati condotti per quel che riguarda l'associazione di polimorfismi a suscettibilità a CML, progressione della patologia o accumulo intracellulare di imatinib nei leucociti. Pochi sono gli studi relativi all'associazione tra imatinib e risposta farmacologica alla terapia. La risposta citogenetica completa (CCR) a 12 mesi rimane il miglior *marker* surrogato di sopravvivenza per pazienti affetti da CML. Comunque, è la risposta molecolare maggiore (MMR) ad essere utilizzata come primo *end-point* nei trial clinici e MMR a 18 mesi è uno dei criteri raccomandati da ELN2009 per la gestione dei pazienti affetti da CML. Nel presente studio è stata scelta l'incidenza cumulativa di MMR (CI-MMR) come criterio per definire gli SNP in geni responsabili del trasporto di imatinib associati ad un *outcome* favorevole. Tale scopo è stato raggiunto grazie ad uno studio di associazione in una coorte esplorativa grazie all'utilizzo di un chip *custom*. È stato identificato un aplotipo di ABCG2 associato ad elevata CI-MMR. Tale aplotipo è stato validato in una coorte indipendente prospettiva-retrospettiva di pazienti ed è stato valutato il suo impatto in rapporto alla dose giornaliera di imatinib assunta. Lo studio coinvolge due coorti indipendenti, una di 105 pazienti affetti da CML in fase cronica, arruolati tra il 2006 ed il 2009 dall'Ospedale St Luis come coorte esplorativa (SLEC), Parigi, trattati con imatinib 400 mg/die; l'altra coorte è costituita da 339 pazienti sempre affetti da CML in fase cronica appartenenti allo studio di validazione dello studio prospettico SPIRIT (SVC); 132 pazienti erano trattati con 400 mg/die e 107 con 600 mg/die. Il DNA dei pazienti è stato estratto da sangue periferico ed analizzato tramite un chip che conteneva 16 651 SNPs, dei quali ne sono stati selezionati 857 che coprono i polimorfismi di 94 geni responsabili del trasporto dei farmaci.

CI-MMR è stata valutata in accordo con la scala Sokal. Utilizzando il modello Fine e Gray è stato confermato come CI-MMR sia fortemente correlato in maniera inversa alla scala Sokal (OR:0.64; 95%CI 0.53-0.78, $P < 0.001$). CI-MMR è perfettamente comparabile nei gruppi SLEC e SVC sottoposti a terapia con imatinib 400mg/die, mentre è significativamente più alta nei pazienti SVC trattati con 600 mg/die ($P = 0.003$). Il coefficiente di regressione aumenta più del 50% quando la dose aumenta da 400 a 600mg/die ($P = 0.014$).

Degli 857 SNPs selezionati, il 48.2% sono stati correttamente analizzati nei pazienti ed hanno passato i criteri del controllo di qualità. Sono stati identificati 12 SNPs nel gruppo SLEC che sono stati associati in modo significativo a CI-MMR a 18 mesi sulla base di una *fold discovery rate* (FDA) $< 50\%$. Solo uno di questi SNP (rs12505410) localizzato sul gene ABCG2 è stato associato in modo significativo a CI-MMR nell'intera coorte SVC. Un'ulteriore analisi delle due coorti SVC sottoposte a trattamento con diverso dosaggio giornaliero di imatinib ha fornito l'evidenza che tre SNPs (rs12505410, rs131204400 e rs2725252) tutti del gene ABCG2 sono associati significativamente con la risposta a 400mg/die, mentre nessuno è stato associato a 600mg/die.

CI-MMR a 18 mesi è stata valutata rispetto alla distribuzione dell'aplotipo ABCG2 nella coorte esplorativa. L'analisi multivariata ha identificato gli aplotipi 1 e 3 (GCG e GTG, rispettivamente) come significativamente correlati ad una maggiore CI-MMR. Questi due aplotipi condividono gli stessi alleli per rs12505410 e rs2725252 e differiscono per rs13120400, suggerendo che l'associazione potrebbe essere con l'aplotipo GG per rs12505410 e rs2725252 per una maggiore CI-MMR rispetto a coloro che non sono portatori di questi alleli. La coorte di validazione dello studio è stata analizzata seguendo il medesimo approccio. Se si considera l'intera coorte SVC, CI-MMR a 18 mesi aumenta del 36% in pazienti che presentano l'aplotipo GG ($P = 0.005$). Se si considerano solo i pazienti SVC sottoposti a terapia con 400mg/die tale percentuale cresce fino al 64% ($P = 0.002$) e per quelli sottoposti a 600mg/die tale associazione non è significativa. Degno di nota è il fatto che la scala Sokal rimane un parametro indipendente di CI-MMR in tutte le popolazioni in studio nel modello multivariato.

