



SIF - FARMACOGENETICA



Newsletter Numero 60 – Marzo 2014

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

Sommario

Oncologia

- Polimorfismi della timidilato sintasi sono associati con l'*outcome* terapeutico di pazienti affetti da tumore al polmone non a piccole cellule, trattati con chemioterapia basata sul platino
- Ridotta espressione genica di ABCG2 ed aumentata espressione di SLC22A1 sono associate alla risposta ad imatinib in pazienti affetti da leucemia mieloide cronica
- Un polimorfismo a singolo nucleotide (rs4462560) nel gene NEIL1 predice il rischio di tossicità indotta da radiazioni in pazienti affetti da carcinoma esofageo ed in trattamento con radioterapia definitiva
- Predittori farmacogenetici di neuropatia periferica severa in pazienti con tumore del colon trattati con chemioterapia adiuvante a base di oxaliplatino: gruppo di studio GEMCAD

Neurologia

- Un polimorfismo *splice-site* del gene *SCN1A* modifica l'effetto della carbamazepina sull'eccitabilità corticale - uno studio farmacogenetico di stimolazione magnetica transcranica

Pediatria

- Determinanti genetici ed in vivo di sensibilità ai glucocorticoidi in relazione alla risposta clinica nella sindrome nefrosica pediatrica
- Varianti della Acido ialuronico-sintasi 3 (HAS3) e cardiomiopatia correlata alle antracicline: un report dal gruppo oncologico pediatrico (COG)
- I genotipi di VKORC1 e CYP2C9 sono fattori predittivi degli esiti clinici della terapia con warfarin nei bambini

La mini rassegna del mese L'efavirenz e i polimorfismi di CYP2B6

- Aggiustamenti della dose di efavirenz basati sulla farmacogenetica: suggerimenti per una popolazione africana e per i portatori di diversi genotipi del CYP2B6
- Biomarker farmacogenetici e clinici per concentrazioni plasmatiche subterapeutiche di efavirenz in adulti Thai HIV-1 infetti

La metanalisi del mese

- Mutazione V600E di BRAF: effetto sulla risposta tumorale alla terapia anti-monoclonale con anti-EGFR nel trattamento di prima linea del cancro del colon-retto metastatico

ONCOLOGIA

POLIMORFISMI DELLA TIMIDILATO SINTASI SONO ASSOCIATI CON L'OUTCOME TERAPEUTICO DI PAZIENTI AFFETTI DA TUMORE AL POLMONE NON A PICCOLE CELLULE, TRATTATI CON CHEMIOTERAPIA BASATA SUL PLATINO

A cura della Dott.ssa Gloria Ravegnini

Il tumore al polmone è il tipo di cancro più comune in Europa e, in particolare, quello non a piccole cellule (NSCLC) rappresenta circa il 75-80% di tutti i sottotipi istologici. L'alto tasso di mortalità dipende, da una parte, dalla mancanza di efficaci mezzi di *screening* che permettano di approdare ad una diagnosi negli stadi iniziali della malattia; dall'altra, dall'incapacità di identificare subset di pazienti che potrebbero beneficiare di chemioterapia adiuvante (CT) o di terapie adiuvanti specifiche per determinati targets.

Ad oggi, più del 70% dei pazienti ricevono la diagnosi quando sono già in stadio avanzato e sono quindi buoni candidati per i trattamenti adiuvanti, sistemici adiuvanti o palliativi con CT basata sul platino. Benché l'utilizzo del platino o del carboplatino sia efficace in combinazione con altri agenti chemoterapici, non basati sul platino, quali paclitaxel e gemcitabina, tuttavia sono state osservate notevoli variazioni nella risposta al trattamento, imputabili alla presenza di polimorfismi genetici che altererebbero il metabolismo e l'attività stessa del farmaco.

La timidilato sintasi (TS), enzima codificato dal gene TYMS, catalizza la metilazione del 2-deossiuridina-5-monofosfato (dUMP) a dTMP ed è importante per la metabolizzazione di diversi chemioterapici; sono stati descritti 3 polimorfismi in regioni non codificanti (UTRs), rs34743033, rs2853542 (polimorfismi situati nella regione *enhancer* di TS –TSER) e rs34489327, che sembrano influenzare i livelli di espressione di TS. rs34743033 è una ripetizione in tandem di 28bp; nell'uomo si ritrovano con maggior frequenza, due (2R) o tre (3R) ripetizioni, con l'allele 3R associato con un'efficienza di espressione e traslazione di TS maggiore rispetto all'allele 2R. rs2853542 è uno SNP funzionale C>G localizzato nell'allele 3R (3RC vs 3RG); tale SNP modifica il sito di legame per il fattore stimolatorio *upstream* (USF), con l'allele 3RG che facilita il legame con USF. rs34489327 è un'inserzione/delezione di 6bp a livello del nucleotide 1494, situato nella regione 3'UTR; questo polimorfismo è in *linkage disequilibrium* (LD) con rs34743033 e rs2853542 ed è stato quindi ipotizzato che, insieme, i suddetti polimorfismi, possano avere un impatto sull'efficacia della chemioterapia, influenzando sull'*overall survival* (OS) in pazienti affetti da NSCLC.

Nello studio sono stati arruolati un totale di 130 pazienti con NSCLC avanzato e trattati con CT basata sul platino.

Per quanto riguarda i polimorfismi rs34743033, le analisi di sopravvivenza non hanno riportato differenze tra i pazienti con diverso numero di ripetizioni in tandem e l'OS a 12 e 36 mesi; la genotipizzazione di rs2853542 dell'allele 3R ha indicato che gli omozigoti per 3RG hanno presentato una prognosi migliore a 36 mesi ($p = 0,004$) e in termini di sopravvivenza totale ($p = 0,003$) in confronto a pazienti con genotipo 2R3RG. Lo studio ha mostrato inoltre che i pazienti con un genotipo che favorisce un'espressione di TS alta o media (portatori di almeno un allele 3RG) hanno una prognosi migliore di quelli con un genotipo a "bassa espressione" (2R2R, 2R3RC and 3RC3RC).

Nel caso del polimorfismo 1494del6, usando un modello codominante, è emerso che i pazienti con genotipo omozigote per l'inserzione di 6bp (6bp+) avevano uno scarso tasso di sopravvivenza a 12 mesi se comparati con gli individui eterozigoti 6bp+/6bp- ($p=0.020$). La presenza dell'allele 6bp- sembra infatti essere associata con un ridotto rischio di morte e ciò è confermato dal fatto che tutti i pazienti omozigoti per tale allele erano vivi dopo 12 mesi. Tale dato è supportato anche nel modello recessivo, secondo cui i soggetti portatori della variante 6bp- erano associati con una prognosi migliore ($p=0.006$). Nessuna differenza significativa è emersa per OS a 36 mesi nei modelli analizzati. Considerando il polimorfismo TYMS 6bp, è stato quindi osservato che l'allele 6bp- è associato ad una migliore prognosi. Infatti, considerando l'OS a 12 mesi, i soggetti eterozigoti 6bp+/6bp- avevano un tempo di sopravvivenza maggiore rispetto a quelli omozigoti 6bp+/6bp+; nessun caso di morte è stato riscontrato per pazienti 6bp-/6bp-. Di conseguenza si può ipotizzare che l'allele 6bp- sia importante nel predire il tempo di sopravvivenza nei pazienti affetti da NSCLC.

Analizzando gli aplotipi TSER e TYMS 1494del6, sono state osservate differenze tra i pazienti con aplotipo 2R/6bp+ a 2R/6bp- ($p=0.026$) e 2R/6bp+ e 3RG/6bp- ($p=0.045$).

I tre polimorfismi analizzati sono risultati in LD nella popolazione presa in considerazione ($p=0.00058$).

Lo studio ha dunque confermato che i tre polimorfismi analizzati, sono in LD; l'associazione è risultata maggiore con gli aplotipi con l'allele 6bp-, suggerendo un ruolo prominente del polimorfismo nella regione 3'UTR nel predire la prognosi di pazienti con NSCLC avanzato.

In conclusione, questo è stato il primo studio che ha valutato tre polimorfismi della timidilato sintasi nell'*outcome* terapeutico di pazienti affetti da tumore al polmone non a piccole cellule. Secondo i risultati ottenuti il genotipo di TS potrebbe essere un utile strumento per la predizione dell'*outcome* terapeutico con regimi chemioterapici ed enfatizza l'importanza di analizzare l'aplotipo TSER/TYMS per tali pazienti.

Parole chiave: NSCLC, chemioterapia basata sul platino, timidilato sintasi

Riferimento bibliografico

[Lima A](#) et al. *Mol Biol Rep* 2014 Feb 20 [Epub ahead of print].

RIDOTTA ESPRESSIONE GENICA DI ABCG2 ED AUMENTATA ESPRESSIONE DI SLC22A1 SONO ASSOCIATE ALLA RISPOSTA AD IMATINIB IN PAZIENTI AFFETTI DA LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA

A cura della Dott.ssa Eleonora Turrini

Imatinib mesilato (IM) è il primo esempio di inibitore selettivo della tirosin-chinasi. IM inibisce la proteina di fusione BCR-ABL1, che deriva dalla traslocazione reciproca dei cromosomi 9-22 (Cromosoma Philadelphia, Ph+), che caratterizza i pazienti affetti da leucemia mieloide cronica (CML). Dati significativi di risposta al trattamento si sono osservati per pazienti affetti da CML in fase cronica, ma molti pazienti richiedono una terapia alternativa rispetto alla dose standard di trattamento (400 mg/die), che consiste nell'aumento di dose o nell'utilizzo di inibitori della tirosin-chinasi di seconda generazione (dasatinib, nilotinib). La resistenza, però, rimane un rilevante problema clinico che può dipendere da fattori dipendenti o indipendenti da BCR-ABL1. La risposta a IM rimane fortemente influenzata da trasportatori responsabili dell'influsso (SLC22A1, SLCO1A2) ed efflusso (ABCB1, ABCG2) del farmaco e dagli SNPs nei geni che ne codificano l'espressione. Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare il ruolo della differente espressione di mRNA di SLC22A1, SLCO1A2, ABCB1 e ABCG2, e influenza dei relativi SNPs, nella risposta a IM in pazienti affetti da CML.

118 pazienti affetti da CML in fase cronica (63 maschi, 55 donne, età media 50,3 anni) della Casa della Misericordia di San Paolo e dell'Ospedale Brigadeiro, Brasile, sono stati arruolati tra settembre 2009 e settembre 2010. 71 pazienti hanno precedentemente assunto interferone- α (INF- α), inclusi 45 pazienti sottoposti a questa terapia per meno di un anno. I pazienti sono stati trattati con la dose standard di IM, 400 mg/die, ed è stata confermata l'aderenza alla terapia per almeno 6 mesi. Sono stati considerati responsivi, così classificati sulla base dei criteri dell'*European LeukemiaNet* (2009), i pazienti che raggiungevano la risposta citogenetica completa (CCyR, ovvero la percentuale di cellule Ph+ non è pressoché più rilevabile) entro 18 mesi dall'inizio del trattamento ($n=70$), mentre pazienti che non raggiungevano CCyR o che subivano ricadute durante il trattamento sono stati considerati non responsivi ($n=48$). I pazienti non responsivi sono stati trattati con dosi più alte di IM (600 o 800 mg/die). I non responsivi sono stati ulteriormente classificati come aventi resistenza primaria, intendendo inefficacia di IM dall'inizio della terapia, o secondaria, intendendo perdita di CCyR in seguito a diversi tempi di trattamento. I pazienti con anomalie citogenetiche diverse dal Ph+ e/o con mutazioni in BCR-ABL1 sono stati esclusi dallo studio. È stato studiato un sottogruppo di 30 pazienti il cui RNA era stato collezionato al momento della diagnosi e prima dell'inizio di qualsiasi trattamento. Un gruppo di 120 donatori sani è stato selezionato per valutare la frequenza allelica minore (MAF) di SNPs nei soggetti sani e per analizzare il rischio di essere affetti da CML per genotipo e frequenza allelica.

