



---

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

---

## Sommario

### ⇒ Oncologia

- Associazione tra il polimorfismo 894 G>T del gene ossido nitrico sintasi 3 (NOS3) con l'*outcome* di pazienti Cinesi con leucemia mieloide acuta
- Identificazione di nuove varianti di sequenza dei microRNA nella leucemia linfatica cronica
- Impatto dei polimorfismi di CYP1A1, GSTM1 e GSTT1 nella sopravvivenza globale e specifica nel cancro alla prostata
- Farmacogenetica della terapia combinata di pemetrexed nel cancro al polmone: dall'analisi del *pathway* del farmaco emergono nuove associazioni di tossicità

### ⇒ Neurologia

- Varianti del gene metilene-tetraidrofolato reduttasi (*MTHFR*) e disturbi metabolici e di aumento ponderale indotti dagli antipsicotici
- Associazione tra varianti del gene GADL1 e la risposta alla terapia con litio in pazienti affetti da disturbo bipolare di tipo I

### ⇒ Immunomodulazione

- Identificazione di una nuova variante allelica della tiopurinaS-metiltransferasi (TPMT\*37)
- Associazione di FCGR2A con la risposta al trattamento con infliximab in pazienti affetti da artrite reumatoide
- Nuovi biomarcatori genetici per prevedere le concentrazioni di azatioprina nel sangue nelle terapie in combinazione con acido 5-aminosalicilico

### ⇒ La metanalisi del mese

- Associazione tra i polimorfismi della metilene-tetraidrofolato reduttasi e il rischio di recidiva nella leucemia linfoblastica acuta: studio di meta-analisi

---

## ONCOLOGIA

### **ASSOCIAZIONE TRA IL POLIMORFISMO 894 G>T DEL GENE OSSIDO NITRICO SINTASI 3 (NOS3) CON L'OUTCOME DI PAZIENTI CINESI CON LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA**

A cura della Dott.ssa Lucia Gozzo

La leucemia mieloide acuta (LMA) è una patologia eterogenea con prognosi globalmente sfavorevole, con tasso di sopravvivenza a 5 anni del 21-44%. Il fattore prognostico più importante è rappresentato dal cariotipo delle cellule leucemiche, in base al quale si distinguono 3 gruppi di pazienti, a prognosi favorevole,

intermedia e negativa. La maggior parte dei pazienti presenta una prognosi intermedia ed un cariotipo normale. Oltre al cariotipo, sono stati individuati altri *marker* di *outcome* in pazienti con LMA, tra cui le variazioni nel gene *NPM1* (nucleofosmina), nel gene *FLT3* (*fms-related tyrosine kinase 3*), l'età, la conta di globuli rossi, i livelli di LDH, l'*Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG). Comunque, rimane alto il numero di pazienti a rischio intermedio privi di fattori prognostici validi. Recentemente è cresciuto l'interesse sull'applicabilità della farmacogenetica per la stratificazione dei pazienti con LMA. Le antracicline sono farmaci altamente efficaci per diverse patologie ematologiche dell'adulto, quali la LMA, la leucemia linfoblastica acuta, il mieloma multiplo, il linfoma di Hodgkin e non Hodgkin. Questi farmaci esercitano il loro effetto citotossico attraverso la via mitocondriale intrinseca dell'apoptosi, mediata dalla produzione di specie reattive dell'ossigeno (*reactive oxygen species*, ROS) e dal concomitante stress ossidativo. Pertanto, diverse varianti genetiche che contribuiscano a generare o proteggere dai ROS potrebbero giocare un ruolo importante nel trattamento di patologie tumorali. Tra questi il gene della ossido nitrico sintasi 3 endoteliale (*NOS3*) rappresenta un possibile candidato per il potenziale ruolo nella detossificazione dei chinoni e nello stress ossidativo. Inoltre, la *NOS3* genera NO convertendo la L-arginina in citrullina nell'endotelio e alti livelli di NO inducono apoptosi sia in linee cellulari di leucemia mieloide acuta sia di leucemia linfoide. Sono stati identificati diversi SNP del gene *NOS3*, alcuni dei quali associati ad un'alterata attività enzimatica. Il polimorfismo 894 G>T nell'esone 7 del gene *NOS3* è stato associato ad un'alterata suscettibilità al clivaggio, con riduzione della produzione di NO. Uno studio precedente (Choi JY et al. *Clin Cancer Res* 2009, 15:5258-66) ha sottolineato l'importanza del polimorfismo 894 G>T sull'efficacia terapeutica nel carcinoma della mammella, mentre nessuno studio ha valutato questo SNP nei pazienti con LMA a rischio intermedio.

In questo studio è stato valutato l'impatto del polimorfismo 894 G>T del gene *NOS3* su *overall survival* (OS), *relapse-free survival* (RFS) e ricaduta in pazienti Cinesi Han con LMA de novo a rischio intermedio. È stata inoltre valutata l'espressione dell'mRNA del gene *NOS3* in 72 pazienti con genotipo 894 G>T noto.

Sono stati arruolati 225 pazienti Cinesi Han con LMA de novo a rischio intermedio di età media di 43 anni. Criteri di esclusione erano la presenza di leucemia secondaria, leucemia promielocitica acuta, non in prima risposta completa o seconda e con più di 3 cicli di terapia di induzione, anomalie alla spirometria, valori di bilirubina sierica o transaminasi più di due volte i limiti normali, frazione di eiezione <30%, *clearance* della creatinina <50 ml/min e trapianto di cellule staminali emopoietiche.

I pazienti sono stati seguiti in media per 11 mesi (2-48 mesi). L'analisi univariata ha mostrato che i pazienti con genotipo GG presentavano una OS più lunga (23 mesi, 95% CI: 20.2-26,4 mesi) rispetto ai portatori dei genotipi GT+TT (15,5 mesi, 95% CI: 10,3-20,6 mesi) (P=0,006). Tuttavia non è stata riscontrata un'associazione con la RFS (P=0,168). Dopo un aggiustamento per età, sesso, conta dei leucociti, livello di emoglobina, *French, American, and Britain classification* (FAB), livelli di LDH, *NPM1/FLT3*, ed ECOG-performance status (PS), l'analisi multivariata ha mostrato un impatto significativo del polimorfismo sulla OS, con hazard ratio (HR) dei pazienti con genotipo GG superiore a quello dei pazienti con genotipo GT+TT (HR=1,856, P=0,014). Inoltre, i pazienti con conta di leucociti alla diagnosi  $\leq 31 \times 10^9/L$  presentavano una OS più lunga rispetto ai pazienti con conta  $> 31 \times 10^9/L$  (HR=0,481, P=0,001).

Il 26% dei pazienti con LMA in ricaduta erano portatori del genotipo GT o TT ed il 73% erano portatori del genotipo GG. Comunque, il 15% dei pazienti con ricaduta erano portatori del genotipo GT o TT e l'84% del genotipo GG. Le frequenze genotipiche dei polimorfismi erano statisticamente significative tra i pazienti con o senza ricaduta (P=0,049). L'analisi multivariata ha mostrato che il polimorfismo 894 G>T del *NOS3* non rappresentava un fattore prognostico indipendente di ricaduta (P=0,086), al contrario della conta dei leucociti che è risultato un fattore prognostico indipendente (una conta  $> 31 \times 10^9/L$  alla diagnosi associata ad alto rischio di ricaduta, odds ratio [OR] =2.227, P=0.020). Similmente, l'*NPM1/FLT3* è risultato un fattore indipendente di ricaduta. I pazienti con il genotipo GT+TT presentavano un'espressione significativamente inferiore della *NOS3* rispetto ai pazienti con genotipo G (P=0,033).

In questo studio, il genotipo GG del polimorfismo 894 G>T del gene *NOS3* in pazienti cinesi Han con LMA a rischio intermedio è stato associato ad una OS significativamente più lunga rispetto ai portatori di altri genotipi. All'analisi multivariata il polimorfismo in studio si è dimostrato un fattore prognostico indipendente, senza associazione con RFD e ricaduta nei pazienti con LMA. I pazienti con genotipo GT+TT presentavano una ridotta espressione del gene, ed i polimorfismi del gene *NOS3* sono risultati potenziali *marker* prognostici di OS per i pazienti con LMA a rischio intermedio. La produzione di ROS contribuisce

all'effetto antitumorale delle antracicline nei pazienti con LMA, portando a perossidazione lipidica e danno alle membrane, danno al DNA, stress ossidativo e stimolo della via dell'apoptosi nelle cellule leucemiche. L'enzima NOS3 può modulare la produzione di ROS. Sono stati identificati diversi SNP nel gene *NOS3*, e il polimorfismo 894 G>T nell'esone 7 che risulta in un'alterata suscettibilità al clivaggio porta ad una ridotta attività enzimatica e ad un'alterata sintesi dell'enzima. Un'altra possibile spiegazione potrebbe essere l'alterata produzione di NO, che interagisce con radicali indotti dalla chemioterapia formando perossinitriti, con danno a lipidi, DNA e proteine attraverso reazioni ossidative dirette o indirette mediate da radicali. Questi dati, insieme a quelli di altri studi precedenti, suggeriscono che i pazienti con LMA e portatori degli alleli maggiori, quindi con espressione e attività normale della NOS3, possano beneficiare del trattamento con antracicline più dei pazienti con genotipo legato a ridotta espressione enzimatica, che potrebbe portare a resistenza alla chemioterapia e fallimento in pazienti con LMA portatori dell'allele T. Non è stata riscontrata associazione tra il polimorfismo in studio e la RFS e l'incidenza di ricadute. La ragione non è chiara, ma potrebbe essere legata al piccolo numero di pazienti in studio.

In conclusione, questo studio suggerisce che il polimorfismo 894 G>T del gene *NOS3* influenza la OS dei pazienti con LMA a rischio intermedio, potendo contribuire a definire strategie di trattamento migliori e individualizzare la chemioterapia.

**Parole chiave:** LMA, antracicline, *NOS3*

#### Riferimento bibliografico

[He H](#) et al. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2014 Mar 28 [Epub ahead of print].