In conclusione, l'aplotipo di ABCG2 G-G per i polimorfismi rs12505410 e rs2725252 è stato associato in modo significativo ad un aumento della CI-MMR in pazienti affetti da CML in fase cronica sottoposti a terapia con imatinib 400mg/die. I pazienti portatori di questo aplotipo "favorevole" raggiungono livelli di CI-

MMR simili ai pazienti che assumono 600mg/die. Tali risultati suggeriscono che la risposta ad imatinib è influenzata da aplotipi costitutivi nei geni responsabili del trasporto del farmaco. Il raggiungimento di una peggiore risposta alla terapia dovuto alla presenza dell'aplotipo "non-favorevole" di ABCG2 potrebbe essere superato aumentando la dose di imatinib da 400 a 600mg/die.

Tali dati suggeriscono quindi una personalizzazione della dose giornaliera di imatinib in pazienti affetti da CML in fase cronica sulla base del loro genotipo costitutivo.

Parole chiave: CML, imatinib, SNPs, ABCG2, risposta molecolare

Riferimento bibliografico

[Delord M](#) et al. *Oncotarget* 2013, 4(10):1582-91.

STUDIO DI ASSOCIAZIONE DEI POLIMORFISMI GENETICI NEL RECETTORE DEI GLUCOCORTICOIDI CON L'EFFICACIA DI QUESTI FARMACI NEL LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO: UNO STUDIO DI COORTE PROSPETTICO

A cura delle Dott.sse Eva Cuzzoni e Raffaella Franca

Il lupus eritematoso sistemico (LES) è una malattia autoimmune che colpisce soprattutto le donne e presenta numerose manifestazioni cliniche ed anomalie immunologiche. Studi sull'incidenza e sulla prevalenza del LES hanno evidenziato marcate differenze nella popolazione generale: i tassi di incidenza variano da 1 a 10 casi nuovi all'anno ogni 100.000 persone e i tassi di prevalenza si aggirano tra 20 e 70 ogni 100.000 persone. La sopravvivenza del LES è migliorata negli ultimi 50 anni, ma nonostante i progressi delle cure mediche, i pazienti soffrono spesso di effetti avversi a lungo termine che influisce negativamente sulla loro qualità di vita e sulle loro capacità lavorative, con conseguenze sostanziali anche sui costi sociali diretti e indiretti. L'eziologia del LES non è ancora ben definita: studi recenti hanno evidenziato una possibile multifattorialità della malattia; i tassi di concordanza del 24-58% nei gemelli monozigoti rispetto al 2-5% nei gemelli dizigoti indicano che vi è una forte componente genetica nella suscettibilità alla malattia.

Il trattamento del LES è una sfida per la mancanza di una vera e propria cura definitiva. I glucocorticoidi (GC) sono efficaci nell'indurre la remissione e rappresentano perciò il trattamento di prima scelta. Tuttavia, sono state osservate differenze interindividuali nell'efficacia del trattamento e molti pazienti con LES non sono in grado di raggiungere una remissione completa oppure migliorano solo molto lentamente. I GC esercitano i loro effetti biologici attraverso il legame con il loro recettore (GR), localizzato a livello citosolico sottoforma di eterocomplesso quando inattivo. Una volta formatosi, il complesso GC-GR eterodimerizza e trasloca nel nucleo, dove lega il DNA su particolari sequenze denominate "glucocorticoid response element" (GRE) ed innesca così la transattivazione nonché la transrepressione dei geni target. Numerosi studi hanno valutato l'associazione tra la risposta clinica alla terapia con GC e l'espressione del GR, evidenziando una scarsa risposta al trattamento quando il numero di recettori per cellula è ridotto. La presenza di polimorfismi nel gene NR3C1 (nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 codificante il GR) potrebbe, in parte, spiegare le differenze interindividuali riscontrate nell'efficacia del trattamento con GC.