I pazienti responsivi e non responsivi, sono risultati paragonabili per età, indice di massa corporea, conta di globuli rossi, bianche e piastrine. La frequenza di pazienti precedentemente trattati con INF- α era maggiore nei non responsivi rispetto ai responsivi ($P = 0,033$). Nel gruppo dei responsivi, il raggiungimento della risposta molecolare maggiore (MMR, riduzione dei livelli di trascritto BCR-ABL1 sotto lo 0,1%) e completa (CMR, riduzione sotto lo 0,0032%) sono stati 83,9% e 21,4%, rispettivamente nei responsivi e nei non responsivi. Nel gruppo dei non responsivi, il 73% presentava resistenza primaria, dopo 19,5 mesi di terapia con IM, il 27% raggiungeva CCyR, ma poi presentava ricadute dopo 30,7 mesi (resistenza secondaria). Nei pazienti non responsivi, il 54,2% raggiungeva CCyR dopo l'aumento della dose di IM e l'incidenza di MMR è risultata 54,1% e di CMR 6,3%. I restanti non responsivi che non raggiungevano CCyR dopo l'aumento della dose di IM sono passati al trattamento con inibitori della tirosin-chinasi di seconda generazione (dasatinib, nilotinib) e nessuno di essi ha manifestato progressione della malattia durante il trattamento, rimanendo quindi in fase cronica. Dei 30 pazienti il cui RNA è stato collezionato al momento della diagnosi, 12 hanno raggiunto CCyR grazie al trattamento con IM, mentre 18 sono risultati resistenti (15 con resistenza primaria e 3 secondaria). L'espressione di mRNA di ABCG2 è risultata più alta nei non responsivi rispetto ai responsivi ($P = 0,028$) e questa sovra regolazione del gene è stata associata a pazienti che avevano manifestato resistenza primaria ($P = 0,029$), ma non resistenza secondaria a IM. Inoltre, pazienti che non raggiungevano MMR presentavano sovraespressione di ABCG2 a livello di mRNA ($P = 0,027$). Una correlazione positiva è stata osservata tra i trascritti di BCR-ABL1 e i livelli mRNA di ABCG2 tra i non responsivi ($P = 0,028$). Gli autori si sono interrogati sulla possibilità che nei pazienti non responsivi l'espressione di ABCG2 fosse maggiore prima del trattamento con IM e questo dato è stato confermato ($P = 0,046$), oltre al fatto che l'espressione diminuiva in seguito all'inizio della terapia ($P = 0,031$), dati che è stato possibile ottenere dal sottogruppo di 30 pazienti il cui RNA era stato stoccato al momento della diagnosi. Nei 16 pazienti del gruppo in studio che sono passati al trattamento con gli inibitori della tirosin-chinasi di seconda generazione, è stato dimostrato che una maggiore espressione di ABCG2 era correlata ad un rischio 24-volte maggiore di non raggiungere CCyR ($P = 0,018$). I livelli di mRNA di ABCB1 e SLC22A1 non hanno mostrato differenze significative né prima né durante la terapia con IM, ma una più elevata espressione di SLC22A1 si è riscontrata in pazienti responsivi che raggiungevano MMR ($P = 0,009$). I livelli di mRNA di ABCB1 non sono stati associati né a CMR né a MMR. Non è stato possibile rilevare l'espressione di mRNA di SLCO1A2 nelle cellule del sangue periferico dei pazienti. La presenza di SNPs non è stata associata ai livelli di mRNA dei trasportatori in studio. Pazienti portatori dell'allele ABCG2 34A sono stati associati ad un maggiore rischio di sviluppare la patologia ($P = 0,030$). Evidenze riguardo la correlazione tra SNPs e risposta alla terapia con IM si sono riscontrate per il genotipo ABCG2 421CC, che era presente in tutti i pazienti responsivi che raggiungevano CMR ($P = 0,025$).

Una elevata espressione del trasportatore di efflusso ABCG2 può mediare la resistenza ad IM e può influenzare la risposta agli inibitori della tirosin-chinasi di seconda generazione, mentre una elevata espressione del trasportatore di influsso SLC22A1 può essere associato ad una migliore risposta molecolare alla terapia con IM.

I risultati ottenuti supportano l'ipotesi che la resistenza primaria ad IM sia associata principalmente alla sua farmacocinetica. Un'aumentata espressione di ABCG2 provoca una diminuita concentrazione intracellulare di IM, che esita in una diminuzione della sua efficacia. Un limite dello studio è la mancanza dei dati relativi ai livelli plasmatici di IM, che potevano essere utili per confermare l'ipotesi che pazienti non responsivi potessero avere differenti livelli plasmatici di IM.

Parole chiave: imatinib mesilato, leucemia mieloide cronica, resistenza, trasportatori, farmacogenomica

Riferimento bibliografico

[de Lima LT](#) et al. Med Oncol 2014, 31(3):851.

UN POLIMORFISMO A SINGOLO NUCLEOTIDE (RS4462560) NEL GENE NEIL1 PREDICE IL RISCHIO DI TOSSICITÀ INDOTTA DA RADIAZIONI IN PAZIENTI AFFETTI DA CARCINOMA ESOFAGEO ED IN TRATTAMENTO CON RADIOTERAPIA DEFINITIVA

A cura della Dott.ssa Sarah Cargin

La tossicità esofagea radioindotta (RIET) ed il manifestarsi di polmoniti da radiazioni (RP) sono due effetti avversi gravi conseguenti alla radioterapia toracica. È noto in letteratura come la variabilità genetica individuale influenzi, almeno in parte, il rischio di insorgenza di radiotossicità in pazienti in trattamento radioterapico. Nello specifico, è stato evidenziato l'impatto di alcune varianti in geni coinvolti nel meccanismo di riparazione per escissione di basi sul rischio di tossicità indotta da radiazioni in pazienti oncologici. La via di riparazione per escissione di base (BER, *base excision repair*) è, infatti, il principale processo enzimatico deputato alla rimozione del danno a singoli nucleotidi indotto da specie reattive dell'ossigeno o da agenti alchilanti. Tale meccanismo enzimatico si avvale di due vie di riparazione: 1) la via definita *short-patch*, in cui glicosilasi come VIII-like1 (NEIL1) e la DNA glicosilasi 8-idrossiguanina (hOGG1) partecipano alla sostituzione di un singolo nucleotide con base alterata; 2) la via detta *long-patch*, dove la flap-endonucleasi1 (FEN1) è essenziale per la riparazione del danno ad una sequenza costituita da più di due nucleotidi alterati. Una subottimale capacità di riparazione del meccanismo BER risulta associata ad una maggiore radiosensibilità dei tessuti nonché ad una severa tossicità indotta da radiazioni.

Obiettivo dello studio è stato quello di valutare l'impatto di 6 SNPs dei geni FEN1, hOGG1 e NEIL1 sull'insorgenza di tossicità indotta da radiazioni (RIET e RP) e sulla sopravvivenza generale (OS) in una coorte di pazienti affetti da carcinoma dell'esofago a cellule squamose ed in trattamento con radioterapia definitiva.

Lo studio è stato condotto su una coorte di 187 pazienti asiatici affetti da carcinoma dell'esofago a cellule squamose ed in trattamento con radioterapia. *Criteri di inclusione:* a) diagnosi di carcinoma dell'esofago a cellule squamose confermata mediante esame istologico; b) trattamento con radioterapia definitiva, da sola od in combinazione con chemioterapia (dose di radiazioni totale ≥ 50 grays); c) esecuzione di radioterapia ad intensità modulata; d) prelievo dei campioni di sangue periferico antecedente l'inizio della terapia. Il grado di esofagite e di polmonite acuta è stato valutato mediante la scala *Common Terminology Criteria for Adverse Events*, versione 4.0. I potenziali SNPs funzionali da analizzare sono stati selezionati a partire dai databases *The National Center for Biotechnology Information dbSNP* e *SNPinfo*, secondo i seguenti criteri: a) SNPs localizzati nelle regioni regolatorie del gene od in quelle codificanti; b) MAF $\geq 5\%$ nella popolazione Han; c) SNPs in grado di alterare l'attività dei siti di legame per microRNA o per fattori di trascrizione. Dalla ricerca sono emersi quali candidati gli SNPs FEN1 rs4246215, FEN1 rs174538, NEIL1 rs4462560 ed hOGG1 rs1052133 a cui sono stati ulteriormente aggiunti due SNPs potenzialmente funzionali, NEIL1 rs7402844 e hOGG1 rs293795. Il DNA genomico è stato estratto da campioni di sangue periferico e genotipizzato mediante discriminazione allelica in RealTime PCR.

Dei 187 pazienti analizzati (138 di sesso maschile, età media 64 anni), 49 erano in trattamento con radioterapia definitiva mentre i restanti 138 ricevevano radioterapia in combinazione con un trattamento chemioterapico. Il 22,5% dei pazienti (42/187) ha manifestato tossicità esofagea radioindotta (RIET) di grado ≥ 2 ed al 15% (28/187) è stata diagnostica una polmonite da radiazioni (RP) di grado ≥ 2 . Al termine del follow-up, 97 pazienti (55,1%) sono deceduti, con un tempo medio di sopravvivenza di 11 mesi (range: 1-49 mesi).

Dall'analisi multivariata è emerso che i pazienti con genotipo GC/CC per lo SNP NEIL1 rs4462560 presentavano un rischio significativamente più basso di manifestare RIET o RP di grado ≥ 2 rispetto ai pazienti con genotipo GG [rispettivamente: (HR, 0.421; 95% CI, 0.207-0.856; P=0.017); (HR, 0.392; 95% CI, 0.163-0.946; P=0.037)]. Al contrario, non è stata identificata nessuna correlazione tra i genotipi dei restanti SNPs analizzati ed il rischio di insorgenza di RIET o RP di grado ≥ 2 . Inoltre, non è stata riscontrata nessuna associazione significativa tra le varianti dei geni analizzati e la sopravvivenza globale nella popolazione in oggetto.

Per la prima volta, questo studio evidenzia l'impatto di varianti funzionali del gene NEIL1 sulla suscettibilità alla radiotossicità in tessuti sani e sulla sopravvivenza generale in una coorte di pazienti oncologici. Il gene

NEIL1, localizzato sul cromosoma 15q23, codifica per una glicosilasi umana deputata alla riparazione di danni ossidativi al DNA mediante escissione delle basi alterate, tra cui primariamente pirimidine ossidate. Dalla letteratura emerge come linee cellulari staminali embrionali non esprimenti il gene NEIL1, siano doppiamente sensibili a bassi livelli di radiazioni rispetto alle cellule di controllo. Inoltre, è interessante notare che un altro polimorfismo dello stesso gene (rs804270) era stata descritto in uno studio precedente (Zhai et al, *Clin Cancer Res* 2008, 14:4345-52) in associazione con il rischio di insorgenza di carcinoma della cavità orale ed orofaringea.

La variante rs4462560 nel gene NEIL1 è associata all'insorgenza di tossicità esofagea radioindotta e di polmoniti da radiazioni in pazienti affetti da carcinoma dell'esofago a cellule squamose ed in trattamento con radioterapia definitiva.

Nessuno dei 6 SNPs analizzati è risultato, però, essere correlato alla sopravvivenza globale. Ulteriori studi sono pertanto necessari al fine di a) validare in una casistica indipendente l'associazione tra la variante funzionale NEIL rs4462560 e l'insorgenza di radiotossicità in tessuti sani; b) comprendere il meccanismo molecolare alla base di tale correlazione; c) verificare in una più ampia casistica la possibile correlazione di NEIL rs4462560 o di altri polimorfismi dello stesso gene con la sopravvivenza di pazienti oncologici dopo trattamento con radioterapia.