## IDENTIFICAZIONE DI NUOVE VARIANTI DI SEQUENZA DEI MICRORNA NELLA LEUCEMIA LINFATICA CRONICA

A cura della Dott.ssa Valeria Conti

I microRNA (miRNA) sono piccoli RNA non codificanti in grado di regolare negativamente l'espressione di geni target a livello post-trascrizionale, e svolgono un ruolo centrale nel controllo di numerosi processi fisiologici quali sviluppo, differenziamento cellulare ed apoptosi. L'espressione alterata dei miRNA è comunemente riscontrata sia nei tumori solidi che nelle malattie neoplastiche ematologiche ma le cause che determinano tale alterazione non sono state ancora chiarite. Al riguardo, sono stati proposti almeno tre possibili meccanismi: 1) aberrazioni genomiche che coinvolgerebbero i geni per i miRNA nelle regioni associate al tumore; 2) meccanismi regolatori di tipo epigenetico e 3) la presenza di varianti genetiche a singolo nucleotide (SNPs). I miR-15a e miR-16-1 nella regione 13q14, frequentemente deleta nella leucemia linfatica cronica (*Chronic Lymphocytic leukemia, CLL*), sono stati i primi a essere associati a tale forma leucemica. Questa scoperta ha portato a ipotizzare che essi possano agire come soppressori tumorali nella CLL. Infatti, nei pazienti con CLL sono state descritte diverse mutazioni e SNPs nei geni per i miRNA, che potrebbero influenzare la loro struttura secondaria e la loro espressione. Tuttavia, a oggi, non ci sono dati conclusivi sulla frequenza e l'impatto clinico di tali varianti.

In questo studio, mediante la tecnica *custom resequencing microarray*, sono stati analizzati 105 campioni di DNA isolati da 98 pazienti ad alto rischio affetti da CLL (7 pazienti sono stati analizzati ripetutamente). Il sequenziamento di Sanger è stato eseguito per lo screening dei miR-16-1 e miR-29b-2/29c in altre coorti, rispettivamente costituite da 193 e 213 pazienti. I campioni di sangue sono stati prelevati presso il Dipartimento di Medicina Interna, Ematologia e Oncologia dell'Azienda universitaria Ospedaliera di Brno nella repubblica ceca. Sia dai linfociti B sia dalle cellule mononucleate il DNA è stato isolato utilizzando il kit *DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)*. I linfociti B sono stati isolati da sangue periferico mediante *Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare)*; le cellule mononucleate con *l'Histopaque (Sigma-Aldrich)* e la percentuale di cellule leucemiche (CD5+/CD19+) è stata determinata tramite citofluorimetria. L'RNA totale è stato isolato sia dai linfociti B che dalle cellule mononucleate dai campioni di sangue prelevati da 107 pazienti mediante *TriReagent (Molecular Research Center, Inc.)* e la qualità dell'RNA è stata controllata attraverso la metodica *chip electrophoresis (Bioanalyzer RNA 6000 Nano Assay; Agilent)*. Infine, la presenza di variazioni di sequenza rilevata con il microarray è stata confermata mediante il sequenziamento diretto. L'effetto delle

varianti identificate nei miR-29c e miR-29b-2 sulla loro espressione è stata valutata utilizzando la real-time PCR e i livelli di espressione sono stati normalizzati utilizzando il gene RNU38B che è uniformemente espresso nelle cellule CLL.

Per studiare gli effetti della nuova variante 83G>C nel pre-miR-16-1 sul suo profilo di espressione, un frammento di 760 bp di DNA genomico codificante sia per miR-15a che per miR-16-1 è stato clonato nel vettore di espressione *pCMV-MIR (Origene)*. Due costrutti, uno contenente la sequenza *wild type* e l'altro la nuova variante nel pre-miR-16-1 sono stati sequenziati e un vettore vuoto è stato utilizzato come controllo negativo. La proteina fluorescente verde (GFP) inclusa nel vettore di espressione è stata usata per standardizzare l'efficienza di trasfezione. I costrutti sono stati transfettati nella linea cellulare HEK-293, che esprime il cluster miR-15a/16-1 a livelli endogeni relativamente bassi. Le cellule positive per la fluorescenza verde sono state contate 48 h dopo la trasfezione con una purezza del 90–95% e i livelli di espressione dei costrutti sono stati misurati tramite real-time PCR.

In questo studio, come in lavori pubblicati in precedenza, è stato dimostrato che l'espressione dei miRNA può essere influenzata da mutazioni e SNPs nei geni codificanti sia per i miRNA maturi sia immaturi (pri- e pre-miRNA). Tuttavia, la frequenza e l'impatto di queste varianti nella CLL non sono stati definiti. Gli autori hanno analizzato varianti di sequenza in numero maggiore rispetto al passato e in una coorte più ampia di pazienti con CLL. Complessivamente, sono state descritte 6 varianti e 27 SNPs in 17 miRNA e molti di questi, in accordo con altri studi, erano presenti in loci esterni alle regioni codificanti per i piccoli RNA maturi.

Le frequenze alleliche delle varianti identificate sono state comparate con quelle riportate nel progetto 1000 genomi (<http://www.1000genomes.org>) e da tale analisi è emerso che solo la frequenza dell' SNP nel pre-miR-323b era più alta nei pazienti considerati in questo studio se comparata ai dati di frequenza relativi ad altri pazienti con CLL e a una popolazione europea rappresentata da 379 individui provenienti dal database del progetto 1000 genomi. Quando però è stata presa in considerazione una popolazione di controllo più ampia (1092 soggetti), sempre descritta nel progetto 1000 genomi, le frequenze alleliche differivano per altri 8 SNPs. Questi SNPs includevano l' rs2910164 nel miR-146a che era già stato riconosciuto alterare il processamento, abbassare l'espressione del miRNA maturo e predisporre a vari tipi di cancro.

Quasi tutte le varianti identificate in questo studio erano localizzate in miRNA associati alla patogenesi e alla prognosi della CLL, come miR-16-1, miR-29a e miR-29b-2 o coinvolte nella biologia di altri tumori, ad esempio miR-142, miR-106b e miR-372.

Un dato molto interessante è che la variante nel miR-142 è la prima rilevata in un miRNA maturo nella CLL dato che quelle descritte in precedenza da Calin e coll. (*N Engl J Med.* 2005, 353(17):1793-801) e Wojcik e coll. (*Carcinogenesis.* 2010, 31(2):208-15) erano state identificate nelle regioni deputate alla codifica di pri- e pre-miRNA. Inoltre, in questo studio è stato trovato un SNP nel miR-16-1 che modificava in grande misura la sua struttura secondaria e che rappresenta la seconda variante descritta in questa molecola.

In conclusione, questo studio ha confermato che sia SNPs che nuove mutazioni sono presenti nei geni per i miRNA nei pazienti con CLL. La nuova variante descritta nel miR-16-1 influenza il suo livello di espressione e, inoltre, le frequenze delle varianti di miR-16-1 erano molto rare nella CLL in contrasto con i dati pubblicati in precedenza. D'altra parte, un'inserzione identificata nel pri-miR-29b-2 è risultata avere una frequenza più elevata nei pazienti con CLL rispetto alla popolazione di controllo. Questa inserzione, associata a un'espressione più bassa di miR-29b nei pazienti con IGHV non mutato, potrebbe influenzare la biologia delle cellule B nella CLL. Questi risultati nel loro insieme suggeriscono che le varianti di sequenza nei miRNA potrebbero essere associate alla fisiopatologia della leucemia linfatica cronica.

**Parole chiave:** Leucemia linfatica cronica (CLL), inserzione, SNP, miRNA

#### Riferimento bibliografico

[Kminkova J](#) et al. *Carcinogenesis* 2014, 35(5):992-1002.

## IMPATTO DEI POLIMORFISMI DI CYP1A1, GSTM1 E GSTT1 NELLA SOPRAVVIVENZA GLOBALE E SPECIFICA NEL CANCRO ALLA PROSTATA

A cura della Dott.ssa Gloria Ravegnini

Il cancro alla prostata (PCa) è una malattia complessa e multifattoriale caratterizzata da sensibilità ormonale, differenze etniche ed influenzata dalla dieta e da una predisposizione genetica; PCa è il secondo tipo di cancro diagnosticato con più alta frequenza, nonché sesta causa di morte nel mondo. L'evoluzione e la prognosi sono piuttosto eterogenee con un alto tasso di over-trattamento e costi di monitoraggio a causa di procedure non necessarie. Date le suddette premesse, diviene sempre più importante identificare nuovi *markers* allo scopo di predire meglio la progressione della malattia, il rischio di morte e determinare il trattamento più appropriato. In questo contesto sono stati proposti una varietà di polimorfismi come *biomarkers* di suscettibilità.

In questo studio sono stati valutati i ruoli dei genotipi dei geni CYP1A1, GSTM1 e GSTT1 singoli o in combinazioni come modulatori della sopravvivenza, in un gruppo di pazienti cileni affetti da PCa per un periodo di follow-up di circa 9 anni.

L'analisi ha coinvolto un totale di 260 soggetti affetti da cancro alla prostata, genotipizzati per CYP1A1\*2A, GSTT1, GSTM1; i genotipi per GSTT1 e GSTM1 sono stati definiti come "nulli o non-nulli". La sopravvivenza è stata misurata come tempo trascorso dalla data della diagnosi fino alla data di morte o del follow-up finale. La popolazione è stata stratificata in base ai genotipi prendendo come riferimento il genotipo CYP1A1 *wild-type*, GSTM1 nullo e GSTT1 non-nullo.

Il periodo di follow-up medio è stato di 8.82 anni (range 0.33-14.91) con 28 morti PCa specifiche e 38 dovute ad altre cause. Nei 9 anni, il tasso di *overall survival* (OS) è stato del 67.6% per il gruppo GSTT1 nullo vs 76.2% per il gruppo GSTT1 non-nullo, 82.3 per il gruppo GSTM1 nullo vs 67.6 per il gruppo GSTM1 non-nullo e 69% per il gruppo \*1A/\*2A, 63.9% per il gruppo \*2A/\*2A, e 83.7% per il gruppo \*1A/\*1A; il tasso di sopravvivenza specifica è stato di 36.6% per il gruppo GSTT1 nullo vs 62.3% per il gruppo GSTT1 non-nullo, 50 % per il gruppo GSTM1 nullo vs 58.7% per il gruppo GSTM1 non-nullo e 51.6% per il gruppo \*1A/\*2A, 61.5% per il gruppo \*2A/\*2A, e 56.3% per il gruppo \*1A/\*1A; le frequenze genotipiche per GSTM1 e CYP1A1 erano significativamente diverse tra gli specifici gruppi ma lo stesso non succedeva per GSTT1.

Per quanto riguarda le combinazioni dei genotipi, le analisi hanno rivelato differenze significative tra i pazienti con genotipo GSTM1 non-nullo in combinazione con il genotipo eterozigote per l'allele \*2A di CYP1A1; similmente, pazienti con genotipo GSTM1 nullo e \*2A/\*2A esibivano differenze significative nel tasso di sopravvivenza. Inoltre i pazienti portatori della combinazione dei 3 genotipi di rischio (GSTM1 non nullo + GSTT1 nullo + omozigosi o eterozigosi per allele \*2A) esibivano una differenza significativa se comparati con i pazienti *wild-type* per le tre varianti.