In questo studio prospettico condotto nella popolazione cinese, gli autori hanno identificato attraverso l'utilizzo del software Haploview, diciotto polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) come tag-SNP del gene NR3C1 (rs10463358, rs2963156, rs4634384, rs4912911, rs12054797, rs10482672, rs2963151, rs4986593, rs9324924, rs6865292, rs4907376, rs2963155, rs9324921, rs12656106, rs4912905, rs17100234, rs7701443 and rs7719514) e hanno analizzato le possibili correlazioni tra i genotipi e la risposta clinica al trattamento con i GC in pazienti affetti da LES. Lo studio ha preso in esame una coorte di 220 pazienti trattati con prednisone in combinazione con idrossiclorochina (400mg/giorno) per 12 settimane. L'idrossiclorochina è un farmaco essenziale nel trattamento del LES ed ampiamente utilizzato per la sua efficacia nel prevenire e alleviare non soltanto le manifestazioni cutanee e articolari, ma anche conseguenze severe della malattia.

L'efficacia dei GC è stata misurata calcolando i punteggi di indice di attività della malattia (SLEDAI). Pazienti con punteggio SLEDAI <10 al momento dell'arruolamento (livello basale) hanno ricevuto una dose di prednisone di fino a 0.5 mg/kg/giorno; mentre i pazienti con SLEDAI basale >10 hanno ricevuto una dose

di 0.5-1.0 mg/kg/giorno. Per tutti i pazienti arruolati, lo SLEDAI è stato calcolato all'inizio del trattamento e dopo 4, 8 e 12 settimane. I pazienti sono stati classificati in due gruppi (sensibili e resistenti), in base alla loro risposta ai GC. Il gruppo sensibile presentava una remissione dei sintomi clinici ed un punteggio SLEDAI <5 alla dodicesima settimana, al contrario il gruppo resistente presentava sintomi clinici ed una mancata remissione della malattia con un punteggio SLEDAI ≥ 5 .

Nelle analisi statistiche sono stati inclusi 212 pazienti, di cui 110 sensibili e 102 resistenti ai GC. Pazienti con crisi acute di LES, che hanno richiesto un aumento della terapia farmacologica, con infezioni batteriche o fungine sistemiche, allergici all'idrossiclorochina e donne incinte o in allattamento sono stati esclusi dallo studio.

I DNA sono stati estratti dal sangue periferico dei pazienti e genotipizzati utilizzando la tecnologia Multiplex SNaPshot (Applied Biosystem). Per discriminare l'effetto dei genotipi sull'efficacia dei GC, sono stati utilizzati inizialmente dei modelli univariati di regressione logistica che hanno portato ad identificare quattro SNP come significativi (rs10482672, rs4912905, rs17100234 e rs7701443). Tali associazioni sono state ulteriormente analizzate con un'analisi multivariata aggiustata per potenziali fattori confondenti quali età, sesso, indice di massa corporea, SLEDAI basale, dose di GC somministrata, fumo e consumo d'alcol. Sono state confermate le associazioni significative solo per 3 polimorfismi: rs4912905 (modello dominante: OR=0,419, 95%CI= 0,233-0,754, p=0,004), rs17100234 (modello dominante: OR= 0,520, 95% CI=0,279-0,970, p=0,040) e rs7701443 (modello recessivo, OR=2,639, 95%CI=1,116-6,239, p=0,027). Per tutti gli altri SNP non sono state evidenziate associazioni significative.

Gli autori sono coscienti di alcuni limiti di questo studio tra cui il trattamento combinato degli steroidi con l'idrossiclorochina. Tuttavia, questo farmaco mostra i propri effetti appena dopo 3-6 mesi dall'inizio della terapia, mentre il follow up dei pazienti in questo studio è stato di 12 settimane. Dal punto di vista statistico, gli autori sono coscienti che altre variabili quali la dieta, l'attività fisica e fattori psicologici avrebbero dovuto essere considerati nell'analisi multivariata; inoltre, in seguito all'aggiustamento con il test di Bonferroni per tener conto del multiple comparison, non è emersa nessuna associazione significativa tra gli SNP presi in esame e la risposta clinica. Infine gli autori sottolineano anche il problema del numero ridotto di pazienti arruolati nello studio e la necessità di validare gli SNP in altre popolazioni.