Parole chiave: radioterapia, radio tossicità, NEIL1

Riferimento bibliografico

[Chen Y](#) et al. *Cancer* 2013, 119(23): 4205-11

PREDITTORI FARMACOGENETICI DI NEUROPATIA PERIFERICA SEVERA IN PAZIENTI CON TUMORE DEL COLON TRATTATI CON CHEMIOTERAPIA ADIUVANTE A BASE DI OXALIPLATINO: GRUPPO DI STUDIO GEMCAD

A cura della Dott.ssa Cheli Stefania

La chemioterapia (CT) adiuvante con oxaliplatino e fluoropirimidine è il trattamento standard nei pazienti con tumore del colon (CC) in stadio III dopo chirurgia e potrebbe essere considerata anche nei pazienti selezionati in stadio II ad alto rischio di malattia. La neurotossicità sensoriale è la tossicità non ematologica più rilevante legata ad oxaliplatino e può manifestarsi in due forme diverse: come sindrome acuta simile alla neuromiotonia e neurotossicità periferica ad esordio tardivo dose-limitante (OXPN). Ad oggi, sono stati identificati molti geni d'interesse nell'ambito dell'efficacia e della tossicità da oxaliplatino, compresi quelli che codificano per enzimi coinvolti nella detossificazione dei composti del platino o quelli associati con i *pathways* di riparazione del DNA, dei canali ionici voltaggio-dipendenti o delle proteine di efflusso di membrana. Diversi studi di farmacogenetica hanno identificato polimorfismi potenzialmente associati alla diversa suscettibilità ad OXPN, tuttavia i dati attuali non sono sufficientemente solidi per giustificare l'introduzione di test genetici di routine nella pratica quotidiana.

Nello studio sono stati registrati un totale di 413 pazienti di età superiore a 18 anni con CC in stadio III e stadio II ad alto rischio, trattati con CT adiuvante a base di oxaliplatino (12 cicli di FOLFOX o 8 cicli di regimi CAPOX) tra gennaio 2004 e dicembre 2009. L'OXPN è stata valutata e classificata dai medici il primo giorno di ogni ciclo di CT secondo la *National Cancer Institute Common Criteria Terminologia* per eventi avversi (NCI-CTCAE). La dose di oxaliplatino è stata ridotta da 130 a 100 mg/m² e da 85 a 75 mg/m² per i pazienti trattati rispettivamente con i regimi CAPOX e FOLFOX in caso di OXPN di grado 2 prolungato (≥ 7 ma <14 giorni) o temporaneo grado 3 (<7 giorni). Il trattamento è stato invece interrotto in caso di OXPN di grado 2 persistente (≥ 14 giorni), di grado 3 prolungato (≥ 7 giorni) o di grado 4. Scopo principale del presente studio è stata la valutazione dell'associazione tra SNPs e lo sviluppo di OXPN severa, definita come grado 2 prolungato (≥ 7 giorni) o grado 3 di qualsiasi durata. Per ogni SNP, i genotipi sono stati analizzati come una variabile categorica di tre gruppi (modello di riferimento) e valutati per la deviazione dall'equilibrio di Hardy-Weinberg (HWE). La distribuzione degli SNPs all'interno delle

caratteristiche demografiche basali e clinico-patologiche è stata valutata mediante test U di Mann-Whitney per variabili continue e il test χ^2 o il test esatto di Fisher per le variabili categoriali. L'associazione tra ogni SNPs e una severa OXPN è stata testata utilizzando la regressione logistica univariata con il test esatto di Fisher mentre per le analisi multivariate corrette per età, sesso, regime di CT adiuvante e dose cumulativa di oxaliplatino è stato utilizzato il modello di Cox. Sono stati considerati statisticamente significativi i valori di $p < 0,05$ (a due code). Tutte le analisi di statistica sono state effettuate utilizzando il *software* statistico SAS, versione 9.2 (SAS Institute, Inc., Cary, NC).

L'analisi di genotipizzazione è stata eseguita su 206 dei 225 pazienti (91,55%) inclusi nella coorte di studio e 181 dei 188 pazienti (96,27%) inseriti nella coorte di validazione. Il *follow-up* è stato di 51,4 mesi per la coorte di studio (*range* 7-96 mesi) e 49,7 mesi per quella di validazione (*range* 9-82 mesi). **Neurotossicità periferica ad esordio tardivo (OXPN)**. Un totale di 48 (23.30%) pazienti della coorte di studio e 72 (39.77%) di quella di validazione ha sperimentato OXPN severa durante il trattamento. Il tempo medio d'insorgenza di OXPN è stato rispettivamente di 119 giorni (28-210) nel coorte di studio e 112 (28-168) in quella di validazione. L'OXPN severa è risultata significativamente più frequente nel gruppo di validazione che in quello di studio ($p=0,001$). **SNPs associati a OXPN severa**. Le frequenze alleliche per tutti i polimorfismi sono risultate all'interno dei limiti di probabilità di HWE, ad eccezione di RAD23B rs1805329. Nella coorte di studio, una severa OXPN è risultata associata al polimorfismo rs2230641 nel gene *cyclin H* (CCNH) e al polimorfismo rs3114018 nel gene *ATP-binding cassette, sub-family G, member 2* (ABCG2) sia nell'analisi univariata che nell'analisi di regressione logistica usando come covariate l'età, il genere, la dose cumulativa di oxaliplatino e il regime di CT adiuvante. I pazienti con genotipo omozigote C/C per CCNH rs2230641 hanno mostrato una frequenza maggiore di OXPN severa rispetto ai portatori eterozigoti o omozigoti dell'allele T [57.15% C/C, 23,8% C/T, 21,7% T/T; odds ratio (OR)=5.03, 95% intervallo di confidenza (IC) 1,061-2,41; $p=0.042$]. Per quanto concerne il polimorfismo rs3114018 nel gene ABCG2, l'incidenza di OXPN severa è stata stimata più alta nei pazienti con genotipo A/A rispetto a quelli che presentano l'allele C (35.42% A/A, 21,7% A/C, 16,7% C/C; OR=2.67, 95% CI 0,95-4,41, $p=0,059$), anche se le differenze non hanno raggiunto la significatività statistica. Anche nella coorte di validazione, i pazienti con genotipo A/A al polimorfismo rs3114018 di ABCG2 presentano una frequenza maggiore di OXPN severa rispetto ai portatori eterozigoti o omozigoti dell'allele C (53.33% A/A, 40.22% A/C, 35,13% C/C; OR=2.84, 95% CI 1,18-4,98, $p=0,016$). Per il polimorfismo rs2230641 del gene CCNH, l'incidenza di severa OXPN è risultata più alta nei pazienti con genotipo C/C rispetto a quelli che presentano un allele T, ma le differenze non raggiungono la significatività statistica (66,66 % C/C, 40% C/T, 39.65% T/T; OR=2.87, 95% CI 0,67-12,89; $p=0.093$). Inoltre, nell'analisi combinata dei due SNPs, i pazienti con genotipo C/C per CCNH e/o genotipo A/A per ABCG2 mostrano un rischio significativamente più alto di severa OXPN rispetto a quelli che presentano un allele T per CCNH o un allele C per ABCG2 (37.73% contro 19.42%; OR = 2.37, 95% CI 1,15-4,76, $p = 0,015$). La capacità di quest'analisi combinata di prevedere OXPN severa è stata poi validata indipendentemente nella seconda coorte (58% contro il 33,33%; OR=2.81; 95% CI 1,4-5,62; $p=0,003$). Inoltre, nell'analisi di regressione logistica utilizzando come covariate l'età, il sesso, il tipo di regime di CT e la dose cumulativa di oxaliplatino, la presenza dell'aplotipo sfavorevole è risultato l'unico fattore significativamente associato con lo sviluppo di severa OXPN, sia nella coorte di studio (OR=2.46, 95% CI 1,19-5,07, $p=0,014$) che in quella di validazione (OR=2.99, 95% CI 1,45-6,13, $p=0,002$). I polimorfismi CCNH e ABCG2 sono stati associati significativamente anche con il tempo d'insorgenza di severa OXPN. I pazienti che presentano i genotipi combinati dei due SNPs (C/C e/o A/A, rispettivamente) hanno sviluppato severa OXPN molto prima rispetto a quelli che presentano un allele T per il CCNH e/o un allele C per ABCG2 sia nel gruppo di *training* (147 contro 210 giorni, $p < 0,001$) che in quello di validazione (126 rispetto a 147 giorni, $p=0,047$). Per quanto riguarda la persistente post-trattamento OXPN, i pazienti che mostrano la combinazione di genotipi (A/A e/o C/C) per i due SNPs hanno avuto un aumento della frequenza di OXPN di grado 2-3 nella visita a 6 mesi rispetto a quelli che presentano un allele T per CCNH e un allele C per ABCG2 sia nel gruppo di studio (26.92% contro 13.13%; OR=3.26, 95% CI 1,98-5,96, $p=0,022$) che nella coorte di validazione (38,77% contro 25,66 %; OR=3.56, 95% CI 1,86-5,87, $p=0,003$). Non è stata invece trovata alcuna associazione significativa tra SNPs e OXPN nelle visite a 1-, 2- e 3 anni in tutte le coorti.

Il presente studio mostra come l'analisi combinata di CCNH rs2230641 e ABCG2 rs3114018 sia predittiva di severa OXPN in pazienti affetti da tumore del colon. Tale studio è il primo che associa il gene CCNH (coinvolto nel controllo del ciclo cellulare) e il gene ABCG2 (trasportatore di efflusso di membrana espresso

in vari tessuti incluso il SNC) con l'insorgenza di severa OXPN. Quest'analisi presenta alcuni limiti quali la sua natura retrospettica o l'approccio basato su polimorfismi candidati, che si concentra su SNPs potenzialmente funzionali riportati in letteratura, ma che non copre ampiamente tutti gli SNPs dell'intero genoma. Inoltre, anche se la capacità discriminante dei singoli SNPs relativi all'OXPN potrebbe essere considerata modesta, considerando l'esiguo numero di pazienti portatori del genotipo C/C di CCNH rs2230641, gli autori sottolineano che un consistente numero di pazienti presenta il genotipo A/A di ABCG2 rs3114018 e che la combinazione dell'aplotipo C/C e/o A/A è risultato associato ad un significativo aumento del rischio di OXPN severa, sottolineando la rilevanza clinica e la potenziale applicabilità dei risultati. Nonostante i suoi limiti, quest'analisi comprende una delle più grandi popolazioni studiate con un lungo *follow-up* post-operatorio. Un altro vantaggio è che tutti i pazienti sono stati trattati con gli stessi regimi a base di oxaliplatino seguendo la stessa linee guida evitando così gli errori introdotti da diversi regimi di trattamento e gli effetti delle prime terapie. Un altro punto importante che rende i risultati ottenuti rilevanti nel campo della personalizzazione della terapia adiuvante è stata la capacità di confermare le associazioni individuate in una popolazione simile, trattata con gli stessi regimi di CT.

L'analisi combinata dei genotipi dei polimorfismi rs2230641 CCNH e rs3114018 ABCG2 potrebbe migliorare la stratificazione dei pazienti sottoposti a terapia adiuvante a base di oxaliplatino mediante una identificazione precoce dei sottogruppi predisposti geneticamente a gravi neurotossicità.

Parole chiave: oxaliplatino, neurotossicità periferica ad esordio tardivo (OXPN), ABCG2, CCNH, SNP

Riferimento bibliografico

[Custodio A](#) et al. *Ann Oncol* 2014, 25(2): 398-403.

NEUROLOGIA

UN POLIMORFISMO *SPLICE-SITE* DEL GENE *SCN1A* MODIFICA L'EFFETTO DELLA CARBAMAZEPINA SULL'ECCITABILITÀ CORTICALE - UNO STUDIO FARMACOGENETICO DI STIMOLAZIONE MAGNETICA TRANSCRANICA

A cura della Dott.ssa Donatella Carretta

Il gene *SCN1A*, che codifica per la subunità alfa del canale del sodio a dipendenza di Nav1.1, ha un ruolo cruciale nella patogenesi di molte sindromi epilettiche monogeniche e si stima sia rilevante anche nelle sindromi epilettiche con eredità complessa. Il polimorfismo *splice-site* del gene *SCN1A* (IVS5N+5 G>A, dbSNP: rs3812718) sembra contribuire alla fisiopatologia delle epilessie generalizzate genetiche ed appare associato con le proprietà elettrofisiologiche del canale e con l'effetto dei farmaci antiepilettici bloccanti il canale del sodio. Tuttavia, l'impatto del polimorfismo sulla risposta farmacologica a livello dei *network* corticali non è stato ancora definito nell'uomo. La stimolazione magnetica transcranica (TMS) consente di esaminare *in vivo* le proprietà eccitatorie ed inibitorie della corteccia cerebrale nell'uomo e dei fattori che le modificano, compresi gli effetti dei farmaci antiepilettici.