Prendendo in considerazione la sopravvivenza, le curve di Kaplan-Meier hanno mostrato che gli uomini con genotipo GSTT1 nullo avevano un rischio più elevato di morte PCa specifica (sopravvivenza cancro-specifica) ma non da cause generiche (OS); è stato inoltre osservato che il genotipo GSTM1 non-nullo era un buon fattore prognostico per la mortalità provocata da cause generiche (*overall mortality*, OM) ma non per quella PCa specifica (*specific mortality*, SM). I risultati hanno rivelato una più alta frequenza del genotipo GSTM1 non-nullo nei pazienti in vita e le curve di Kaplan-Meier hanno confermato che tale variante era associata con una migliore prognosi.

Successivamente è stata valutata l'associazione tra i polimorfismi selezionati e la mortalità, in un modello multivariato aggiustato per età e fumo; da ciò è emerso che il genotipo GSTT1 non-nullo non era associato ne con OM ne con SM. I genotipi \*1A/\*2A e \*2A/\*2A per CYP1A1 e GSTM1 non-nullo erano significativamente associati con OM (P=0.002, P<0.001, P<0.001, rispettivamente). Per quanto riguarda le combinazioni dei genotipi, OM era correlata con GSTM1 non-nullo + CYP1A1 \*1A/\*2A (P<0.001), GSTT1 non-nullo + CYP1A1 \*1A/\*2A (P<0.001), GSTT1 nullo + CYP1A1 \*2A/\*2A (P<0.001), GSTM1 non-nullo + GSTT1 nullo (P=0.024) e infine con GSTM1 non-nullo + GSTT1 non-nullo + CYP1A1 \*1A/\*2A (P<0.001). Solo GSTT1 nullo+ CYP1A1 \*1A/\*1A era invece associata con la mortalità specifica.

Infine è stato analizzato il rischio di morte in un modello multivariato aggiustato per PSA, Gleason score e stadio tumorale; i pazienti sono stati raggruppati in "alto rischio" (PSA>20ng/ml, Gleason score ≥7, T stage >1) e "basso rischio" (PSA≤20ng/ml, Gleason score < 7, T stage=1). Utilizzando questo modello, è stato



quindi osservato che i genotipi CYP1A1\*2A erano significativamente associati con OM da solo o in combinazione con i principali genotipi della glutatione S-transferasi (GST). Inoltre il genotipo GSTM1 non-nullo in combinazione con GSTT1 era associato con la mortalità generica. Similmente le triple combinazioni GSTM1 non-nullo + GSTT1 non-nullo + CYP1A1\*1A/\*2A e GSTM1 nullo + GSTT1 nullo + CYP1A1\*2A/\*2A erano associate con OM. Dalle curve di Kaplan-Meier è emerso che la combinazione GSTM1 non-nullo + CYP1A1\*1A/\*2A o \*2A/\*2A era significativamente associata con la mortalità; analogamente GSTT1 nullo o GSTM1 non-nullo + \*2A/\*2A erano significativamente associati con OM.

I risultati raccolti in questo studio hanno mostrato come i pazienti con genotipi GSTT1 nullo, GSTM1 non-nullo, \*1A/\*2A o \*2A/\*2A muoiono prima di quelli portatori di altri genotipi. Tuttavia questi, sembrano essere in contrasto con studi precedenti su altre tipologie di cancro (Lallas TA et al. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000, 9(6):587-90; Weiss JR et al. *Leukemia* 2006, 20(12):2169-71).

In termini generali è stato dimostrato che GSTT1 nullo, GSTM1 non-nullo, CYP1A1\*2A erano associati con prognosi sfavorevole. L'analisi tuttavia, soffre di alcune limitazioni tra cui il limitato numero di pazienti e l'eterogeneità etnica e gli autori stessi sottolineano l'importanza di una validazione esterna su una popolazione indipendente.

In conclusione, in questo studio viene supportata l'idea che i genotipi di CYP1A1, GSTM1 e GSTT1 influenzano la mortalità PCa specifica e generica. In particolare è stato dimostrato che i genotipi GSTT1 nullo, GSTM1 non-nullo e CYP1A1\*2A sono associati consistentemente con la mortalità facendo ipotizzare di conseguenza che tali varianti possano essere degli ottimi *markers* per la prognosi ed il tasso di sopravvivenza nel tumore alla prostata.

**Parole chiave:** tumore alla prostata, sopravvivenza cancro specifica, GSTT1, GSTM1, CYP1A1

#### Riferimento bibliografico

[Acevedo CA](#) et al. *Urol Oncol* 2014, 32(3):280-90.

## FARMACOGENETICA DELLA TERAPIA COMBINATA DI PEMETREXED NEL CANCRO AL POLMONE: DALL'ANALISI DEL *PATHWAY* DEL FARMACO EMERGONO NUOVE ASSOCIAZIONI DI TOSSICITÀ

A cura della Dott.ssa Sara Gagno e della Dott.ssa Rossana Roncato

Pemetrexed è un farmaco chemioterapico indicato per il trattamento del cancro al polmone non a piccole cellule (NSCLC) e del mesotelioma. Pemetrexed appartiene alla classe degli antimetaboliti analoghi dei folati e il suo meccanismo d'azione è riconducibile all'inibizione di tre enzimi chiave folato-dipendenti: timidilato sintetasi (TYMS), glicinamide ribonucleotide formiltransferasi (GARFT) e in ultimo diidrofollato reductasi (DHFR). Esplica la sua azione farmacologica perturbando il pool nucleotidico e prevenendo la formazione di DNA e RNA richiesti più di frequente dalle cellule tumorali. Ad oggi sono noti diversi meccanismi di *uptake* intracellulare del pemetrexed, ma recentemente è stata attribuita particolare importanza al trasportatore RFC1, codificato dal gene *SLC19A1*, la cui alterata espressione si traduce in una modificata citotossicità del farmaco. Altre vie di *uptake* cellulare di pemetrexed sono costituite rispettivamente dal trasportatore dei folati accoppiato ai protoni e, in modo più dubbio, dai recettori dei folati FR- $\alpha$  e  $\beta$ . Successivamente all'ingresso nel citoplasma, pemetrexed subisce una rapida poligluttammazione che ne prolunga la ritenzione a livello cellulare e ne incrementa l'affinità per i suoi target. Segue poi la rimozione di tali residui ad opera della gamma-glutamyl idrolasi (GGH) che facilita l'estrusione del farmaco da parte della cellula e, di conseguenza, ne riduce l'attività farmacologica. Polimorfismi nel gene codificante questo enzima, infatti, sono stati precedentemente associati a tossicità, risposta e sopravvivenza a seguito del trattamento.

La terapia con pemetrexed può essere complicata da tossicità ematologiche e gastrointestinali che ne forzano la riduzione di dosaggio o producono ritardi nel trattamento, compromettendone l'efficacia.

Considerando che ad oggi, ancora pochi studi di farmacogenetica si sono focalizzati sulla tollerabilità del trattamento, l'obiettivo di questo studio è stato l'analisi di polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) che avessero un possibile impatto sulla tollerabilità, risposta e sopravvivenza collegati al trattamento con Pemetrexed in una coorte mista di pazienti affetti da NSCLC e mesotelioma.

La risposta e la tossicità da pemetrexed possono essere ricondotti ad una complessa interazione tra i geni coinvolti nell'espressione dei suoi bersagli farmacologici e quelli coinvolti nel suo metabolismo. Per rispecchiare tale complessità, quindi, è stato utilizzato il chip Illumina Human Exome v1.1 per genotipizzare gli SNPs esonici contenuti in 11 geni coinvolti nel *pathway* di Pemetrexed (inclusi *SLC19A1*, *GGH* e *DHFR*) e il saggio TaqMan® per i polimorfismi di interesse non inclusi nel chip.

Lo studio, di tipo retrospettivo, si è basato su una coorte di 136 pazienti con la conferma citologica o istologica di mesotelioma maligno (n=42) o NSCLC avanzato allo stadio IIIB o superiore (n=94), afferenti a *Guy's and St Thomas' Hospital NHS Foundation Trust* di Londra. Tutti i pazienti hanno ricevuto almeno un ciclo di terapia con pemetrexed alla dose standard di 500 mg/m<sup>2</sup> in combinazione con cis- o carbo-platino. Le reazioni avverse avvenute durante i primi 4 cicli di terapia sono state classificate secondo i criteri *National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events* (CTCAE v4.0). I pazienti sono stati sottoposti a valutazione radiologica prima dell'inizio, a metà e dopo la fine dell'ultimo ciclo di trattamento.

La selezione dei geni candidati è stata basata sulle evidenze riportate in letteratura, ma ha incluso anche geni che potrebbero influenzare il trasporto e il metabolismo di pemetrexed.

Dei 136 pazienti iniziali, tutti sono stati analizzati per sopravvivenza, 132 sono risultati eleggibili per tossicità e 113 per risposta. L'associazione tra SNP e tossicità e risposta è avvenuta attraverso l'analisi di regressione logistica in PLINK v1.07. Le analisi di sopravvivenza globale (OS) e malattia sopravvivenza libera da progressione (PFS) sono state condotte con il modello *Cox's proportional hazards model* e con il software SPSS v21.

Durante i primi quattro cicli di terapia, il 44,7% dei pazienti ha sviluppato tossicità  $\geq$  grado 3, spendendo un totale di 169 giorni di ospedalizzazione in confronto ai 21 giorni spesi dai pazienti che hanno sviluppato una tossicità di grado  $\leq$  2. Il 33% dei pazienti ha richiesto una riduzione della dose e il 31% ha dovuto ritardare il trattamento. Dieci pazienti su 136 (7,4%) hanno dovuto sospendere il trattamento a causa di tossicità. Le tossicità più frequenti sono state quelle ematologica (25,8%) e gastrointestinale (11,4%).

**Tossicità:** L'analisi di regressione logistica ha rivelato che l'allele T di rs11545078 su *GGH* conferisce un effetto protettivo nei confronti di tossicità di grado 3 o 4 sia nei cicli 1-2 (P=0,027, OR=0,099) che nei cicli 3-4 (P=0,017, OR=0,25). Lo stesso effetto è stato osservato anche nei confronti della tossicità ematologica severa (grado  $\geq$  3) durante i quattro cicli di terapia, con ciascun allele T conferente un OR di 0,13, P=0,05. Anche il polimorfismo rs1650697 del promotore di *DHFR* risulta predittivo di tossicità severa: individui con genotipo CT o TT presentano un rischio maggiore di tossicità di grado 3 o 4 (P=0,027, OR=2,20).

**Efficacia:** pazienti portatori dell'allele T per lo SNP rs61734430 del gene *FOLR3* hanno una probabilità maggiore di progressione di malattia a metà del trattamento con un OR di 3,80 (95%CI 1,15-12,53, P=0,029).