In conclusione, questo è il primo studio condotto in pazienti cinesi affetti da LES per studiare l'associazione tra polimorfismi genetici del GR e l'efficacia del trattamento con GC. I risultati di questo studio suggeriscono che i polimorfismi genetici rs4912905, rs17100234 e rs7701443 nel gene NR3C1 potrebbero giocare un ruolo importante nella risposta agli steroidi. Gli autori sottolineano la necessità di una validazione dei loro risultati in una popolazione indipendente e più ampia, per aumentare il potere statistico. Inoltre sottolineano la necessità di confermare questi risultati in altri gruppi etnici. Test diagnostici per la genotipizzazione di questi SNP potrebbero rappresentare un importante strumento per migliorare la terapia con LES.

Parole chiave: efficacia, polimorfismi genetici, glucocorticoidi, recettore dei glucocorticoidi, Lupus Eritematoso Sistemico

Riferimento bibliografico

[Zou YF](#) et al. *Autoimmunity* 2013, 46(8):531-6.

ASSOCIAZIONE TRA IL POLIMORFISMO CYP2C9*2 E IL DANNO EPATICO INDOTTO DA BOSENTAN

A cura della Dott.ssa Virginia Paribello

Il bosentan è un antagonista del recettore dell'endotelina approvato per il trattamento dell'ipertensione arteriosa polmonare (PAH), una condizione debilitante progressiva caratterizzata da elevata resistenza delle arterie polmonari. Clinicamente la PAH è caratterizzata da una pressione arteriosa polmonare media maggiore di 25 mmHg e da una pressione venosa polmonare inferiore a 15 mmHg. La PAH può avere diversa eziologia, ma ha una patogenesi comune che si traduce in rimodellamento vascolare polmonare con

proliferazione ed ipertrofia delle cellule muscolari lisce delle arterie polmonari, vasocostrizione, disfunzione endoteliale e trombosi in situ (McLaughlin, V.V. et al. *J.Am.Coll.Cardiol.* 53, 1573-1619-2009).

La limitazione clinica nell'utilizzo di bosentan è rappresentata dal danno epatico farmaco-indotto (DILI) nei pazienti in trattamento. I possibili meccanismi alla base del danno epatico bosentan-indotto includono una diminuzione della captazione epatica di bosentan da parte di OATP1B1/1B3 a cui consegue un incremento dell'esposizione sistemica, nonché una diminuzione dell'attività degli enzimi CYP, risultante in un'aumentata esposizione sistemica ed intraepatica al farmaco. E' inoltre noto che bosentan inibisce la funzionalità di diverse pompe deputate all'escrezione degli acidi biliari, come la pompa di esportazione dei sali biliari (BSEP) e la multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2), provocando un accumulo di acidi biliari a livello intraepatico e, conseguentemente, danno epatico. Numerosi studi hanno analizzato le interazioni farmaco-farmaco risultanti nell'inibizione dei trasportatori epatici e/o degli enzimi del CYP (Trelber A et al. *DrugMetab.Dispos.* 35, 1400-1407-2007// Burgess G. et al. *Eur.J.Clin.Pharmacol.* 64,43-50-2008). Nessuno studio ha ancora valutato l'influenza dei polimorfismi a singolo nucleotide nei geni che codificano per le proteine coinvolte nella disposizione del bosentan come il CYP2C9, il CYP3A4, l'OATP1B1/1B3, BSEP e MRP2.

Sulla base di queste osservazioni Markova et al. hanno ipotizzato possibili associazioni tra il danno epatico bosentan-indotto e gli SNPs nei geni di CYP2C9, CYP3A4, OATP1B1, OATP1B3, BSEP e MRP2.