Lo scopo del presente studio è testare, tramite la TMS, le ipotesi che lo SNP rs3812718 sia associato ad un'eccitabilità corticale basale e che sia associato ad un'alterata eccitabilità dopo somministrazione del bloccante del canale del sodio carbamazepina (CBZ).

A tal fine, sono stati genotipizzati 271 volontari sani, tutti di discendenza europea, allo scopo di identificare i soggetti con genotipo rs3812718 AA e GG. Principali criteri di inclusione: destrimani, età tra i 18 e 60 anni, contraccezione per le donne. Principali criteri di esclusione: malattie neurologiche o psichiatriche, gravi condizioni mediche quali malattie oncologiche, cardiache, endocrinologiche, epilessia, crisi convulsive, uso di sostanze attive sul sistema nervoso centrale (SNC), impianti metallici nel collo o nella testa, gravidanza, allattamento. Ai soggetti è stato chiesto di astenersi dal fumare o dall'assumere sostanze attive sul SNC (quali

caffaina) per almeno 24 ore prima dell'esperimento. Lo SNP rs3812718 del gene *SCN1A* è stato genotipizzato su un ABI Prism 7900HT *Sequence Detection System* (Life Technologies Corporation) utilizzando *TaqMan SNP Genotyping Assay* (Life Technologies Corporation). I soggetti con genotipo AA e GG sono quindi stati sottoposti allo studio con TMS. La TMS è stata effettuata in due differenti giorni, almeno 2 settimane l'una dall'altra, prima (*baseline*) e 5 ore dopo l'assunzione di placebo o di 400 mg di CBZ, secondo un protocollo randomizzato, *crossover*, in doppio cieco. La TMS è stata realizzata tramite una sonda (*coil*) a forma di otto posizionato di piatto. La sonda è stata posta di piatto sul cranio con un angolo di 45 gradi rispetto al piano sagittale, inducendo una corrente nell'encefalo approssimativamente perpendicolare al solco centrale. La posizione ottimale della sonda è stata determinata registrando i potenziali evocati motori. L'intensità massima dello stimolo della TMS è stata di 2T. In ciascun soggetto è stato valutato l'emisfero sinistro, presumibilmente l'emisfero dominante. I parametri della TMS rilevati per studiare l'eccitabilità della corteccia motoria sono stati: il test stimulus (TS), la soglia motoria a riposo (*resting motor threshold*, RMT), l'inibizione intracorticale a breve intervallo (*short-interval intracortical inhibition*, SICI), la facilitazione intracorticale (*Intracortical-Facilitation*, ICF) e il periodo silente corticale (*cortical silent period*, CSP). Cinque ore dopo l'assunzione di placebo o CBZ, il livello sierico della CBZ è stato determinato allo scopo di valutare eventuali differenze tra i due genotipi.

Dei 271 soggetti genotipizzati, 140 (51%) avevano il genotipo AA (77 soggetti, 28.4%) o il genotipo GG (63 soggetti, 23.2%) dell'rs3812718. Dopo i *dropout* e l'esclusione di alcuni soggetti dallo studio, il campione finale era costituito da 92 soggetti (49 con il genotipo AA e 43 con il genotipo GG).

I parametri dell'eccitabilità corticale RMT, TS, SICI, ICF e CSP *al baseline* non hanno rivelato differenze tra i due genotipi. La somministrazione di CBZ ha determinato un aumento dei valori basali di RMT rispetto al placebo (RMT: $t(90) = -3.26$, $p = 0.002$), come pure una variazione significativa dei parametri TS e CSP (TS: $t(90) = 3.80$, $p < 0.001$; CSP: $t(80) = 2.311$, $p = 0.023$). I soggetti con genotipo GG mostravano un aumento maggiore della durata del CSP rispetto al genotipo AA dopo assunzione di CBZ, rispetto al placebo (21.53 ± 6.31 msec vs 0.56 ± 5.93 msec, $p = 0.013$).

Questo studio dimostra che la CBZ induce un aumento significativo del CSP nei soggetti con genotipo GG rispetto ai soggetti con genotipo AA. Questa è la prima dimostrazione di una relazione funzionale farmacogenetica tra questo SNP del gene *SCN1A* e la risposta alla CBZ; questi dati potrebbero in parte spiegare quanto già riportato in letteratura riguardo la correlazione di questo SNP con l'efficacia dei farmaci antiepilettici. Poiché il CSP dipende dall'intensità dello stimolo e dall'intensità della contrazione muscolare volontaria, si consigliano ulteriori studi per riprodurre e confermare i risultati. Il presente studio supporta il dato della letteratura di un'alterata efficacia dei bloccanti il canale del sodio dipendente dal genotipo rs3812718. I presenti dati raccolti in soggetti umani *in vivo* suggeriscono che questo effetto coinvolge il sistema GABAergico, in quanto le componenti tardive del CSP sono principalmente modificate dalle alterazioni dell'inibizione GABAergica delle cellule piramidali attraverso gli interneuroni.

In conclusione, i risultati di questo studio dimostrano un aumento dell'inibizione corticale dopo assunzione di CBZ nei soggetti con genotipo GG rispetto ai soggetti con genotipo AA del polimorfismo rs3812718 del gene *SCN1A*, in assenza di differenze basali dell'eccitabilità corticale.

Questo studio mostra inoltre come la TMS sia un metodo utile per investigare l'influenza delle variabili genetiche sull'eccitabilità corticale e sulla risposta farmacologica. Il presente studio ha incluso solo soggetti con un genotipo omozigote AA e GG; studi futuri dovranno includere anche il genotipo AG per caratterizzare ulteriormente gli effetti del polimorfismo rs3812718 sugli effetti della carbamazepina.

Parole chiave: stimolazione magnetica transcranica, soglia motoria a riposo, periodo silente corticale, farmacogenetica, risposta farmacologica

Riferimento bibliografico

[Menzler K](#) et al. *Epilepsia* 2014, 55: 362-369.

PEDIATRIA

DETERMINANTI GENETICI ED IN VIVO DI SENSIBILITÀ AI GLUCOCORTICOIDI IN RELAZIONE ALLA RISPOSTA CLINICA NELLA SINDROME NEFROSICA PEDIATRICA

A cura della Dott.ssa Eva Cuzzoni e della Dott.ssa Sara De Iudicibus

La sindrome nefrosica (SN) pediatrica identifica un gruppo eterogeneo di glomerulopatie caratterizzate da elevata proteinuria e ipoalbuminemia, e si verificano in 1-7 per 100.000 bambini ogni anno. Nei caucasici, circa due terzi dei pazienti sono di sesso maschile e la maggior parte sviluppa la malattia prima degli 8 anni di età. La fisiopatologia della malattia è probabilmente multifattoriale e ad oggi è stata chiarita solo in parte. Anche se relativamente benigna in termini di funzionalità renale, la SN ha un alto tasso di recidive, fenomeno che mette i bambini a rischio di gravi complicazioni. Nel trattamento della patologia è stato riscontrato un effetto benefico di diversi agenti immunomodulatori tra i quali i glucocorticoidi (GC).

Il prednisolone è lo steroide utilizzato come farmaco di prima scelta nel trattamento della SN pediatrica, e sembra essere in grado di indurre la remissione della proteinuria nel 90-95% dei pazienti. Tra questi pazienti, è evidente però una successiva variabilità interindividuale in termini sia di effetti collaterali che di ricadute della malattia. Fin ora, gli studi condotti per spiegare questa variabilità clinica nei pazienti pediatrici con SN hanno avuto poco successo: i risultati che riportano le caratteristiche basali come valore prognostico, sono prevalentemente retrospettivi e presentano esiti contraddittori. Ottenere risultati analoghi con studi prospettici sembra essere problematico vista l'incidenza di malattia relativamente bassa.

Parte di questa variabilità individuale nella risposta clinica ai GC nella SN pediatrica potrebbe essere spiegata dal complesso meccanismo d'azione dei GC, che potrebbe portare ad un'eterogeneità nella sensibilità individuale. La sensibilità ai GC dipende sia dalla funzionalità che dall'espressione del recettore dei GC, presente in maniera ubiquitaria in tutte le cellule, comprese quelle che compongono la barriera di filtrazione glomerulare.

Sul gene NR3C1, codificante per il recettore dei GC, sono stati identificati numerosi polimorfismi funzionali a singolo nucleotide. Individui portatori dell'allele minore del polimorfismo ER22/23EK (rs6189 e rs6190) e/o del polimorfismo GR-9 β (rs6198) evidenziano una sensibilità ai GC compromessa. L'allele minore dei polimorfismi BcII (rs41423247) e N363S (rs6195) sono stati associati al contrario con un aumento della sensibilità ai GC. La rilevanza del potenziale clinico di queste variazioni genetiche non è riconosciuta nei pazienti che presentano la SN: uno studio recente ha associato l'aplotipo contenente il polimorfismo BcII con una più rapida remissione della malattia (entro i 7 giorni) in pazienti pediatrici con SN, ma sfortunatamente, non ha investigato l'associazione di questo aplotipo con altri parametri clinici.

Oltre alle variazioni genetiche nel gene NR3C1, la sensibilità intrinseca ai GC si riflette *in vivo* con i test di funzionalità dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene. Una variazione interindividuale di questa risposta di feedback è stata individuata dopo trattamenti con basse dosi di desametasone, in condizioni sia fisiologiche che patofisiologiche. Inoltre, un'alterata risposta dell'asse è stata già associata con un aumentato rischio di recidive in pazienti con SN. Tuttavia, questi studi si sono focalizzati sulla funzione surrenale durante o immediatamente dopo l'esposizione ai GC esogeni, non sulla correlazione tra le variazioni intrinseche della sensibilità ai GC e la risposta clinica.

In questo studio prospettico, gli autori hanno preso in esame una coorte ben definita di bambini con SN per ottenere marker correlati agli effetti terapeutici e collaterali del prednisolone.

Sono stati arruolati 150 pazienti, di età compresa tra i 9 mesi e i 17 anni, al primo episodio di SN definito come proteinuria in range nefrosico (>200 mg proteine per mmol creatinina) e ipoalbuminemia (<25 g/l). I pazienti sono stati randomizzati in due gruppi in base al trattamento iniziale: prednisolone per 3 o 6 mesi con una dose cumulativa uguale per entrambi i gruppi (3360 mg/m²) e la somministrazione della maggior parte di farmaco entro i primi 3 mesi. I parametri clinici e la risposta dei pazienti sono stati valutati con un lungo follow up (media 4,4 anni). Pazienti che non raggiungevano la remissione entro le 6 settimane sono stati considerati resistenti, mentre la dipendenza da steroidi è stata definita come due o più recidive consecutive

durante lo scalo o entro le due settimane dopo la sospensione dello steroide. I DNA sono stati estratti dal sangue periferico dei pazienti e 113 pazienti sono stati genotipizzati, utilizzando la tecnologia Taqman, per i polimorfismi TthIII-1 (rs100522957), ER22/23EK (rs6189/6190), N363S (rs6195), *BclI* (rs41423247, e GR-9 β (rs6198). Per le successive analisi sono stati considerati i due aplotipi con una frequenza allelica superiore al 15%: GR-9 β +TthIII-1 (successivamente denominato GR-9 β) e *BclI*.

E' stato inoltre eseguito un test di soppressione del desametasone su 90 pazienti, dopo almeno 4 settimane dalla fine del trattamento: due prelievi ematici sono stati eseguiti per ogni paziente in due giorni consecutivi (tra le ore 8 e le 10). Il primo giorno (tra le 20 e le 21) i pazienti sono stati trattati con una dose di 200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ desametasone orale e sono stati valutati i valori di cortisolo post-desametasone e la percentuale di cambiamento di cortisolo tra il primo prelievo ed il secondo. Questi valori sono stati considerati come indicatori di sensibilità *in vivo* ai glucocorticoidi.