**Sopravvivenza:** una OS più lunga (19,4 mesi) è stata osservata nei pazienti con il genotipo CC per lo SNP rs1801133 del gene *MTHFR* rispetto ai portatori dei genotipi CT e TT (13,8 mesi). La sopravvivenza è predetta anche da tre SNPs in *linkage disequilibrium* incompleto nel gene *SLC19A1*. Individui con il genotipo AA per rs3788189 hanno una OS più lunga (20,9 mesi) rispetto ai genotipi AC e CC (14,2 mesi). La presenza di una o più copie dell'allele C conferisce un HR di 1,71 di aumentato rischio di sopravvivenza più corta (P=0,026). Analogamente, pazienti con il genotipo CC per rs1051298 hanno una sopravvivenza mediana di 20,9 mesi rispetto ai 13,8 mesi dei portatori dei genotipi CT e TT. Gli omozigoti AA per rs914232 hanno una OS significativamente minore (12,1 mesi) rispetto ai portatori degli alleli AG o GG (HR=1,99, P=0,007).

Alcuni polimorfismi sul gene *GGH* sono stati precedentemente associati alla tollerabilità e alla risposta del pemetrexed. Lo SNP rs11545078, in questo studio ha evidenziato un effetto protettivo nei confronti della tossicità severa da parte dei genotipi varianti, contrariamente a quanto osservato in precedenza. Infatti, da studi funzionali è noto che l'allele variante diminuisce l'attività enzimatica causando un accumulo dei derivati poliglutammati. Per quanto riguarda il gene *DHFR*, il genotipo variante per il polimorfismo rs1650697 del promotore è risultato associato ad una diminuita espressione di DHFR in accordo con le evidenze scientifiche raccolte finora.

Il FR- $\alpha$ , risulta sovraespresso nel mesotelioma e nel cancro al polmone ed è generalmente correlato ad un *outcome* positivo nei pazienti trattati con pemetrexed. In questo studio l'allele variante del polimorfismo rs61734430 del gene *FOLR3*, codificante per il trasportatore FR- $\gamma$ , risulta associato a un aumento del tasso di progressione. Tale scoperta potrebbe rivalutare il ruolo del FR- $\gamma$  come meccanismo di up-take cellulare del pemetrexed.

A proposito del *MTHFR*, la variante rs11801133 nella coorte di studio pare non influenzare la PFS ma determina una riduzione di OS, sebbene precedentemente associata ad un aumento della PFS, OS e ad una ridotta attività enzimatica.

Per quanto concerne i polimorfismi di *SLC19A1* i risultati concordano con la letteratura per gli SNPs rs3788189 e rs1051298, i cui rispettivi genotipi AA e CC sono correlati ad una OS più lunga. Il polimorfismo rs914232, precedentemente associato alla tossicità ma non alla OS, è in questo studio riconducibile ad una minore sopravvivenza per i portatori del genotipo AA.

Concludendo, questo studio evidenzia il ruolo di alcuni polimorfismi dei geni *GGH*, *DHFR*, *MTHFR* e *SLC19A1* nei confronti di tossicità, risposta e sopravvivenza al trattamento con pemetrexed. L'identificazione di marker farmacogenetici consentirebbe all'oncologo una scelta consapevole del trattamento che ne massimizzi l'efficacia e mantenga la qualità di vita del paziente attraverso la riduzione degli eventi avversi.

Lo studio evidenzia un ruolo per i polimorfismi rs11545078 di *GGH* e rs1650697 di *DHFR* nella tossicità, per rs61734430 di *FOLR3* nella risposta al trattamento e per rs3788189, rs1051298, rs914232 di *SLC19A1* nella sopravvivenza in pazienti in terapia con pemetrexed.

**Parole chiave:** pemetrexed, NSCLC, mesotelioma, GGH, DHFR, MTHFR, SLC19A1

#### Riferimento bibliografico

[Corrigan A](#) et al. *Pharmacogenomics J* 2014 Apr 15[Epub ahead of print].

## NEUROLOGIA

### VARIANTI DEL GENE METILENETETRAIDROFOLATO REDUTTASI (*MTHFR*) E DISTURBI METABOLICI E DI AUMENTO PONDERALE INDOTTI DAGLI ANTIPSIKOTICI

A cura della Dr.ssa Donatella Carretta

I farmaci antipsicotici (AP) di seconda generazione sono di frequente utilizzati in quanto in grado di ridurre efficacemente i sintomi della schizofrenia. Tuttavia, l'uso clinico è limitato dall'insorgenza di frequenti effetti collaterali di tipo metabolico (tra cui l'aumento di peso) che possono potenzialmente causare diabete, ipertensione, iperglicemia e patologie cardiache. L'aumento di peso indotto dagli antipsicotici (*antipsychotic-induced weight gain*, AIWG) è un problema rilevante, in quanto colpisce il 30-40% dei pazienti schizofrenici ed è la causa principale della scarsa *compliance* dei pazienti. Recenti evidenze indicano che varianti genetiche possono spiegare i differenti profili di AIWG; un gene recentemente esplorato in quest'ambito è il gene metilenetetraidrofolato reduttasi (*MTHFR*) che codifica per un enzima fondamentale nel *pathway* dei folati. Due polimorfismi di questo gene, C677T (rs1801133) e A1298C (rs1801131), riducono l'attività dell'*MTHFR* del 20-35% che risulta potenzialmente in una iperomocisteminemia e in una deficienza di folati. Un'elevata concentrazione plasmatica di omocisteina è stata anche associata a complicanze cardiovascolari e al rischio di schizofrenia. Inoltre, un'alterata attività dell'*MTHFR* può causare un pattern alterato di metilazione del DNA. Gli studi realizzati fino ad oggi sull'associazione di queste varianti geniche con la sindrome metabolica indotta dagli AP hanno dato risultati discrepanti. Pertanto, nel presente studio, sono stati investigati questi due polimorfismi del gene *MTHFR* allo scopo di rilevare eventuali associazioni con le alterazioni dei parametri metabolici e di AIWG nei pazienti trattati con AP.



I pazienti, con diagnosi di schizofrenia o disturbi schizoaffettivi, provenivano da 4 gruppi (A-D). Il gruppo A ha ricevuto la diagnosi sulla base dei criteri del DSM-IV e dell'ICD-10 ed è stato valutato per un periodo di 6 settimane. Il gruppo B è stato diagnosticato seguendo i criteri del DSM-III-R ed includeva pazienti che erano refrattari o intolleranti al trattamento con gli AP tipici. Tutti i pazienti hanno ricevuto clozapina per la prima volta e sono stati valutati per l'AIWG all'inizio dello studio e dopo 6 settimane. I pazienti del gruppo C (diagnosticati con i criteri del DSM-IV) erano soggetti che rispondevano in maniera sub-ottimale al precedente trattamento con AP tipici; i pazienti di questo gruppo hanno ricevuto, secondo un disegno in doppio cieco randomizzato, clozapina, olanzapina, risperidone o alogoperidolo fino a 14 settimane. Il gruppo D (diagnosticato con il DSM-IV) comprendeva anche un gruppo di pazienti naive (*first episode psychosis*, FEP). Tutti i pazienti sono stati trattati con clozapina, risperidone o altri AP per 3 mesi; i pazienti FEP sono stati trattati con olanzapina, risperidone, quetiapina. La genotipizzazione dei pazienti è stata realizzata in cieco rispetto ai parametri metabolici esaminati utilizzando *TaqMan SNP Genotyping Assay* (Applied Biosystems).

I risultati dello studio non hanno evidenziato associazioni significative tra i genotipi e le alterazioni di peso né nel campione totale, né nei singoli gruppi. L'analisi delle associazioni alleliche ha invece mostrato un'associazione significativa solo tra l'AIWG e l'allele C del C677T nel campione totale di pazienti ( $p = 0.03$ ). Nei pazienti del gruppo D è stata inoltre osservata un'associazione significativa tra il polimorfismo C677T e i livelli di colesterolo HDL, con valori di HDL più elevati nei portatori dell'allele T ( $p = 0.025$ ). Questo effetto sembra essere dovuto ai pazienti del gruppo FEP in cui è stata rilevata un'associazione significativa tra più alti livelli di HDL e l'allele T ( $p = 0.031$ ). Infine, i pazienti FEP 1298CC omozigoti hanno mostrato un aumento di peso significativamente maggiore ( $8.24\% \pm 8.4\%$ ) rispetto ai portatori dell'allele A ( $4.30\% \pm 8.4\%$ ;  $p = 0.048$ ).

Un punto di forza del presente studio è l'ampio campione di pazienti, essendo il più grande studio prospettico realizzato sul gene *MTHFR*. Inoltre, in questo studio è stato considerato un importante sotto-gruppo, quello dei FEP, che ha il vantaggio di non essere stato precedentemente esposto ad altri AP. La significativa associazione tra l'allele 677-C e l'aumento di peso dei pazienti del campione totale sembra essere dovuta ai pazienti FEP, suggerendo un ruolo del gene *MTHFR* negli stadi precoci dell'AIWG. Pertanto, i pazienti nelle fasi iniziali della malattia che sono esposti ad AP per la prima volta sembrano mostrare un diverso meccanismo dell'AIWG rispetto ai pazienti cronici. Tuttavia, questi risultati preliminari nel gruppo FEP devono essere interpretati con cautela considerate le piccole dimensioni del campione.

I dati della presente ricerca sono in accordo con alcuni studi precedenti e divergenti da altri; una possibile spiegazione risiede nel fatto che nel presente studio vi è una eterogeneità delle dimensioni del campione, dell'etnia, della durata e del disegno sperimentale. Pertanto, studi futuri dovrebbero essere condotti su gruppi di pazienti più omogenei e volti in particolare al confronto dei soggetti negli stadi precoci e tardivi delle psicosi.

In conclusione, i risultati dello studio mostrano un'associazione significativa tra l'AIWG e l'allele C del polimorfismo C677T del gene *MTHFR* nel campione totale di pazienti schizofrenici trattati con AP. Nel gruppo dei pazienti FEP si osserva un aumento di peso maggiore nei soggetti 1298CC omozigoti rispetto ai portatori dell'allele A ed un'associazione significativa tra alti livelli di HDL e l'allele T del polimorfismo C677T dello stesso gene. Questi dati suggeriscono che il gene *MTHFR* possa essere coinvolto negli stadi precoci dell'AIWG.

**Parole chiave:** *MTHFR*, antipsicotici, aumento di peso, C677T, A1298C.

#### Riferimento bibliografico

[Kao AC](#) et al. *J Psychiatr Res* 2014, 54:36-42.