Questo studio di farmacogenetica è prospettico. Inizialmente, sono stati reclutati 96 pazienti affetti da PAH, presso University of California e San Francisco Medical Center's Pulmonary Hypertension Clinic. I pazienti erano di origine caucasica (61%), asiatica (15%), ispanica (15%) ed afro-americana (5%). Solo il gruppo dei pazienti caucasici (n=56) è risultato essere sufficientemente grande per effettuare un'analisi di associazione genetica. In primo luogo, sono state definite le covariate cliniche: età, sesso, indice di massa corporea, storia di malattia epatica, esposizione a bosentan (dose cumulativa in mg/m² di superficie corporea) e comediazioni con inibitori del CYP3A4, CYP2C9, OATP1B1, OATP1B3, MRP2 e BSEP. Successivamente sono state selezionate le covariate genetiche. Dopo un'ampia ricerca in letteratura sono stati selezionati dodici polimorfismi funzionali in cinque geni (*ABCB1*, *ABCC2*, *CYP2C9*, *SLCO1B1*, *SLCO1B3*) implicati nella farmacocinetica di bosentan ed è stata valutata la correlazione con la variazione dei livelli di alanina aminotransferasi (ALT) ed aspartato aminotransferasi (AST) nonché con l'insorgenza di danno epatico farmaco-indotto (DILI). La coorte dello studio era composta per la maggior parte da donne (71%), di età media di 51±13 anni, con indice di massa corporea di 30.8±7.6 kg. Il trattamento con bosentan è iniziato con 125-250 mg al giorno e continuato per un periodo di tempo variabile, dipendente dalla data di iscrizione e/o dal ritiro dallo studio dovuto a sviluppo di tossicità epatica indotta da bosentan. I livelli sierici di ALT e AST sono stati determinati prima dell'inizio del trattamento e successivamente, ogni mese, al fine di monitorare la funzionalità epatica.

Dopo aggiustamento per indice di massa corporea, solo il polimorfismo CYP2C9*2 è risultato associato con ALT, AST e DILI ($\beta=2.16$, $P=0.024$; $\beta=1.92$, $P=0,016$; odds ratio 95% CI=2.29-∞, $P=0.003$, rispettivamente). *In vitro* il metabolismo di Bosentan è risultato essere significativamente ridotto per CYP2C9*2 e per CYP2C9*3 rispetto a CYP2C9*1.

Questi risultati suggeriscono che il CYP2C9*2 è stato identificato come un potenziale fattore di rischio per l'insorgenza di danno epatico bosentan-indotto e quindi come marcatore genetico potenziale per la previsione di danno epatico. Ulteriori studi sono necessari per chiarire la base molecolare di questa associazione, in quanto gli effetti sul metabolismo del bosentan da parte di questo polimorfismo sono modesti. Il CYP2C9*2 è stato già associato a diminuzione della clearance di warfarin, fenitoina, celecoxib e losartan.

Il polimorfismo CYP2C9*2 è associato con ALT, AST e DILI.

Parole chiave: Bosentan, CYP2C9*2, danno epatico, PAH

Riferimento bibliografico

[Markova SM](#) et al *Clin Pharmacol Ther* 2013, 94(6):678-86.



Sostieni la Società Italiana di Farmacologia

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

È sufficiente apporre la propria firma ed indicare, sulla dichiarazione dei redditi, nel riquadro associazioni di volontariato, onlus, associazioni di promozione sociale e da altre fondazioni e associazioni riconosciute, il Codice Fiscale della SIF che è 97053420150, per destinare tali fondi a Borse di studio SIF per giovani ricercatori.

Per maggiori informazioni, contattare la segreteria SIF: tel. 02-29520311.

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

SIF – FARMACOGENETICA

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

Registrazione del Tribunale di Milano n° 180 data 31/03/2010 - ISSN 2282-4758

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 Cargini (Università del Piemonte Orientale) Dott.ssa Lucia Gozzo (Università di Catania) Dott.ssa Gloria Ravegnini (Università di Bologna) Dott.ssa Eleonora Turrini (Università di Bologna) Dott. ssa Eva Cuzzoni (Università di Trieste) Dott. ssa Raffaella Franca (Università di Trieste) Dott.ssa Valeria Conti (Università di Salerno) Dott.ssa Virginia Paribello (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

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@sigr.it con oggetto: CANCELLA.