Dai risultati riportati, gli autori hanno evidenziato un'incidenza significativamente più alta di pazienti con resistenza da steroidi nei soggetti con aplotipo variante di GR-9 β rispetto ai non varianti (varianti:13/25-52%; non varianti: 19/75-25%; p-value log rank test =0,003). Hanno evidenziato inoltre come nei pazienti varianti per GR-9 β la comparsa di recidive fosse significativamente più frequente rispetto ai pazienti non varianti (pazienti varianti che hanno presentato recidive 23/25-92%; pazienti non varianti con comparsa di recidive 56/75-75%; p-value log rang test = 0,029). Per l'aplotipo *BclI* invece gli autori non hanno evidenziato associazioni significative con l'*outcome* terapeutico.

L'*outcome* terapeutico e gli effetti collaterali non hanno mostrato associazioni con i livelli o con la percentuale di cambiamento dei livelli di cortisolo dopo il test di soppressione del desametasone.

Gli autori sono coscienti di alcuni limiti di questo studio: la popolazione di studio è relativamente piccola per valutare le varianti genetiche in relazione all'*outcome* clinico, ma, nonostante ciò, sono state evidenziate alcune associazioni significative. Un altro limite che sottolineano è la variabilità dovuta alla valutazione di risposta ed effetti collaterali da pediatri di centri differenti. Questo ha però permesso di condurre, su una patologia con una bassa incidenza come la SN, uno studio a carattere prospettico su una popolazione numerosa, rappresentativa e clinicamente ben definita di pazienti con un *follow up* prolungato.

In conclusione questo studio è stato il primo a descrivere un'associazione tra l'aplotipo GR-9 β del gene del recettore dei glucocorticoidi e un peggior *outcome* clinico in pazienti pediatriche con sindrome nefrosica. Pazienti varianti per questo aplotipo hanno evidenziato una maggior incidenza di recidive e di dipendenza da steroidi rispetto ai non varianti.

Parole chiave: glucocorticoidi, sindrome nefrosica, polimorfismi genetici, recettore dei glucocorticoidi

Riferimento bibliografico

[Teeninga N](#) et al. *Kidney Int* 2014 Jan 15 [Epub ahead of print].

VARIANTI DELLA ACIDO IALURONICO-SINTASI 3 (HAS3) E CARDIOMIOPATIA CORRELATA ALLE ANTRACICLINE: UN REPORT DAL GRUPPO ONCOLOGICO PEDIATRICO (COG)

A cura della Dott.ssa Luciana Giadini e della Dott.ssa Eva Dreussi

Le antraciclinae, ad oggi, sono farmaci chemioterapici ampiamente utilizzati in clinica e sono considerati tra i più efficaci agenti antitumorali. La loro somministrazione è prevista anche in ambito pediatrico. Il loro potenziale terapeutico è, però, limitato a causa della forte correlazione dose-dipendente con lo sviluppo di cardiomiopatie irreversibili che portano a scompensi cardiaci congestizi. Il quadro risulta molto complesso anche perché è caratterizzato da una elevata variabilità interindividuale. L'identificazione di biomarcatori predittivi potrebbe quindi avere un notevole impatto clinico. Lo scopo di questo studio è l'identificazione di polimorfismi (SNPs) che possano modificare l'associazione tra l'esposizione ad antraciclinae e il rischio di sviluppare cardiomiopatie. A tal fine sono stati analizzati 34912 SNPs in 2100 geni coinvolti in malattie cardiovascolari tramite il saggio *ITMAT/Broad CARE (IBC) cardiovascular SNP array*. Per il disegno dello

studio è stato utilizzato un modello a due stadi: gli SNPs che hanno superato la soglia di significatività a livello del *Discovery set* sono stati successivamente validati usando un set indipendente (*Replication set*) di pazienti con cardiomiopatie antracicline-dipendenti.

Il *Discovery set* comprende 401 individui (130 casi, 271 controlli) appartenenti al *Children's Oncology group Study* (COG-ALTE03N1) il cui scopo iniziale consisteva nell'approfondire la patogenesi delle cardiomiopatie in bambini sopravvissuti al cancro; sia i casi sia i controlli arruolati, quindi, sono soggetti a cui è stato diagnosticato un tumore all'età di 21 anni o inferiore.

I casi hanno sviluppato cardiomiopatie e sono risultati vivi al momento dello studio. Sono stati classificati in base ai criteri dell'*American Heart Association* (AHA) e si dividono in pazienti con cardiomiopatie sintomatiche (sintomi: dispnea, ortopnea, spossatezza; segni: edema, epatomegalia e/o rantolo) o asintomatiche (con caratteristiche ecocardiografiche che evidenziano una frazione di eiezione $\leq 40\%$ e una frazione di accorciamento ventricolare $\leq 28\%$). Per ogni caso sono stati selezionati da uno a quattro controlli appartenenti allo studio COG usando i seguenti criteri di *matching*: diagnosi di tumore, anni dalla diagnosi (± 5 anni), razza ed etnia.

Il *Replication set* consiste in 76 pazienti provenienti dal *Cancer Research Hospital and Cancer Treatment* (City of Hope, Duarte, CA) di ogni età e con diversi background etnici e razziali a cui è stata diagnosticata una cardiomiopatia dopo esposizione alle antracicline.

L'analisi del *Discovery set* ha indicato che i pazienti trattati con basse/moderate dosi (≤ 250 mg/m²) o alte dosi (>250 mg/m²) hanno un rischio di sviluppare cardiomiopatie rispettivamente 7.3 (95% CI, da 1.5 a 35.8; P=.01) e 49.5 (95% CI, da 9.2 a 268.1; P<.001) più alto rispetto ai pazienti non esposti al farmaco.

Utilizzando il saggio *ITMAT/Broad CARE (IBC) cardiovascular SNP array* un solo SNP (rs2232228) nel gene HAS3 sul cromosoma 16 ha superato il livello di significatività imposto ($p=5.3 \times 10^{-7}$).

A basse/moderate dosi di antracicline il rischio di sviluppare cardiomiopatie non sembra subire differenze significative in associazione con i genotipi dello SNP rs2232228.

Tuttavia, a livello dei soggetti con il genotipo AA esposti ad alte dosi di antracicline, il rischio di cardiomiopatie aumenta significativamente con una maggiore esposizione al farmaco (esposizione alle antracicline >450 mg/m²: OR, 56.5).

Complessivamente, la presenza del genotipo AA conferisce un aumento del rischio di cardiomiopatie pari a 8.9 volte (95% CI, da 2.1- a 37.5 volte; P=.003) rispetto agli individui GG.

Nella coorte di validazione, *Replication set*, comparando i casi con genotipo GG, il rischio dei casi GA e AA di essere nel gruppo ad alte dosi di esposizione ad antracicline è rispettivamente 3.6 (95% CI, da 0.9 a 15.0; P=.07) e 4.5 (95% CI, da 1.1 a 18.7; P=.04) volte maggiore.

Dopo l'inclusione dei parametri relativi all'assenza/presenza di ipertensione e diabete nel modello, il rischio dei casi con genotipo AA di essere all'interno del gruppo ad alte dosi di antracicline è aumentato fino a 4.9 volte rispetto ai pazienti con genotipo GG.

Sono stati anche riuniti i casi delle due coorti per testare l'interazione con l'ambiente in presenza del polimorfismo rs2232228. Nei casi con genotipo AA c'è un rischio 3.7 volte maggiore (95% CI, da 1.3 a 10.2; P=.01) di essere nel gruppo dei pazienti esposti ad alte dosi di antracicline.

I risultati ottenuti in questo studio dimostrano che nei soggetti portatori del genotipo AA del polimorfismo rs2232228 il rischio di sviluppare cardiomiopatie aumenta significativamente all'aumentare dell'esposizione alle antracicline. Infatti, negli individui esposti ad alte dosi di tali farmaci, la presenza del genotipo AA aumenta di 8.9 volte il rischio di sviluppare cardiomiopatie rispetto al genotipo GG.

Il gene HAS3 su cui si trova il polimorfismo rs2232228 codifica per un enzima che produce acido ialuronico (HA) a basso peso molecolare il quale ha un ruolo importante nell'organizzazione della matrice extracellulare e permette l'adesione e la migrazione cellulare. A livello delle lesioni cardiache antracicline-dipendenti la matrice extracellulare gioca un ruolo cruciale creando un supporto per l'attacco di molte cellule quali i fibroblasti cardiaci, fondamentali per il riparo ed il rimodellamento del cuore dopo un infarto del miocardio. È inoltre noto in letteratura che HA ha una funzione protettiva rispetto al danno indotto da stress ossidativo, fattore che incide sulla tossicità associata ad antracicline. In conclusione, la protezione dallo stress ossidativo ed il rimodellamento tissutale potrebbero essere modulati dalla produzione di HA nella matrice extracellulare e potrebbero, quindi, giustificare il rischio di cardiomiopatia genotipo-dipendente in presenza del polimorfismo oggetto di questo studio.

Questo lavoro evidenzia un'importante associazione tra uno specifico polimorfismo (rs2232228) del gene HAS3 e l'insorgenza di cardiotoxicità in pazienti pediatriche sottoposti a trattamento con antracicline.

Parole chiave: antracicline, cardiomiopatia, HAS3

Riferimento bibliografico

[Wang X](#) et al. *J Clin Oncol* 2014, ;32(7): 647-53

I GENOTIPI DI VKORC1 E CYP2C9 SONO FATTORI PREDITTIVI DEGLI ESITI CLINICI DELLA TERAPIA CON WARFARIN NEI BAMBINI

A cura della Dott.ssa Valeria Conti

Il numero di bambini in terapia anticoagulante orale (TAO) con il warfarin è in aumento. Tuttavia, le linee guida per l'utilizzo di tale farmaco sono state stabilite esclusivamente in base ai risultati di studi condotti nella popolazione adulta. Il warfarin è un farmaco efficace ma poco maneggevole e il suo profilo di efficacia/sicurezza varia tra i pazienti. La gestione della terapia nel bambino è ulteriormente complicata a causa della mancanza di un completo sviluppo del sistema di coagulazione, dell'alta frequenza di malattia e della dieta irregolare. Fattori sia clinici sia genetici influenzano la determinazione della dose richiesta negli adulti. Le varianti polimorfiche nei geni codificanti l'enzima vitamina K epossido reduttasi (VKORC1) e il citocromo CYP2C9 sono le più importanti contribuendo, rispettivamente, per il 35% e il 27% della variabilità della dose richiesta. Il test farmacogenetico che include lo screening di questi polimorfismi è oggi raccomandato nei pazienti adulti, non così nei bambini a causa della mancanza di dati che sostengano la sua validità. Studi recenti hanno messo in luce l'importanza di fattori dipendenti dall'età e l'influenza esercitata dai polimorfismi summenzionati sulla variabilità della dose richiesta di warfarin anche nella popolazione infantile.

Questo studio si propone di misurare l'impatto dei polimorfismi sugli *outcome* clinici più importanti della TAO con warfarin, come il tempo trascorso in condizione di over anticoagulazione e il rischio di sanguinamento maggiore nei bambini.

Sono stati reclutati pazienti in terapia con warfarin di età inferiore ai diciannove anni dal *Canadian Pharmacogenomics Network for Drug Safety*: 86 soggetti sono stati reclutati dal B.C. Children's Hospital (Vancouver, Canada) e altri 7 erano stati arruolati in precedenza presso l'ospedale Hospital for Sick Children, Toronto. Le indicazioni alla terapia anticoagulante con warfarin erano la procedura di Fontan, la sostituzione di valvola cardiaca meccanica e il tromboembolismo venoso profondo. L'*international normalized ratio* (INR, valore impiegato per monitorare costantemente la TAO) è stato considerato "terapeutico", in accordo con le linee guida, nell'intervallo di valori <2,5, 2-3, e >2,5. La dose terapeutica di warfarin è stata definita come quella stabile in almeno tre misure consecutive di INR in un periodo minimo di quattro settimane di trattamento. Il tempo trascorso nei valori terapeutici di INR e quello trascorso in condizione di over-anticoagulazione sono stati registrati rispettivamente dal momento della prima misura di INR all'interno o sotto il valore target e al primo INR>4 all'interno di sessanta giorni di terapia. Gli eventi di sanguinamento maggiore, definiti secondo i criteri dell'*International Society of Thrombosis and Haemostasis* (ISTH), sono stati registrati per tutto il periodo di trattamento.