## ASSOCIAZIONE TRA VARIANTI DEL GENE GADL1 E LA RISPOSTA ALLA TERAPIA CON LITIO IN PAZIENTI AFFETTI DA DISTURBO BIPOLARE DI TIPO I

A cura della Dott.ssa Sarah Carginin

Il disturbo bipolare è una condizione psichiatrica invalidante caratterizzata dall'alternarsi di episodi conclamati di mania e di depressione maggiore. Il litio è un farmaco stabilizzante dell'umore che viene ampiamente utilizzato nel trattamento del disturbo bipolare. Tuttavia, circa il 30% dei pazienti con disturbo bipolare non risponde in maniera adeguata al trattamento con litio. In letteratura sono stati riportati alcuni fattori clinici predittivi, quali l'età d'insorgenza dei sintomi, la storia familiare di disturbo bipolare, e l'aderenza alla terapia, tuttavia il ruolo dei fattori genetici nell'influenzare la risposta al trattamento con litio è ancora poco noto. Il primo studio di associazione *genome-wide*, condotto su pazienti europei affetti da disturbo bipolare, ha evidenziato una correlazione significativa tra varianti sul cromosoma 4q32 (di cui una del gene GRIA2) e la risposta alla terapia con litio (Perlis et al. *Am J Psychiatry* 2009, 166(6):718-25). Tuttavia, nessun polimorfismo a singolo nucleotide (SNP), che sia stato finora associato alla risposta al trattamento con litio, ha dimostrato una sensibilità sufficiente da giustificare un suo possibile utilizzo nella pratica clinica. Il presente studio di associazione *genome-wide* si pone l'obiettivo di identificare nuovi fattori predittivi della risposta al trattamento con litio in una coorte di pazienti asiatici affetti da disturbo bipolare di tipo I.

Lo studio di associazione *genome-wide* è stato condotto su una *coorte esploratoria* costituita da 294 pazienti cinesi Han affetti da disturbo bipolare di tipo I e con una buona aderenza alla terapia con litio per un periodo di trattamento superiore a 2 anni. La risposta alla terapia farmacologica è stata determinata mediante i criteri di "valutazione retrospettiva della risposta al trattamento a lungo termine in pazienti affetti da disturbo bipolare" (scala Alda), atti ad analizzare la frequenza, la durata e la severità degli eventuali episodi di malattia manifestatisi durante il periodo di trattamento con litio. La genotipizzazione è avvenuta tramite tecnologia Illumina HumanHap550-Duo BeadChip e HumanOmni1-Quad BeadChip, con successiva integrazione dei due data sets attraverso tecniche di imputazione sulla base dei dati riportati in HapMap II. I top SNPs, risultati statisticamente associati alla risposta alla terapia con litio, sono stati ulteriormente genotipizzati in due coorti di replicazione mediante tecnologia Sequenom Mass ARRAY. La prima coorte di replicazione (n=100) era costituita da pazienti affetti da disturbo bipolare di tipo I, con buona aderenza alla terapia con litio per un periodo di trattamento di almeno 10 anni; la seconda coorte (n=24) era, invece, formata da pazienti bipolari (tipo I) in monoterapia con litio da almeno 2 anni e con scarsa risposta ad un pregresso trattamento continuativo a base di altri stabilizzatori dell'umore. Il gene GADL1 è stato sequenziato in un campione di 188 pazienti selezionati in maniera random dalla coorte esploratoria, di cui 94 *responder* alla terapia con litio e 94 *non responder* al farmaco.

*Coorte esploratoria.* Dall'analisi di associazione *genome-wide* emerge omogeneità nel background genetico dei pazienti appartenenti alla coorte esploratoria. Ventiquattro polimorfismi del cromosoma 3p24.1 risultano essere associati, con una significatività statistica *genome-wide* ( $P < 6.9 \times 10^{-9}$ ), alla risposta al trattamento con litio. Nello specifico, due varianti introniche del gene GADL1 (rs17026688 e rs17026651) presentano l'associazione statisticamente più significativa con la risposta alla terapia (rispettivamente,  $P = 5.50 \times 10^{-37}$ ;  $P = 2.52 \times 10^{-37}$ ). Le due varianti di interesse risultano essere in forte *linkage disequilibrium* tra loro ( $r^2 = 0.96$ ). La specificità e la sensibilità dei due polimorfismi nel predire la risposta al trattamento con litio è, rispettivamente, del 93% e 85% per lo SNP rs17026688 e del 93% e 86% per rs17026651.

*Coorte di replicazione I.* La distribuzione delle frequenze alleliche dei top SNPs analizzati nella coorte di replicazione I è sovrapponibile a quella riscontrata nella coorte esploratoria. Gli SNPs rs17026688 e rs17026651 si riconfermano essere le varianti genetiche associate in maniera più significativa alla risposta al trattamento con litio ( $P = 9.19 \times 10^{-15}$  per entrambi gli SNPs). Le due varianti risultano essere in completo *linkage disequilibrium* fra loro ( $r^2 = 1$ ). Combinando i pazienti appartenenti alla coorte esploratoria con quelli che costituiscono la coorte di replicazione ( $n_{\text{tot}}=394$ ), l'associazione dei due SNPs di interesse (rs17026688 e rs17026651) con la risposta al farmaco raggiunge una significatività statistica, rispettivamente, di  $P = 1.66 \times 10^{-49}$  e  $P = 7.07 \times 10^{-50}$ .

*Coorte di replicazione II.* Gli SNPs rs17026688 e rs17026651 sono in completo *linkage disequilibrium* tra loro. Tutti i portatori degli alleli associati alla risposta alla terapia con litio (N=16) mostrano una migliore risposta alla terapia se comparati ai portatori degli alleli associati ad una scarsa risposta al farmaco (N=8). Il gene GADL1 è stato poi sequenziato in 188 pazienti selezionati in maniera random a partire dalla coorte esplorativa (94 *responders* alla terapia con litio e 94 *non responders*). Dal sequenziamento del gene è emersa una delezione a singola base nell'introne 8 del gene GADL1 (IVS8+48delG) che è risultata in completo *linkage disequilibrium* con lo SNP rs17026688.

Il gene GADL1 codifica per una proteina appartenente alla famiglia delle decarbossilasi di tipo II. Ad oggi non è noto il suo ruolo fisiologico, tuttavia è possibile che tale proteina sia funzionalmente simile all'enzima glutammato decarbossilasi (GAD), della quale condivide il dominio catalitico piridoxal-dipendente, coinvolto nella decarbossilazione del glutammato, dell'istidina, della tirosina e degli aminoacidi L-aromatici. Un'ipotesi plausibile è che la delezione IVS8+48delG del gene GADL1 possa alterare la struttura del dominio catalitico piridoxal-dipendente, con un conseguente impatto sulla sua attività di decarbossilazione del glutammato. GADL1 e GAD risultano, inoltre, essere espresse nel tessuto cerebrale, dove il glutammato agisce come principale neurotrasmettitore eccitatorio. Dal seguente studio di associazione *genome-wide*, emerge, quindi, un possibile coinvolgimento del glutammato nella complessa patofisiologia del disturbo bipolare. Tale evidenza risulta, inoltre, essere coerente con i risultati dello studio di associazione *genome-wide* di Perlis et al (Am J Psychiatry. 2009, 166:718-25), che ha evidenziato un'associazione significativa tra una variante del gene GRIA2, codificante per un recettore AMPA del glutammato, e la risposta alla terapia a base di litio in pazienti affetti da disturbo bipolare.

Questo studio di associazione *genome-wide* identifica le varianti rs17026688, rs17026651 e IVS8+48delG del gene GADL1 come fattori predittivi della risposta alla terapia con litio in pazienti asiatici affetti da disturbo bipolare di tipo I.

Tali varianti, tuttavia, risultano essere rare in popolazioni di origine europea od africana ( $0.0\% < \text{MAF} < 0,9\%$ ). Ulteriori studi farmacogenetici sono quindi necessari per indagare il possibile ruolo di altri polimorfismi del gene GADL1 nell'influenzare la risposta al trattamento con litio in pazienti di etnia non asiatica affetti da disturbo bipolare di tipo I.

**Parole chiave:** litio, disturbo bipolare, GADL1

#### Riferimento bibliografico

[Chen CH](#) et al. *N Engl J Med* 2014, 370(2):119-28.

## IMMUNOMODULAZIONE

### IDENTIFICAZIONE DI UNA NUOVA VARIANTE ALLELICA DELLA TIOPURINA S-METILTRANSFERASI (TPMT\*37)

*A cura della Dott.ssa Stefania Cheli*

La tiopurina S-metiltransferasi (TPMT, EC2.1.1.67) è un enzima chiave nel metabolismo degli immunomodulatori, azatioprina e 6-mercaptopurina, che converte questi profarmaci nel metabolita inattivo metilmercaptopurina e nel metabolita attivo metilmercaptopurina (6-MMP), che inibisce la sintesi de-novo delle purine. Il rapporto tra 6-MMP e l'altro metabolita attivo, nucleotidi della tioguanina (6-TGNs), determina in larga misura se un paziente risponderà bene alla terapia con tiopurina o se avrà un evento avverso e/o resistenza al trattamento. 6-TGNs sono responsabili dell'effetto terapeutico della terapia con tiopurina. Questi metaboliti riducono l'infiammazione e promuovono l'apoptosi cellulare per incorporazione casuale negli acidi nucleici e inibizione dell'enzima Rac1 nelle cellule T. Tuttavia, un eccesso di 6-TGN

risulta in mielosoppressione, mentre un eccesso di 6-MMP è associato a resistenza al trattamento ed epatotossicità. TPMT è soggetta a polimorfismo genetico che si traduce in una distribuzione trimodale dell'attività dell'enzima. Weinshilboum e Sladek sono stati i primi ad osservare questo polimorfismo in un gruppo di campioni di 298 Caucasiche sani non correlati tra loro. Utilizzando un test di radiochimica per misurare l'attività della TPMT nei globuli rossi (RBC), lo 0,3% dei partecipanti allo studio ha mostrato un deficit completo, il 10% un'attività intermedia e il 90% una normale attività della TPMT. Gli individui che non presentano attività enzimatica della TPMT sono spesso indicati come metilatori lenti (*poor methylators*, PMS) e possono sviluppare mielosoppressione potenzialmente pericolosa per la vita con una dose standard di azatioprina o 6-mercaptopurina a causa di una produzione eccessiva di 6-TGN. Anche una parte dei metilatori intermedi (IM) può sviluppare mielosoppressione in terapia con tiopurina. Circa il 95% dei PM sono spiegati dai quattro alleli: TPMT\*2 (238G>C, rs1800462, Ala80Pro), TPMT\*3B (460G>A, rs1800460, Ala154Thr; 719A>G, rs1142345, Tyr240Cys), TPMT\*3C (719A>G, Tyr240Cys), e TPMT\*8 (644G>A, rs56161402, Arg215His). C'è una notevole variabilità nella frequenza di questi alleli comuni PM in tutte le etnie. TPMT\*3A è l'allele PM più comune nei caucasiche, TPMT\*3C è raro mentre il TPMT\*8 non è stato riportato. In contrasto, TPMT\*3C è comune negli asiatici e negli africani e il TPMT\*8 spiega fino al 38% dei PM in alcune popolazioni Africane sub-Sahariane. Il restante 5 % di PM presenta uno dei circa 35 alleli rari della TPMT (<http://www.imh.liu.se/tpmtalleles>) o una nuova variante allelica. L'incidenza di queste nuove varianti della TPMT nelle popolazioni caucasiche è di circa uno su 200. La concordanza genotipo-fenotipo si avvicina al 100% negli individui con attività normale della TPMT, ma scende al 86% negli individui con attività intermedia. Circa uno su 20 IM è portatore di una nuova variante mutata della TPMT. L'identificazione di queste mutazioni è clinicamente importante poiché si stima che il 30-60% dei portatori sarà incapace di tollerare dosi standard di azatioprina e 6-mercaptopurina. In questo breve report, gli autori descrivono l'identificazione di una nuova variante allelica PM, TPMT\*37, in un uomo caucasico.