Per le analisi di genotipizzazione, sono stati scelti dodici geni: VKORC1, CYP2C9, CYP4F2, CYP2C18, EPHX1, CALU, GGCX, PROC, APOE, POR, F2 e A2M. Il DNA genomico è stato estratto da campioni di sangue o di saliva utilizzando il Qia Symphony purification system (Qiagen, Canada) e, mediante la tecnica Vera Code Golden Gate Genotyping Assay (Illumina, CA), sono stati analizzati trenta SNPs in precedenza associati con gli esiti clinici della terapia con warfarin negli adulti, nove SNPs in regioni non codificanti e cinquantaquattro aplotipi. Il polimorfismo (rs2108622) del CYP4F2 è stato studiato con il saggio TaqMan Genotyping Assay (AppliedBiosystems, CA).

Lo studio è stato condotto su novantatré bambini, con età media di 4,8 anni. L'indicazione all'uso di warfarin più frequente era la procedura di Fontan seguita dalla sostituzione di valvola e dal tromboembolismo venoso.

Le frequenze genotipiche trovate erano compatibili con quelle presenti in letteratura. E' stata osservata una grande variabilità nella richiesta della dose all'interno delle diverse indicazioni con il valore più basso registrato per la procedura di Fontan. Per quanto riguarda il polimorfismo -1639 G>A di VKORC1, i bambini omozigoti AA erano associati ad una dose di farmaco più bassa dei soggetti AG e GG. Per gli alleli CYP2C9*2 e *3, i pazienti CYP2C9*1/*3 richiedevano una dose di farmaco più bassa dei *wild type* CYP2C9*1/*1 come i pazienti CYP2C9*1/*2 ma, in questo caso, le differenze non erano statisticamente significative. L'analisi multivariata ha mostrato che il peso, il tipo d'indicazione e i genotipi VKORC1 e CYP2C9 spiegavano il 76.3% della variabilità della dose stabile di warfarin e il peso era la variabile di predizione più importante, responsabile del 52,8% della variabilità.

I risultati di questo studio forniscono evidenze ulteriori, rispetto a quelle già presentate negli individui adulti, sull'utilità della farmacogenetica del warfarin. Gli autori hanno dimostrato, che i fattori genetici contribuiscono significativamente alla variabilità della risposta terapeutica e sottolineano la validità di un algoritmo farmacogenetico per la determinazione della dose di questo farmaco nella popolazione pediatrica. I portatori degli SNPs correlati con una più alta sensibilità al farmaco sono risultati esposti ad un aumento del rischio di over-anticoagulazione (INR>4) e quindi di emorragie maggiori. VKORC1 è stato riconosciuto come il marker genetico più importante anche se il suo contributo alla variabilità della dose (12.2 %) è risultato leggermente inferiore a quello ritrovato nella popolazione adulta (15–35%) e in altri studi sui bambini (18–47%). Tuttavia, l'effetto molto rilevante (52,8%) esercitato dal peso sulla variabilità della dose richiesta può avere diminuito l'effetto del genotipo.

I risultati sulle varianti del CYP2C9 (contributo alla variabilità pari complessivamente all'8.9%) erano sovrapponibili a quelli degli studi condotti negli adulti e confermano un contributo del 5–22% nella variabilità della dose. In questa coorte di pazienti pediatriche l'effetto era dovuto principalmente all'allele variante *3 e la sensibilità al warfarin legata a questa variante era superiore a quella rilevata in altri studi sui bambini, che, però, raggruppavano insieme gli individui con le varianti *2 e *3. Questi risultati sono in accordo con quelli dello studio di Biss e collaboratori (Biss et al. *Blood* 2012, 119:868–873), che aveva mostrato che l'algoritmo dell'*International Warfarin pharmacogenetic Consortium* (IWPC) utilizzato negli adulti comporta una sovrastima della dose stabile di warfarin nei bambini. Questo può essere, in parte, spiegato da una influenza più forte esercitata dalla variabile età nella popolazione pediatrica.

Per quanto riguarda la procedura di Fontan come indicazione alla terapia, l'influenza del genotipo VKORC1 sulla variabilità della dose di warfarin era pari al 47% e questo è attribuibile alla particolare omogeneità di questo gruppo di pazienti che ha ridotto probabilmente l'impatto di altri fattori clinici età-dipendenti. Tuttavia, dato che in questa sottopopolazione di pazienti, è aumentato il contributo alla variabilità esercitato da VKORC1 ma non da CYP2C9, altri studi dovranno confermare questi dati.

Lo studio di Biss e collaboratori rappresenta attualmente il modello migliore di algoritmo farmacogenetico nei bambini ed il modello proposto in questo studio deriva dal precedente, fatta eccezione per il fatto che in questo studio il peso, invece dell'altezza, è stato riconosciuto come la variabile più importante insieme ai genotipi VKORC1 e CYP2C9. Inoltre, il genotipo VKORC1 è indicato anche come fattore cruciale per determinare la permanenza nel *range* di INR terapeutico a differenza di quanto suggerito in studi precedenti nei bambini che non avevano trovato nessuna associazione tra VKORC1 e CYP2C9 con questo *outcome*.

Infine, questo studio rivela l'importanza anche di un altro SNP di CYP2C9 (rs7089580) come possibile predittore indipendente della dose richiesta di warfarin. Questo SNP, una variante intronica, era già stato descritto da Perera e collaboratori come fattore influenzante l'incremento della dose richiesta di warfarin nella popolazione afro-americana. Tuttavia, l'impatto funzionale di questo polimorfismo rimane sconosciuto e altri studi sono necessari per chiarirne il ruolo sia negli adulti che nei bambini.

Questa ricerca ha alcune limitazioni. Una riguarda la variabilità nella frequenza con cui veniva eseguito il test per la misura dell'INR nella popolazione in studio, un'altra attiene alla carenza di dati sulla dieta e l'evenienza di malattia, fattori molto importanti nella popolazione infantile. Un'altra limitazione è dovuta alla mancanza di un potere statistico adeguato a rilevare piccoli effetti genetici, in particolare sugli episodi di sanguinamento.

L'applicazione di un algoritmo genetico per stimare la dose stabile di warfarin nella popolazione pediatrica potrebbe essere molto utile, incidendo favorevolmente sull'efficacia della terapia e sulla prevenzione delle reazioni avverse, in particolare sul rischio di sanguinamento. Gli SNPs di VKORC1 e CYP2C9 sono i marcatori farmacogenetici più importanti da includere in tale algoritmo.

Parole chiave: VKORC1, CYP2C9, warfarin, modello farmacogenetico, bambini

Riferimento bibliografico:

[Shaw K](#) et al. *Pediatr Blood Cancer* 2014 Jan 29 [Epub ahead of print]

LA MINI RASSEGNA DEL MESE

L'EFVIRENZ E I POLIMORFISMI DI CYP2B6

L'efavirenz (EFV) rappresenta l'inibitore non-nucleosidico della trascrittasi inversa (NNRTI) più ampiamente utilizzato per la terapia dei pazienti HIV+ come parte della terapia antiretrovirale altamente attiva (*highly active antiretroviral therapy*, HAART). Nonostante l'ampia esperienza clinica, una variabilità interindividuale imprevedibile in termini di efficacia e tossicità rimane un importante limite associato al suo utilizzo. L'EFV presenta una significativa variabilità farmacocinetica ed una stretta finestra terapeutica, con concentrazioni plasmatiche >4µg/mL associate con tossicità al sistema nervoso centrale (SNC) ed un tasso di fallimento virologico che aumenta con concentrazioni <1µg/mL. Pertanto è raccomandato il monitoraggio dei livelli plasmatici del farmaco, anche se non sempre eseguibile, in particolare in caso di risorse limitate. Tra i fattori che influenzano la farmacocinetica dell'EFV ci sono etnia, fattori genetici, sesso, peso corporeo, interazioni farmacologiche, legame alle proteine plasmatiche, insufficienza epatica, stato della patologia e gravidanza. L'EFV subisce un'idrossilazione ossidativa primariamente dal CYP2B6 in 8-idrossi-EFV come metabolita principale e 7-idrossi-EFV come metabolita minore. In particolare, l'allele 516G>T (*6) del CYP2B6 è stato associato con una marcata riduzione dell'attività enzimatica ed un aumento dei livelli plasmatici in studi condotti su popolazioni diverse, con possibili effetti avversi e riduzione della *compliance*. Al contrario, in uno studio retrospettivo condotto su pazienti adulti Thai HIV-1 infetti è stata riscontrata una variante allelica (CYP2B6 g.C18492T) associata ad un aumento della *clearance* dell'EFV con conseguente riduzione dei livelli plasmatici e rischio di fallimento della terapia (Sukasem C et al. *Br J Clin Pharmacol* 2012, 74(6):1005-12). Inoltre, sia l'allele 136A→G del CYP2B6 e 4036A→G dell'ABCB1 influenzano le concentrazioni plasmatiche e le concentrazioni intracellulari di EFV. Questi polimorfismi sono espressi in maniera differente in diverse popolazioni e la stratificazione della dose in base all'etnia può essere utile per una migliore gestione della terapia.

Riportiamo due studi condotti su popolazioni differenti, in particolare in pazienti Ugandesi e Thai che rappresentano rispettivamente esempi di metabolizzatori lenti e rapidi dell'EFV, con effetti opposti su efficacia e sicurezza del farmaco.

AGGIUSTAMENTI DELLA DOSE DI EFAVIRENZ BASATI SULLA FARMACOGENETICA: SUGGERIMENTI PER UNA POPOLAZIONE AFRICANA E PER I PORTATORI DI DIVERSI GENOTIPI DEL CYP2B6

A cura della Dott.ssa Lucia Gozzo

La maggior parte delle popolazioni dell'Africa Sub-Sahariana sono o eterozigoti o omozigoti per le varianti alleliche difettive del CYP2B6*6 che possono risultare in una diversa cinetica dell'EFV e di conseguenza in una risposta clinica diversa rispetto ad altre popolazioni. In studi precedenti è stato trovato che il 516G>T e il 785A>G del CYP2B6 erano in *linkage disequilibrium* completo nella popolazione dell'Uganda con un'espressione globale della variante CYP2D6*6 in almeno il 50% della popolazione in confronto al 3,4%

della popolazione caucasica. Nella stessa popolazione la frequenza dei polimorfismi 136A→G del *CYP2B6* e 4036A→G dell'*ABCB1* era rispettivamente del 13,6% e 15,8%.

È stato ideato un modello farmacocinetico-farmacogenetico usando le concentrazioni plasmatiche allo stadio stazionario dell'EFV nei pazienti HIV+ per descrivere gli effetti dei geni sulla farmacocinetica dell'EFV, stimare i parametri farmacocinetici di esposizione a EFV nella popolazione in studio e stimare la dose ottimale per i pazienti Ugandesi e per i portatori delle varianti *CYP2B6*6* e dell'*ABCB1*.

Sono stati utilizzati 556 valori di concentrazione plasmatica di EFV provenienti da 99 pazienti con HIV/AIDS (64 donne) nel corso di 252 giorni dal giorno 14 dall'inizio della terapia HAART. Tutti assumevano 600 mg di EFV, zidovudina/lamivudina (150/300 mg) e in aggiunta profilassi a base di trimetoprim/sulfametossazolo. Sono stati raccolti campioni per valutare le concentrazioni plasmatiche di EFV a metà dose (11-18 ore dopo l'ultima dose) per 5 volte in ogni soggetto. La conta dei CD4 e i livelli di RNA virale sono stati valutati al basale, a 3 ed a 6 mesi. Sono stati inoltre definiti i genotipi del *CYP2B6* (*6 e *11), del *CYP3A5* (*3, *6 e *7) e dell'*ABCB1*.

L'età media dei 99 pazienti arruolati era 37,4 anni, il peso corporeo in media di 55,1 kg, i livelli sierici di albumina di 3,87 g/dL, l'alanina aminotrasferasi di 17,77 u/L, l'urea di 2,85 mMol/L e la clearance della creatinina stimata di 78,9 μ Mol/L. Le frequenze alleliche del *CYP2B6*11*, *CYP3A5* (*3, *6 e *7) e 3435C>T dell'*ABCB1* non differivano da quelle trovate in studi precedenti. Le concentrazioni più elevate, tra i 5.000 e i 10.000 ng/mL, sono state riscontrate nei pazienti esprimenti l'allele *CYP2B6*6*. La clearance apparente (CL/F) dell'EFV è risultata 2,2 e 1,7 volte superiore nei portatori del *CYP2B6*6* (*1/*1) e del *CYP2B6*6* (*1/*6) rispetto ai portatori del *CYP2B6*6* (*6/*6), mentre è stato osservato un aumento della biodisponibilità relativa (F1) nei portatori del 4046A>G dell'*ABCB1*. Il *CYP2B6*6* è risultato un predittore maggiore di esposizione a EFV, con gli omozigoti che presentano un'area sotto la curva (*area under the curve*, AUC) 2 volte superiore a quella rilevata nei *trial* clinici registrativi e riportata in scheda tecnica. I valori di AUC nei *wild-type* e negli eterozigoti mutati erano nel *range* osservato durante i *trial* clinici. L'AUC della popolazione globale era 1,25 volte superiore a quella della scheda tecnica. Riducendo il dosaggio, una dose giornaliera di EFV di 285 mg potrebbe consentire di raggiungere concentrazioni plasmatiche simili in individui omozigoti per il *CYP2B6*6*, come riportato in scheda tecnica. Similmente, un aggiustamento della dose giornaliera di 487 mg potrebbe consentire un'esposizione nel paziente Ugandese tipico adulto uguale a quella descritta in scheda tecnica. Poiché non è possibile somministrare queste dosi con le formulazioni disponibili, è stata simulata l'esposizione per i dosaggi giornalieri di 300 mg, 450 mg e 600 mg per riflettere le dosi disponibili sul mercato. L'RNA medio al basale era di 4.972 copie/ml e la conta di CD4 di 147,8. I cambiamenti medi della conta di CD4 dal basale sono risultati di 93,7 al giorno 84, 154,3 al giorno 168 e 206 al giorno 200 della HAART a base di EFV. Sei partecipanti presentavano >40 copie/mL di RNA virale dopo 84 giorni di terapia. Né la conta di CD4 né il raggiungimento di livelli di RNA < 40 copie/mL hanno dimostrato una correlazione con i livelli di esposizione ad EFV. Questo potrebbe essere in parte dovuto al fatto che la risposta è molto marcata nella maggior parte dei pazienti a tutti i livelli di esposizione.

Nonostante le evidenze disponibili sulla variabilità inter-etnica della farmacocinetica dell'EFV dipendente da fattori genetici, il dosaggio nelle popolazioni Sub-Sahariane si basa ampiamente su studi condotti in popolazioni Caucasiche. In questo studio è stata predetta una dose ottimale per i pazienti Ugandesi adulti basata sulla genetica di popolazione, raccomandando una riduzione da 600 mg a 450 mg/die. Inoltre, è stato trovato che è necessaria una riduzione del 50% nei pazienti omozigoti per la variante *CYP2B6*6*. In accordo con i *report* esistenti sulla farmacogenetica dell'EFV, questo studio dimostra che la sua variabilità farmacocinetica è ampiamente dipendente dal genotipo *CYP2B6*6*. Il ridotto metabolismo dell'EFV in soggetti omozigoti o eterozigoti per il *CYP2B6*6* comporta maggiori concentrazioni plasmatiche del farmaco ed una più alta probabilità di tossicità al SNC. Presumibilmente l'esposizione a livelli sovra-terapeutici di EFV può avere un ruolo sull'aderenza e di conseguenza sull'*outcome* del trattamento. Sei pazienti dello studio non hanno ottenuto soppressione virale, ma la mancanza di correlazione tra la carica virale e l'AUC o la carica al basale suggerisce altre possibili cause. È stato supposto che alla base del fallimento possa essere una ridotta aderenza o una resistenza virale intrinseca.

I risultati di questo studio possono essere estesi alla maggior parte delle popolazioni Sub-Sahariane, supportate dall'alta frequenza della variante *CYP2B6*6* negli Africani. Tra gli omozigoti per il *CYP2B6*6*,

la simulazione dell'esposizione con 300 mg/die di EFV era simile a quella previsti in scheda tecnica. Anche se concentrazioni sub-terapeutiche sono associate a fallimenti terapeutici, livelli sopra-terapeutici possono riflettersi in una ridotta aderenza e di conseguenza in un *outcome* peggiore. Queste raccomandazioni sulla riduzione del dosaggio sono pertanto importanti per il *management* della terapia con EFV, che può riflettersi anche in un miglioramento della qualità della vita.

In conclusione, questo studio di farmacocinetica propone un aggiustamento della dose di EFV in base al genotipo del *CYP2B6* in pazienti dell'Uganda e in generale dell'Africa Sub-Sahariana. La dose raccomandata di 450 mg e 300 mg soddisfa rispettivamente la necessità di trattamento degli Ugandesi e degli omozigoti per la variante *CYP2B6*6*, ma è necessaria cautela quando si sospettino interazioni farmacologiche. Sono necessari ampi studi clinici multinazionali in popolazioni dell'Africa Sub-Sahariana per validare la raccomandazione proposta da questo studio.

BIOMARKER FARMACOGENETICI E CLINICI PER CONCENTRAZIONI PLASMATICHE SUBTERAPEUTICHE DI EFAVIRENZ IN ADULTI THAI HIV-1 INFETTI

A cura della Dott.ssa Valentina Boscaro

E' stato condotto uno studio prospettico per identificare caratteristiche genetiche, cliniche e potenziali fattori biochimici associati a livelli subterapeutici di EFV in adulti Thai HIV-1 infetti, a cui è stato somministrato EFV (600mg) in associazione con tenofovir (300mg) e lamivudina (300mg).

Sono stati arruolati 100 pazienti Thai (25% femmine, età media 37,98 anni), naïve a tutti i trattamenti antiretrovirali, senza infezioni opportunistiche; tutti i pazienti assumevano il farmaco al momento di coricarsi e la concentrazione plasmatica è stata determinata, attraverso HPLC, a 12 settimane dall'inizio della terapia antiretrovirale. Sono stati esclusi pazienti che ricevevano altri trattamenti che avrebbero potuto influenzare la concentrazione dell'EFV e, per ridurre l'influenza dei polimorfismi di *CYP2B6*, sono stati analizzati solo i pazienti portatori dell'aplotipo *CYP2B6*1/*1*. I dati clinici raccolti sono stati: conta cellule CD4, HIV-1 RNA plasmatica, emoglobina, azoto ureico (BUN), creatinina, colesterolo, trigliceridi, HDL, LDL, bilirubina totale e diretta, fosfatasi alcalina (ALP), alanina e aspartato aminotransferasi (ALT e AST). L'analisi farmacogenetica ha riguardato i genotipi *CYP2A6* -48T>G (rs28399433), *CYP2B6* g.18492T>C (rs2279345), *CYP3A4*1B* c.-392A>G (rs2740574), *CYP3A4*18* c.878T>C (rs28371759) e *CYP3A5*3* c.6986A>G (rs776746).

Tutti i pazienti avevano un profilo lipidico e la funzionalità epatica e renale nella norma, mentre i livelli di trigliceridi, HDL, ALP e AST erano leggermente superiori ai valori di riferimento.

La concentrazione plasmatica media è stata 2260ng/ml, con un'alta variabilità interindividuale (580-23350ng/ml). Per quanto riguarda il polimorfismo g.18492T>C di *CYP2B6*, la concentrazione media di EFV è stata di 3210ng/ml per il genotipo T/T, 1900ng/ml per il T/C e 1200ng/ml per il C/C; la concentrazione del farmaco è leggermente più alta, ma non in modo statisticamente significativo, nei soggetti eterozigoti per *CYP2A6* -48T>G (2.510ng/ml) e omozigoti G/G (2.830ng/ml) rispetto a quelli *wild type* (T/T 2110ng/ml). Nell'analisi univariata, il peso corporeo (p=0,026), l'altezza (p=0,003), la carica virale (p=0,028), *CYP2B6* g.18492T>C (p<0,001), BUN (p=0,011) e AST (p=0,001) sono significativamente associati alla concentrazione plasmatica di EFV, mentre non ci sono correlazioni significative con *CYP2A6* -48T>G, *CYP3A4*1B* c.-392A>G, *CYP3A4*18* c.878T>C e *CYP3A5*3* c.6986A>G e altri fattori clinici. Nell'analisi multivariata, la correlazione rimane significativa solo con *CYP2B6* g.18492T>C (p=0,001), BUN (p=0,016) e AST (p=0,006).

In conclusione, dallo studio emerge una chiara associazione tra variazioni genetiche dell'ospite e fattori clinici che possono influenzare la farmacocinetica dell'EFV in pazienti Thai HIV-1 infetti, ed in particolare la concentrazione plasmatica del farmaco è influenzata dai polimorfismi di *CYP2B6*, BUN e AST.

Gli autori ipotizzano che l'alta frequenza di farmacoresistenza nei pazienti Thai possa essere correlata all'esposizione ripetuta dei pazienti a concentrazioni subterapeutiche dell'EFV, verso il quale una singola mutazione del gene che codifica per la transcriptasi inversa (es. K103N) determina resistenza. Gli autori sottolineano quindi la necessità di approfondire la relazione tra polimorfismi genetici dell'ospite e la farmacocinetica dell'EFV e l'acquisizione di mutazioni che conferiscono resistenza al farmaco, al fine di meglio comprendere l'associazione tra la concentrazione del farmaco e il fallimento terapeutico.

Parole chiave: HIV/AIDS, efavirenz, *CYP2B6*

Riferimenti bibliografici

[Mukonzo JK](#) et al. *PLoS ONE* 2014, 9 (1): e86919

[Sukasem C](#) et al. *Drug Metab Pharmacokinet* 2014 Jan 28 [Epub ahead of print]

LA METANALISI DEL MESE

MUTAZIONE V600E DI BRAF: EFFETTO SULLA RISPOSTA TUMORALE ALLA TERAPIA ANTI-MONOCLONALE CON ANTI-EGFR NEL TRATTAMENTO DI PRIMA LINEA DEL CANCRO DEL COLON-RETTO METASTATICO

A cura del Dott. Vittorio Simeon

Nell'ultima decade l'esito del trattamento dei pazienti con cancro del colon-retto metastatico (mCRC) è stato migliorato grazie all'utilizzo degli agenti chemioterapici. Il cetuximab e il panitumumab, due anticorpi monoclonali (MoAbs) anti recettore del fattore di crescita dell'epidermide (EGFR) approvati per il trattamento in prima linea e nei tumori refrattari del mCRC, hanno ulteriormente migliorato la sopravvivenza generale (OS) ed il tempo libero da progressione (PFS) di questi pazienti. L'aggiunta di un anticorpo monoclonale anti-EGFR alla prima linea di chemioterapia ha prodotto un beneficio notevole in termini di percentuali di risposta ed è noto che questo beneficio è ristretto ai pazienti *wild-type* per la mutazione in KRAS. Sono molto comuni, tuttavia, casi di resistenza al cetuximab e al panitumumab anche in questo gruppo di pazienti. In numerosi studi clinici è stato inoltre dimostrato che i pazienti portatori di una mutazione a carico del gene BRAF (mutazione V600E) hanno una prognosi peggiore rispetto ai pazienti *wild-type* per questo gene. Analisi retrospettive suggeriscono come la perdita di attività anti-tumorale del cetuximab nelle ultime linee di trattamento del mCRC sia ascrivibile alla mutazione V600E di BRAF.