Il paziente M era un uomo caucasico di 67 anni della Nuova Zelanda cui è stata diagnosticata la gotta 12 anni prima. Questo paziente stava ricevendo 250 mg di allopurinolo al giorno e non aveva mai ricevuto azatioprina o 6-mercaptopurina. L'anamnesi non mostrava niente di significativo. Il DNA è stato raccolto da 5 ml di sangue periferico del paziente M e di suo figlio, unico parente vivo, utilizzando l'estrazione con guanidina isotiocianato e conservato in Tris-Tampone EDTA (pH 7,6) a -20°C fino all'analisi. Il paziente M e suo figlio sono stati arruolati nello Studio di Genetica della Gotta della Nuova Zelanda, che dispone dell'approvazione del Comitato Etico per la Salute e la Disabilità della Nuova Zelanda (MEC/05/10/130). Il paziente M è stato sottoposto a sequenziamento esonico completo come parte di uno studio volto ad identificare i marcatori genetici della risposta ad allopurinolo. Il sequenziamento esonico è stato effettuato utilizzando lo strumento Illumina HiSeq 2000 (Illumina Inc., San Diego, California, USA) profondità con copertura del genoma 100x. Le sequenze sono state poi allineate usando come sequenza di riferimento GRCh37 mediante software BWA. Il *Toolkit Genome Analysis* (GATK) (<http://www.broadinstitute.org/gatk/>) è stato utilizzato per ricalibrare lo *score* di qualità delle basi, riallineare le indels (inserzioni/delezioni), rimuovere i duplicati, valutare gli SNP, identificare INDEL e per la genotipizzazione contemporanea di tutti i campioni. Galaxy, lo strumento di analisi del genoma *web-based*, è stato utilizzato per estrarre la regione 6:18127942-18155905 per la ricerca degli SNP nel gene TPMT (sequenza di riferimento NCBI: NM\_000367.2, OMIM 187680). La copertura media del genoma raggiunta per tutto il gene della TPMT era di 33.25 *reads*. Nella regione intorno al SNP d'interesse, la copertura era di 49 *reads*.

Per confermare il nuovo SNP non-sinonimo identificato, è stato amplificato un frammento di 184 bp che comprende parte dell'introne 9 e dell'esone 10 utilizzando il *primer forward* pubblicato in precedenza 5'-TTAACATGTTACTCTTTCTTGTTC-3' e il *primer reverse* 5'-CCTCAAAAACATGTCAGTGTG-3'. La ricerca con BLAT (<https://genome.ucsc.edu/index.html>) ha confermato la specificità del 100% delle sequenze dei primers per la TPMT e quindi l'uso di questa coppia di primers impedisce la co-amplificazione dello pseudogene processato ed altamente omologo TPMT P1. Brevemente, la PCR è stata effettuata in un volume di 20ul, contenente dNTP 200umol/l, 16ng di DNA, 1U di Platinum Taq DNA polimerasi (Invitrogen), 2mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 1x di reazione tampone e 0.3umol/l di ciascun primer. Condizioni: denaturazione iniziale di 94°C per 2 minuti, seguita da 35 cicli di amplificazione a 94°C per 30 s, 58°C per 30 s, 72°C per 40 s, ed una fase di estensione finale di 72°C per 1 min. Dieci microlitri di prodotto di PCR sono stati visualizzati su gel di agarosio al 2% colorato con bromuro. I rimanenti 10ul sono stati purificati

utilizzando il kit *PureLink Quick PCR Purification* (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) e sequenziati in entrambe le direzioni utilizzando la chimica del *ABI BigDye Terminator* versione 3.1 sull'analizzatore *ABI 3730xl DNA Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, California, USA).

L'attività enzimatica della TPMT è stata misurata utilizzando un metodo radiochimico basato sulla conversione di 6-MP in 6-MMP radiomarcato utilizzando S-adenosil-L-metionina radiomarcata come donatore di metile. Il saggio è stato eseguito da specialisti di biochimica al *Canterbury Health Laboratories* (Christchurch, Nuova Zelanda). Per questo saggio, la bassa attività della TPMT è stata definita come minore di 5.0 UI/ml, l'attività intermedia tra 5,0-9,2 UI/ml, normale ad alta attività come 9,3-17,6 UI/ml e ultra-alta attività per valori maggiori di 17,6 IU/ml. L'analisi delle sequenze esoniche della TPMT nel paziente M ha individuato sei SNPs precedentemente descritti e un nuovo SNP non-sinonimo. Degli SNPs noti, quattro erano intronici (rs3930696 nell'introne 1, rs12529220 nell'introne 2, rs4449636 nell'introne 3 e rs2518463 nell'introne 4), due erano situati nella regione 3' non tradotta (rs7886 e rs1142378), ed uno era sinonimo (TPMT\*1S, rs2842934). Il polimorfismo non-sinonimo, 648T>A, genera un prematuro codone di stop (C216\*) nell'esone 10 che risulta nella perdita degli ultimi 29 aminoacidi residui nel C-terminale della proteina TPMT (NP\_000358). Questo polimorfismo è stato confermato mediante PCR e sequenziamento. SNP soddisfa i criteri d'inclusione del Comitato per la Nomenclatura della TPMT per i nuovi alleli ed è elencato sul suo sito web (<http://www.imh.liu.se/tpmtalleles>) come TPMT\*37 (NM\_000367.2: c.648T>A, NP\_000358.1: p.Cys216Ter) con l'identificazione di riferimento degli SNP (rsID) su dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) rs398122996. Il sequenziamento ha rilevato che anche il figlio malato di M è portatore della variante TPMT\*37. E' stata poi misurata l'attività enzimatica della TPMT nei globuli rossi del paziente M ed è risultata di 8,9 /ml RBC (range di riferimento: 9,3-17,6 U/ml RBC), che indica un'attività intermedia dell'enzima.

In questa breve relazione, gli autori descrivono solo la seconda mutazione non-senso (648T>A, C216\*) che hanno identificato nella TPMT. La prima mutazione non-senso, 292G>T (rs72552739), introduce un codone di stop prematuro nella TPMT alla posizione 98. Questa mutazione, insieme alla 460G>A (rs1800460, Ala154Thr) e alla 719A>A (rs1142345, Tyr240Cys), definisce l'allele PM TPMT\*3D. Analisi in silico prevedono che TPMT\*37, così come TPMT\*3D, riduce notevolmente l'attività enzimatica e pertanto conferisce un fenotipo IM negli individui, come il paziente M e suo figlio, che sono eterozigoti per l'allele *wild-type* (TPMT\*1). Questa previsione è del tutto coerente con l'attività intermedia della TPMT registrata per il paziente M. Se il paziente M o suo figlio dovessero mai necessitare di una terapia con tiopurina, questo livello di attività enzimatica della TPMT li esporrebbe ad un aumentato del rischio di mielosoppressione indotta da tiopurina. Per minimizzare questo rischio, la dose iniziale deve essere ridotta del 30-60 % rispetto a quella standard ed è raccomandato il monitoraggio dei globuli bianchi e delle concentrazioni di 6-TGN.

In questa breve relazione, viene descritta l'identificazione di un nuovo allele (TPMT\*37) in un maschio caucasico che mostrava un'attività enzimatica della TPMT cellulare RBC di 8,9 U/ml (range di riferimento: 9,3-17,6 U/ml).

**Parole chiave:** mercaptopurina, tioguanina, azatioprina, 6-TGNs, 6-MMP, TPMT\*3D

#### Riferimento bibliografico

[Roberts RL](#) et al. *Pharmacogenet Genomics* 2014, 24(6):320-34.

## ASSOCIAZIONE DI FCGR2A CON LA RISPOSTA AL TRATTAMENTO CON INFLIXIMAB IN PAZIENTI AFFETTI DA ARTRITE REUMATOIDE

A cura della Dott.ssa Eleonora Turrini

Il trattamento dell'artrite reumatoide ha visto un notevole miglioramento dall'introduzione nella terapia di inibitori del fattore di necrosi tumorale (TNF), sebbene ancora un'elevata percentuale di pazienti non risponda in maniera ottimale al trattamento. Sono stati analizzati molti parametri per l'ottimizzazione della risposta, ma nessuno di essi trova un'utile applicazione nella pratica clinica. L'attività della patologia alla *baseline* risulta, ad oggi, il predittore più efficace di risposta alla terapia. Altri fattori predittivi come sesso,

fattore reumatoide (RF), anticorpi anti-citrullina, disabilità e uso concomitante di farmaci che modificano il decorso della patologia reumatica (*disease-modifying antirheumatic drugs*, DMARDs) sono risultati meno consistenti. Per quel che riguarda l'approccio gene-candidato, un gene interessante è rappresentato da FCGR2A, che codifica per il recettore Fc delle immunoglobuline e, di solito, è espresso sulla superficie di molte cellule immunitarie. Il polimorfismo H131R di FCGR2A è risultato correlato alla risposta alla terapia con anti-TNF in maniera controversa. Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare l'associazione di questo polimorfismo con la risposta al trattamento con 3 dei più comuni inibitori di TNF, infliximab (INX), etanercept (ETC) o adalimumab (ADM), in pazienti affetti da artrite reumatoide.

I pazienti affetti da artrite reumatoide sono stati arruolati secondo i criteri dell'*American College of Rheumatology* del 1987 recentemente revisionati. I pazienti erano stati trattati con INX, ETC o ADM tra il 2000 e il 2010. L'indicazione del trattamento, la scelta della terapia e il controllo del decorso della malattia sono stati effettuati indipendentemente dai dati raccolti per il presente studio. Le valutazioni includevano la quantificazione del *Disease Activity Score* (DAS) 28, ovvero lo strumento che consente di quantificare l'attività dell'artrite reumatoide nei pazienti a 3, 6 e 12 mesi dall'inizio del trattamento. Oltre a DAS28 si è valutata la risposta secondo i criteri della *European League Against Rheumatism* (EULAR). I gruppi di pazienti in studio erano due: il primo costituito da 299 pazienti reclutati da 6 unità reumatologiche di ospedali spagnoli, per 217 dei quali si è ottenuto il follow-up completo a 3, 6 e 12 mesi; il secondo gruppo, invece, era costituito da 130 pazienti arruolati da altri 4 ospedali (due spagnoli e due greci) una volta che i risultati del primo gruppo in studio erano stati ottenuti. Tutti i pazienti avevano firmato il consenso informato e lo studio è stato approvato dal Comitato Etico della Galizia.

Campioni e dati relativi ai 429 pazienti affetti da artrite reumatoide sono stati ottenuti in due diverse fasi. Diciannove pazienti sono stati esclusi dallo studio a causa della scarsa qualità del genotipo o a causa di bassi livelli di DAS28 alla *baseline*. I restanti 410 pazienti, di cui 286 del primo gruppo e 124 del secondo, mostravano caratteristiche di comprovata e severa artrite reumatoide. La severità si conferma nell'elevata percentuale di pazienti che mostravano artrite erosiva e mancanza di controllo della patologia con trattamenti precedenti, incluso il trattamento con DMARDs. La *baseline* media DAS28 era 5,9 e quella relativa all'*Health Assessment Questionnaire* (HAQ) era 1,6, che indica patologia attiva con disabilità da moderata a severa. Altri segnali relativi alla severità e attività dell'artrite reumatoide erano presenti nella popolazione in studio come elevata prevalenza di RF o presenza di anticorpi della proteina anti-citrullinata (ACPA), elevata proteina C-reattiva (PCR) e velocità di sedimentazione degli eritrociti (VES). Alcune caratteristiche sono risultate diverse alla *baseline* tra i tre gruppi trattati con i 3 differenti farmaci, come la prevalenza di RF e ACPA, che era maggiore in pazienti trattati con ETC, ed i livelli di PCR che erano più elevati in pazienti trattati con ADM e più bassi in quelli trattati con INX. La maggior parte dei pazienti ricevevano DMARDs come terapia combinata all'inibitore di TNF quasi sempre con INX, quasi sempre con ADM e meno spesso se trattati con ETC. Il farmaco DMARD più comunemente usato era il metotressato (MTX) (89.3%), seguito da leflunomide (7.9%) ed altri farmaci DMARDs nel 2.8% dei casi. Inoltre il 68.8% dei pazienti riceveva corticosteroidi. Il trattamento con gli inibitori di TNF ha portato ad un miglioramento di tutti i parametri dell'attività e disabilità della patologia tra cui PCR, VES, HAQ e DAS28. DAS28 ha mostrato un minor miglioramento nei pazienti trattati con INX rispetto a quelli trattati con gli altri due farmaci. A 12 mesi di follow-up i risultati migliori di decremento della patologia si sono osservati per ETC.

Le analisi relative all'associazione del polimorfismo H131R di FCGR2A con la risposta al trattamento è stata osservata solo per pazienti trattati con INX. I soggetti portatori dell'allele 131R del primo gruppo in studio erano associati ad un minor cambiamento dello score DAS28 a 6 e 12 mesi di follow-up ( $P = 0.04$  e  $P = 0.008$ , rispettivamente) ed un trend di associazione si è osservato anche per i 3 mesi di follow-up. Includendo nell'analisi anche i pazienti per i cui i dati di follow-up non erano completi per tutti i tempi anche l'associazione a 3 mesi risultava significativa ( $P = 0.034$ ), ma la significatività veniva persa a 6 mesi. Nel secondo gruppo di pazienti l'associazione rimane significativa solo a 3 mesi di follow-up ( $P = 0.026$ ), questo può essere dovuto al campione in esame nettamente più ristretto. L'analisi globale dei campioni ha mostrato associazione significativa tra il polimorfismo e la risposta a INX per i follow-up a 3 e 12 mesi ( $P = 0.0067$  e  $P = 0.044$ , rispettivamente). L'associazione si è osservata anche nel confronto tra responsivi e non responsivi al trattamento con INX secondo i criteri EULAR, per cui si è osservata una associazione significativa tra lo SNP H131R di FCGR2A a tutti e 3 i tempi di follow-up analizzati in almeno uno dei due gruppi di pazienti in studio.



La presenza dell'allele polimorfo 131R del gene FCGR2A è stato associato ad una peggior risposta al trattamento farmacologico con INX in pazienti affetti da artrite reumatoide.

Questa evidenza potrebbe essere utile per comprendere i meccanismi che si collocano alla base del fallimento terapeutico e questo polimorfismo potrebbe contribuire al *panel* di biomarcatori utile a predire la risposta a INX. Lo studio risulta avere sufficiente potere statistico per associare il polimorfismo in studio alla popolazione trattata con INX, mentre non ha lo stesso potere se la popolazione viene stratificata per il trattamento con gli altri due inibitori di TNF.

**Parole chiave:** anti-TNF, biomarcatori, recettore Fc, FCGR2A, genetica, infliximab, artrite reumatoide

#### Riferimento bibliografico

[Montes A](#) et al. *Pharmacogenet Genomics* 2014, 24(5): 238-45.

## NUOVI BIOMARCATORI GENETICI PER PREVEDERE LE CONCENTRAZIONI DI AZATIOPRINA NEL SANGUE NELLE TERAPIE IN COMBINAZIONE CON ACIDO 5-AMINOSALICILICO

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

La 6-mercaptopurina (6-MP) e il suo pro-farmaco azatioprina (AZA), sono immunosoppressori tiopurinici ampiamente utilizzati nel trattamento delle malattie infiammatorie croniche intestinale (MICI): sia l'AZA che la 6-MP subiscono un complesso metabolismo al fine di produrre i metaboliti 6-tioguaninici (6-TGN) farmacologicamente attivi. L'efficacia clinica delle tiopurine sembra essere correlata con i livelli eritrocitari di 6-TGN, ed è stato suggerito che il monitoraggio del trattamento con farmaci tiopurinici attraverso il dosaggio delle concentrazioni ematiche di 6-TGN possa essere uno strumento utile per ottimizzare la terapia. Nonostante i farmaci tiopurinici siano considerati relativamente sicuri, diversi studi hanno riportato casi di sospensione di questi farmaci durante la terapia a lungo termine in circa il 50% dei pazienti, soprattutto a causa dello sviluppo di reazioni avverse (ADR). Polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) del gene dell'enzima enzima tiopurina-S-metiltransferasi (TPMT), responsabile dell'inattivazione metabolica delle tiopurine, sono stati correlati in letteratura all'incidenza di ADR come ad esempio mielosoppressione. E' stato dimostrato che pazienti con alleli mutati presentano un'attività enzimatica di TPMT inferiore e sono più propensi a sviluppare mielosoppressione. E' stato inoltre dimostrato che l'acido 5-aminosalicilico (5-ASA) inibisce l'attività dell'enzima TPMT, portando ad un aumento delle concentrazioni ematiche dei nucleotidi 6-TGN, e quindi ad una maggiore probabilità di comparsa di ADR. Tuttavia, questo meccanismo non è ancora stato completamente chiarito e l'identificazione di nuovi biomarcatori genetici per prevedere le concentrazioni ematiche dei nucleotidi 6-TGN prima della somministrazione delle tiopurine potrebbe essere molto utile ed importante.

Lo scopo dello studio, è stato quello di studiare SNP correlati a differenze nell'espressione genica di proteine che potrebbero influire sul metabolismo dell'AZA, in pazienti in terapia di combinazione AZA/5-ASA.

Recentemente sono state messe a punto metodiche di analisi per individuare SNPs correlati a cambiamenti di espressione genica dopo l'esposizione al farmaco (*ExpressGenotyping*): tale tecnica ha permesso di studiare su linee linfocitarie hapmap trattate con AZA/5-ASA, le differenze di espressione genica indotte dal trattamento e correlarle a specifici SNP responsabili (*Expression allelic imbalance*, EAI). Le informazioni genetiche ottenute secondo gli autori potrebbero essere importanti per prevedere le concentrazioni ematiche di 6-TGN. Pertanto, l'analisi di *ExpressGenotyping* potrebbe essere utilizzata come una nuova tecnologia per individuare biomarcatori genetici importanti per predire le concentrazioni ematiche di nucleotidi 6-TGN in pazienti con MICI.

Lo studio ha coinvolto 38 pazienti con MICI in trattamento con AZA (29 maschi e 9 femmine, età mediana 44,0±10,6, 21 con diagnosi di colite ulcerosa, 14 con diagnosi di morbo di Crohn e 3 con diagnosi di malattia di Behcet). Trentacinque dei 38 pazienti arruolati sono stati trattati con una terapia di combinazione AZA/5-ASA. Sui pazienti arruolati sono state analizzate le concentrazioni plasmatiche dei metaboliti 6-TGN

mediante HPLC, e il profilo genetico per gli SNP selezionati tramite la tecnica *ExpressGenotyping*: tali risultati sono stati correlati fra loro.

Il principio di funzionamento di base dell' *ExpressGenotyping* prevede diversi step: 1) Le linee cellulari (linfociti HapMap) vengono trattate con il farmaco di interesse; 2) RNA e DNA vengono estratti da queste linee cellulari (trattate e non trattate con il farmaco); 3) viene eseguita un'analisi di SNP *genotyping* con Affymetrix GeneChip; 4) vengono effettuate le analisi dei profili di espressione mediante Affymetrix GeneChip in linee trattate e non con i farmaci di interesse; 5) infine vengono identificati i biomarcatori genetici candidati per la previsione della risposta ai farmaci che vengono convalidati su pazienti con diagnosi di MICI.

Sulle linee linfocitarie hapmap sono state analizzate le differenze di espressione genica in seguito a co-trattamento con AZA 100 uM/5-ASA 10mM: dopo 24 ore 796 geni sono risultati up-regolati dal trattamento, e 815 down-regolati. Analisi di SNP *genotyping* sulle linee linfocitarie hapmap in correlazione ai risultati di espressione genica, hanno permesso di ottenere gli EAI causati dal trattamento. Sono stati quindi selezionati gli SNP che correlavano con le EAI osservate, che sono stati successivamente analizzati nei pazienti con MICI arruolati per valutarne la correlazione con i dosaggi plasmatici di 6-TGN.

Dall'analisi comparativa è stata dimostrata un'associazione tra i polimorfismi del gene SLC38A9 studiati sui pazienti con MICI con la quantificazione dei metaboliti plasmatici 6-TGN, e con l'EAI indotta dal co-trattamento AZA/5-ASA nelle linee linfocitarie HapMap. Polimorfismi del gene SLC38A9 identificati dalle analisi di *ExpressGenotyping* potrebbero essere utilizzati come biomarcatori genetici per prevedere le concentrazioni plasmatiche dei nucleotidi 6-TGN nei pazienti in trattamento con AZA/5-ASA.