Qual è quindi il beneficio dell'utilizzo del cetuximab in aggiunta alla chemioterapia nel trattamento di prima linea dei pazienti con mCRC e portatori della mutazione V600E?

Nella presente meta-analisi è stata analizzata e valutata la risposta tumorale nei pazienti portatori della mutazione V600E di BRAF rispetto ai pazienti *wild-type* in trattamento di prima linea con cetuximab e chemioterapia.

Gli articoli utilizzati per la meta-analisi sono stati selezionati in MEDLINE ed EMBASE utilizzando le seguenti parole chiave: cancro del colon-retto, mutazione di BRAF, cetuximab, panitumumab e anticorpo monoclonale. Sono stati utilizzati i seguenti criteri d'inclusione: pazienti con mutazione BRAF e *wild-type* in terapia in prima linea con cetuximab più chemioterapia o solo chemioterapia, e valutabili per la percentuale/tasso di risposta del trattamento (*objective response rate* – ORR). Basandosi su questi criteri gli Autori hanno selezionato 9 articoli. Dopo successiva fase di selezione ne sono stati eliminati 5 per mancanza di informazioni sull'efficacia o scarsa omogeneità del trattamento (in alcuni di questi studi i pazienti erano sottoposti anche a terapia con bevacizumab o con altre combinazioni chemioterapia-anticorpo monoclonale). I seguenti studi clinici sono stati inclusi nella meta-analisi: studio CRYSTAL (van Cutsem et al. *J Clin Oncol* 2011, 29(15): 2011-9), studio OPUS (Bokemeyer et al. *Ann Oncol* 2011, 22(7): 1535-46), studio NORDIC VII (Tveit et al. *J Clin Oncol* 2012, 30(15): 1755-62) e studio AIO KRK 0104 (Modest et al. *Int J Cancer* 2012, 131(4): 980-6).

Il software RevMan 5.1 della Cochrane Collaboration è stato utilizzato per le analisi statistiche. L'associazione tra lo stato mutazionale di BRAF e l'esito della terapia anti-EGFR è stata misurata calcolando il rischio relativo (risk ratio –RR), con intervallo di confidenza al 95%, dell'ORR. L'ORR è stato calcolato sommando la quota delle risposte complete e di quelle parziali. Il risk ratio totale degli studi è stato calcolato con un modello ad effetti fissi o random, seguendo il risultato del test di eterogeneità degli studi.

Gli studi presi in considerazione hanno permesso di eseguire un'analisi sull'effetto della mutazione di BRAF sia in pazienti trattati in prima linea con la sola chemioterapia che con l'aggiunta del cetuximab. L'analisi mutazionale di BRAF era richiesta prospetticamente da protocollo o retrospettivamente per effettuare analisi di sottogruppi. Inoltre è stato possibile portare a termine un'analisi stratificata anche per i pazienti *wild-type* o con mutazione non nota per il gene KRAS.

Inizialmente gli Autori hanno analizzato il ruolo della mutazione BRAF scorporando i dati in due gruppi principali con pazienti trattati con la sola chemioterapia e pazienti trattati con chemioterapia e cetuximab. I portatori della mutazione V600E di BRAF avevano una percentuale di risposta peggiore rispetto ai non portatori della mutazione. Questo avveniva nei pazienti *wild-type* per il gene KRAS sia in trattamento con cetuximab e chemioterapia in prima linea che con la sola chemioterapia (rispettivamente RR= 0.34, [95% CI 0.15 – 0.74] e RR = 0.38, [95% CI 0.20 – 0.73]; l'RR era riferito ai *wild-type* di BRAF verso i mutati per V600E). Invece nei pazienti con mutazione KRAS non nota i portatori della mutazione di BRAF avevano una percentuale di risposta simile sia in seguito al trattamento con chemioterapia che con aggiunta del cetuximab in prima linea (rispettivamente RR= 0.45, [95% CI 0.18 – 1.09] e RR = 0.57, [95% CI 0.15 – 2.23]. La mutazione di BRAF non era in questo caso associata ad una diminuzione significativa della risposta tumorale. Alla luce di questi risultati gli Autori concludono che lo stato mutazionale di BRAF non può essere considerato un buon fattore prognostico nella prima linea di trattamento in pazienti con mCRC.

L'analisi è stata successivamente approfondita stratificando la popolazione per la mutazione di BRAF e analizzando il ruolo e quindi il possibile vantaggio per i pazienti di ricevere la combinazione chemioterapia e anti-EGFR rispetto alla sola chemioterapia. Nei portatori della mutazione di BRAF, l'aggiunta dell'anti-EGFR alla prima linea di chemioterapia non mostrava differenze statisticamente significative rispetto al gruppo trattato con la sola chemioterapia sia quando i pazienti erano *wild-type* per KRAS o quando lo stato mutazionale non era noto (rispettivamente RR= 1.61, [95% CI 0.57 – 4.47] e RR = 0.71, [95% CI 0.18 – 2.77]; l'RR era riferito ai pazienti trattati con chemioterapia verso il trattamento chemioterapia e cetuximab). Nei pazienti *wild-type* per la mutazione di BRAF, l'aggiunta dell'anti-EGFR alla prima linea di terapia produceva un chiaro beneficio in termini di percentuale di risposta. Questo vantaggio era però ristretto ai pazienti *wild-type* anche per KRAS (RR= 1.48, [95% CI 1.28 – 1.71]). Sulla base di questi risultati gli Autori concludono che lo stato mutazionale di BRAF non può essere considerato un buon biomarcatore predittivo per la somministrazione del cetuximab in aggiunta alla chemioterapia in prima linea.

Questa meta-analisi, nonostante si basi su studi clinici randomizzati e ben condotti, presenta dei limiti da dover prendere in considerazione. Prima di tutto, il numero degli studi analizzati è basso. In questa meta-analisi sono stati inclusi 126 pazienti portatori della mutazione a carico di BRAF, e di questi solo 69 pazienti sono stati trattati con la combinazione chemioterapia più cetuximab in prima linea. In secondo luogo, non erano disponibili tutti i dati dei pazienti e di conseguenza i risultati si basano su stime non aggiustate. Non è stato inoltre possibile eseguire un'analisi precisa degli altri fattori prognostici quali età, stadio e sesso. Infine, soltanto due studi presentavano i dati sull'hazard ratio di PFS e OS e per questo motivo non è stato possibile analizzare l'effetto della mutazione di BRAF sulla sopravvivenza dei pazienti con mCRC trattati con cetuximab. Data la bassa numerosità del campione analizzato, confermata anche dall'analisi di potenza dello studio con valori ben al di sotto dell'80%, risulta chiaro come siano necessari ulteriori studi ed approfondimenti, con analisi effettuate su un numero maggiore di pazienti, per giungere a delle conclusioni affidabili.

Lo stato mutazionale di BRAF V600E non può essere considerato un buon fattore prognostico ed è un debole biomarcatore predittivo per il trattamento con cetuximab in aggiunta alla chemioterapia in prima linea in pazienti con cancro del colon-retto metastatico. Tuttavia, lo scarso numero di studi inclusi non permette di considerare i risultati di questa meta-analisi come conclusivi.

Parole chiave: BRAF, KRAS, anti-EGFR, cancro colon-retto metastatico

Riferimento bibliografico

[Cui D](#) et al. *Mol Biol Rep* 2014, 41(3): 1291-8

**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.informazione@sigr.it; sif.farmacologia@sigr.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)
Vice-Direttore	Prof. Diego Fornasari (Università di Milano)
Coordinatore	Dott.ssa Valentina Boscaro (Università di Torino)
Caporedattori	Dott. Gabriele Stocco (Università di Trieste) Dott. Salvatore Terrazzino (Università del Piemonte Orientale)
Web Editor	Dott. Federico Casale (Università di Torino)
Hanno contribuito a questo numero:	Dott.ssa Sarah Cargin (Università del Piemonte Orientale) Dott.ssa Donatella Carretta (Università di Bologna) Dott.ssa Stefania Cheli (Azienda Ospedaliera Polo Universitario "L. Sacco" di Milano) Dott.ssa Valeria Conti (Università di Salerno) Dott.ssa Eva Cuzzoni (Università di Trieste) Dott.ssa Sara De Iudicibus (Università di Trieste) Dott.ssa Eva Dreussi (CRO Aviano) Dott.ssa Luciana Giodini (CRO Aviano) Dott.ssa Lucia Gozzo (Università di Catania) Dott.ssa Gloria Ravegnini (Università di Bologna) Dott. Vittorio Simeon (IRCCS – CROB) Dott.ssa Eleonora Turrini (Università di Bologna)

Archivio SIF-Farmacogenetica Edicola Virtuale SIF

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

Contatti: webmaster@sifweb.org

DISCLAIMER – Leggere attentamente

SIF, Società Italiana di Farmacologia, si propone di pubblicare sul proprio sito internet www.sifweb.org informazioni precise ed aggiornate, ma non si assume alcuna responsabilità né garantisce la completezza ed esaustività delle informazioni messe a disposizione. In particolare, SIF precisa che le risposte fornite ai quesiti medico / tossicologici sono fornite sulla base della raccolta di fonti bibliografiche esistenti (rispetto alle quali non si garantisce la esaustività). Pertanto, dalle risposte ai quesiti non devono essere tratte conclusioni se non un mero richiamo alle fonti presenti in letteratura. La SIF, inoltre, avvisa gli utenti che le informazioni contenute nel proprio sito e le risposte ai quesiti hanno finalità meramente divulgative, informative ed educative e non possono in alcun modo sostituire la necessità di consultare il Ministero della Salute, l'Istituto Superiore di Sanità e più in generale le Istituzioni nazionali ed internazionali attive in materia. IL SITO INTERNET DI SIF E LE RISPOSTE AI QUESITI NON DEVONO IN ALCUN MODO ESSERE CONSIDERATI PARERI MEDICI. SIF, quindi, declina ogni responsabilità circa l'utilizzo del proprio sito, delle informazioni in esso contenute e delle risposte ai quesiti ed avverte l'utente che ogni e qualsiasi contenuto ed informazione del sito (comprese le risposte ai quesiti) sarà utilizzata sotto diretta e totale responsabilità dell'utente stesso. Né SIF, né alcuna altra parte implicata nella creazione, realizzazione e pubblicazione del sito internet di SIF e nelle redazioni delle risposte ai quesiti possono essere ritenute responsabili in alcun modo, né per alcun danno diretto, incidentale, conseguente o indiretto che deriva dall'accesso, uso o mancato uso di questo sito o di ogni altro ad esso collegato, o di qualunque errore od omissione nel loro contenuto. Le informazioni fornite nelle newsletters, le eventuali nozioni su procedure mediche, posologie, descrizioni di farmaci o prodotti d'uso sono da intendersi come di natura generale ed a scopo puramente divulgativo ed illustrativo. Non possono, pertanto, sostituire in nessun modo il consiglio del medico o di altri operatori sanitari. Nulla su <http://www.sifweb.org>, sulle relative newsletters, e-mails, o qualsiasi dei progetti della SIF, può essere interpretato come un tentativo di offrire o rendere un'opinione medica o in altro modo coinvolta nella pratica della Medicina. La Società Italiana di Farmacologia, i suoi Soci od altre parti ed essa connesse non possono, quindi, essere ritenuti responsabili circa risultati o conseguenze di qualunque utilizzo o tentato utilizzo di una qualsiasi delle informazioni riportate. Non sono ammesse la divulgazione e la diffusione di "SIF-Farmacogenetica" senza precedente autorizzazione scritta della Società Italiana di Farmacologia.

RICEZIONE NEWSLETTER

Nella consapevolezza che le e-mail indesiderate sono oggetto di disturbo, vi informiamo che il vostro indirizzo viene conservato e trattato nel rispetto del DL 196/03 ed in qualsiasi momento potrà esserne richiesta la modifica o cancellazione come previsto dall'articolo 13. Tutti i destinatari della e-mail sono in copia nascosta (Privacy L. 75/96). Qualora non intendeste ricevere ulteriori comunicazioni vi preghiamo di inviare una risposta all'indirizzo sif.farmacologia@segr.it con oggetto: CANCELLA.