Analisi di *ExpressGenotyping* per selezionare gli SNP coinvolti nella regolazione dell'espressione genica indotta dal trattamento farmacologico, e la successiva validazione in pazienti, sembrano essere strumenti utili per identificare differenze inter-individuali nella risposta ai farmaci e nella comparsa di effetti avversi per pazienti in trattamento combinato AZA/5-ASA: questo studio identifica in particolare rilevanti effetti per SNP di SLC38A9.

**Parole chiave:** azatioprina, 5-amminosalicilati, biomarkers, espressione genica, linfociti

#### Riferimento bibliografico

[Uchiyama K](#) et al. *PLoS One* 2014, 9(4):e95080.

### LA METANALISI DEL MESE

#### ASSOCIAZIONE TRA I POLIMORFISMI DELLA METILEN-TETRAIDROFOLATO REDUTTASI E IL RISCHIO DI RECIDIVA NELLA LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA: STUDIO DI META-ANALISI

A cura del Dott. Vittorio Simeon

Nonostante importanti progressi nella cura della leucemia linfoblastica acuta (ALL), il tasso di mortalità nella popolazione adulta rimane ancora alto. Esiste una grande eterogeneità nella risposta farmacologica anche nei pazienti pediatrici. La causa più comune del fallimento terapeutico è sicuramente l'insorgenza di recidive in questi pazienti. Sono stati utilizzati fattori prognostici sia clinici che biologici per stratificare i pazienti con ALL in accordo al loro rischio di recidiva. L'influenza dei polimorfismi dei geni coinvolti nel metabolismo degli agenti chemioterapici è stata presa in analisi come fattore prognostico negli ultimi anni, ed è stata ampiamente studiata in relazione alla risposta terapeutica nei pazienti con ALL.

Il metotrexato (MTX) è il chemioterapico maggiormente utilizzato nel trattamento della ALL, ed agisce come antagonista della sintesi dell'acido folico. La sua tossicità può essere non solo pericolosa di per sé per la vita dei pazienti, ma anche una delle principali ragioni per l'interruzione o la discontinuazione della chemioterapia, incrementando di conseguenza il rischio di recidiva della malattia.

L'enzima metilen-tetraidrofolato reduttasi (MTHFR) svolge un ruolo molto importante nel pathway del metabolismo acido folico/MTX. L'attività del MTHFR può avere un grosso impatto sulla ricorrenza e recidiva nei pazienti con ALL. Il gene della MTHFR ha due polimorfismi funzionali comuni: C677T (rs1801133) e A1298C (rs1801131). L'allele 677T codifica per una proteina con una minore attività enzimatica in rapporto alla proteina prodotta dall'allele 677C. Il polimorfismo A1298C comporta invece una sostituzione al codone 429, il dominio regolatore della S-adenosil metionina. L'attività enzimatica è del 40% più bassa per il genotipo 1298CC rispetto a 1298AA. Entrambi i polimorfismi producono un enzima termolabile con ridotta attività funzionale, ed una conseguente distribuzione intracellulare alterata dei substrati dell'acido folico.

Numerosi studi pubblicati hanno analizzato l'associazione tra questi due polimorfismi e il rischio di recidiva in ALL, con risultati contrastanti. Gli autori individuano quattro ragioni principali in grado di spiegare le discrepanze tra gli studi inclusi: *Età* – c'è ampia discrepanza nella sensibilità ad un trattamento farmacologico tra differenti gruppi di età dei pazienti, e i pazienti con una bassa sensibilità potrebbero avere un rischio aumentato di recidiva; *Etnia* – l'attività degli enzimi del metabolismo dei folati possono variare tra diverse popolazioni, gruppi etnici, e razze, creando in questo modo diversi profili metabolici; *Tossicità* – la tossicità legata al trattamento può portare all'interruzione o alla discontinuazione della chemioterapia, che può ridurre gli effetti della terapia e risultare in una quota di cellule tumorale non eliminate con un successivo incremento del rischio di recidiva; *Durata del follow-up* – può essere diversa tra gli studi inclusi, ed il rischio di recidiva può variare con il tempo.

A tale scopo, nello studio pubblicato da He HR e colleghi su *The Pharmacogenomic Journal*, è stata svolta una meta-analisi sui dati raccolti da tutti gli studi pubblicati sulla relazione tra i polimorfismi C677T e A1298C di MTHFR ed il rischio di recidiva in ALL.

I termini e le parole chiave utilizzate come ricerca erano le seguenti: "ALL e recidive e polimorfismi (varianti)" e "MTHFR e ALL e recidive". Gli studi dovevano avere le seguenti caratteristiche per essere considerati nell'analisi successiva: 1) essere studi di associazione indipendente con scopo l'analisi della relazione tra i polimorfismi C677T e A1298C e il rischio di recidiva di ALL; 2) provvedere dati sufficienti sul rapporto genotipo e recidiva o informazioni sufficienti per il suo calcolo; 3) avere un disegno retrospettivo ed includere una popolazione di pazienti ALL. Nell'analisi finale è stato utilizzato un modello genetico recessivo per i polimorfismi C677T (TT vs CC + CT) e A1298C (CC vs AA + AC), basato sulla maggioranza delle ricerche effettuate massimizzando così il numero degli studi inclusi.

Il rischio relativo (RR) di recidiva (con il corrispondente intervallo di confidenza al 95%) è stato calcolato utilizzando il metodo di Mantel-Haenszel con un modello ad effetti-misti per ovviare all'eterogeneità dei dati che indubbiamente esiste a causa della variazione intra ed inter-studio e produrre così un valore stimato maggiormente conservativo. La presenza di eterogeneità è stata valutata utilizzando la statistica Q di Cochran e quantificata con la statistica  $I^2$ , che è proporzionale al grado di eterogeneità. Inoltre è stata effettuata un'analisi di sensibilità escludendo gli studi quando era presente una netta eterogeneità.

Da un totale iniziale di 204 articoli selezionati gli autori hanno condotto l'analisi finale su soli 8 studi. L'esclusione degli studi è avvenuta a causa di: 26 articoli esclusi perché erano dei duplicati, 76 articoli esclusi perché non riportavano dati di associazione tra i polimorfismi e la recidiva in ALL, 70 articoli esclusi perché non avevano informazioni sui polimorfismi di MTHFR, 16 erano review e 8 non riportavano dati sufficienti per effettuare l'analisi. I dati essenziali sono infine stati estratti dagli 8 studi selezionati. Due di questi erano basati su una popolazione adulta e i rimanenti 6 su una popolazione pediatrica.

#### *Polimorfismi di MTHFR e rischio di recidiva in pazienti pediatrici con ALL*

La meta-analisi dei 6 studi è stata condotta su un totale di 1553 pazienti. L'analisi mostra come esista un rischio più alto, e statisticamente significativo, di recidiva in pazienti con il genotipo 677TT rispetto al genotipo CT o CC. Solo 3 studi avevano analizzato anche l'associazione con A1298C. L'analisi effettuata su 711 pazienti non ha mostrato alcuna associazione statisticamente significativa. Il valore  $I^2$  dimostra che non era presente eterogeneità negli studi analizzati.

#### *Polimorfismi di MTHFR e rischio di recidiva in pazienti adulti con ALL*

La meta-analisi dei 2 studi è stata condotta su un totale di 131 pazienti. Non è stata trovata alcuna associazione statisticamente significativo tra i polimorfismi C677T e A1298C ed il rischio di recidiva. Inoltre

era presente un'elevata eterogeneità tra gli studi nel confronto del polimorfismo C677T; tuttavia, l'inclusione di soli 2 studi preclude la possibilità di effettuare un'analisi di sensibilità.

#### *Polimorfismi di MTHFR e rischio di recidiva in tutti i pazienti con ALL*

La meta-analisi di tutti gli studi è stata condotta su un totale di 1684 pazienti. L'analisi mostra come esista un rischio più alto, e statisticamente significativo, di recidiva in pazienti con il genotipo 677TT rispetto al genotipo CT o CC. Il valore di  $I^2$  però ha rivelato come tra questi studi ci sia un grande livello di eterogeneità. L'analisi di sensibilità ha identificato ed escluso uno studio che è stato definito come outlier, riducendo così il livello di eterogeneità ma continuando a mantenere un'associazione statisticamente significativa per il polimorfismo in analisi. L'analisi del polimorfismo A1298C, effettuata su 842 pazienti, non ha mostrato alcuna associazione statisticamente significativa.

I risultati della presente meta-analisi dimostrano come i pazienti pediatrici con il genotipo 677TT abbiano un rischio maggiore di recidiva rispetto ai pazienti portatori degli altri genotipi. I pazienti portatori del genotipo 677TT hanno solo il 30% della normale attività enzimatica di MTHFR. La diminuita attività di MTHFR può contrastare, attraverso diversi meccanismi di azione, l'efficacia del MTX, facilitando la sintesi del DNA e diminuendo la sopravvivenza dei pazienti. Conclusioni simili possono essere tratte quando il fattore età viene rimosso dallo studio. Ciononostante, questa conclusione deve essere trattata con estrema cautela in quanto solo 2 degli 8 studi prendeva in analisi pazienti adulti, e di questi 1 è stato escluso perché definito *oulier* dopo analisi di sensibilità. Di conseguenza, è necessario un numero maggiore prima che conclusioni più accurate possano essere tratte.

Quest'analisi inoltre rivela che il polimorfismo A1298C non influenza il rischio di recidiva sia nei pazienti ALL pediatrici che adulti.

I risultati di questa meta-analisi indicano come il polimorfismo C677T sia un buon marker per il rischio di recidiva in pazienti pediatrici con ALL, suggerendo quindi un suo utilizzo nella pratica clinica per la prevenzione precoce di questo evento.

Il polimorfismo C677T di MTHFR è un buon marker per il rischio di recidiva in pazienti pediatrici con ALL; al contrario il polimorfismo A1298C di MTHFR non ha alcun effetto sul rischio di recidiva in ALL.

**Parole chiave:** MTHFR, MTX, ALL

#### **Riferimento bibliografico**

[He HR](#) et al. *Pharmacogenomics J* 2014 Mar 18. doi: 10.1038/tpj.2014.10.



**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](mailto:sif.informazione@sigr.it); [sif.farmacologia@sigr.it](mailto: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](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 Cargnin (Università del Piemonte Orientale) Dott.ssa Donatella Carretta (Università di Bologna) Dott.ssa Stefania Cheli (A. O. Polo Universitario "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 Sara Gagno (CRO Aviano) Dott.ssa Lucia Gozzo (Università di Catania) Dott.ssa Gloria Ravegnini (Università di Bologna) Dott.ssa Rossana Roncato (CRO Aviano) 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](mailto:webmaster@sifweb.org)

---

### **DISCLAIMER – Leggere attentamente**

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

---

### **RICEZIONE NEWSLETTER**

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