

**Newsletter Numero 65 – Settembre 2014**

---

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

---

**Sommario****Oncologia**

- Un polimorfismo a singolo nucleotide nel gene SLC7A5 è associato alla tossicità gastrointestinale indotta dal trattamento con melfalan ad alto dosaggio e trapianto autologo di cellule staminali in pazienti affetti da mieloma multiplo
- Una variante missenso comune nel gene NUDT15 conferisce suscettibilità alla leucopenia indotta da tiopurina
- Polimorfismi a singolo nucleotide nel *pathway* di VEGF e *outcome* di pazienti trattati con chemioterapia citotossica combinata con bevacizumab per cancro colon-rettale avanzato
- Saggi della tiopurina metiltransferasi per una somministrazione sicura ed efficace dei farmaci tiopurinici: una revisione sistematica delle linee guida cliniche
- DNA tumorale circolante come metodo innovativo per la determinazione delle mutazioni di EGFR in pazienti caucasici affetti da NSCLC in trattamento con gefitinib

**⇒ Infettivologia**

- Il polimorfismo CYP2B6 C.983T>C è associato con l'ipersensibilità da nevirapina in pazienti del Malawi e dell'Uganda con infezione da HIV

**⇒ Neurologia**

- Associazioni farmacogenetiche del gene per il recettore metabotropico per il glutammato di tipo 3 (*GRM3*) con la risposta agli antipsicotici, in termini di *working memory* e sintomi clinici, nel primo episodio di schizofrenia
- Variazione nel gene *CYP3A43* associata con la risposta agli antipsicotici

**⇒ La metanalisi del mese**

- Analisi mutazionale estesa dei geni della famiglia RAS e beneficio sulla sopravvivenza in seguito a terapia con anticorpo monoclonale anti-EGFR in pazienti con cancro metastatico del colon-retto: meta-analisi di trial clinici randomizzati

---

**ONCOLOGIA**

## UN POLIMORFISMO A SINGOLO NUCLEOTIDE NEL GENE SLC7A5 È ASSOCIATO ALLA TOSSICITÀ GASTROINTESTINALE INDOTTA DAL TRATTAMENTO CON MELFALAN AD ALTO DOSAGGIO E TRAPIANTO AUTOLOGO DI CELLULE STAMINALI IN PAZIENTI AFFETTI DA MIELOMA MULTIPLO

A cura della Dott.ssa Sarah Carginin

Il melfalan è un chemioterapico alchilante largamente utilizzato nella terapia farmacologica del mieloma multiplo. Quando somministrato ad alte dosi, il melfalan induce gastrotossicità, che si manifesta principalmente con sintomi quali anoressia, nausea, vomito, diarrea e mucositi orali. Dalla pratica clinica emerge un'estrema variabilità individuale nella frequenza e nell'intensità di tali reazioni avverse gastrointestinali. Essendo melfalan una molecola ad alta affinità di legame per i trasportatori di amminoacidi neutri di tipo 1 (LAT1) e 2 (LAT2), è stato ipotizzato che alterazioni a livello di tali trasportatori potessero essere associate all'insorgenza di gastrotossicità indotta da melfalan. Nello specifico, obiettivo dello studio è stato quello di indagare la potenziale correlazione tra alcune varianti di geni codificanti per le unità catalitiche dei trasportatori LAT1 e LAT2, rispettivamente SLC7A5 e SLC7A8, ed il manifestarsi di gastrotossicità in pazienti affetti da mieloma multiplo e sottoposti alla terapia con melfalan ad alto dosaggio seguita da trapianto autologo di cellule staminali.

Lo studio è stato condotto su 135 pazienti di etnia caucasica (di cui 95 di sesso maschile) in trattamento con melfalan ad alte dosi e sottoposti a trapianto autologo di cellule staminali per la terapia del mieloma multiplo. La dose totale di melfalan ( $140 \text{ mg/m}^2$  o  $200 \text{ mg/m}^2$ ) è stata suddivisa in due dosi somministrate per via endovenosa, rispettivamente 3 e 2 giorni prima del trapianto autologo di cellule staminali. La presenza di tossicità gastrointestinale severa indotta da melfalan è stata identificata dalla necessità di procedere con la somministrazione di nutrizione parenterale totale. L'effettuazione di tale intervento sul paziente rappresenta un ottimo *tool* per l'individuazione dell'insorgenza di gastrotossicità indotta da melfalan, in quanto indipendente dallo specifico sintomo gastrointestinale manifestato dal paziente. Pertanto, sono stati definiti *casi* (N=75) i pazienti che avevano ricevuto la nutrizione parenterale completa mentre sono stati considerati *controlli* (N=60) coloro che non l'avevano ricevuta. Il DNA è stato estratto da campioni di sangue periferico ed è stato genotipizzato per 32 polimorfismi dei geni SLC7A5 e SLC7A8 tramite Sequenom MASSarray system.

La proporzione di soggetti di sesso femminile risulta essere significativamente maggiore nei *casi* rispetto a quella riscontrata nei *controlli* (42.7% vs 13.33%;  $P=0.00002$ ). Dei 32 SNPs genotipizzati, 27 hanno superato il controllo di qualità senza deviare dall'equilibrio di Hardy-Weinberg. Unicamente lo SNP SLC7A5 rs4240803 risulta essere significativamente correlato alla somministrazione di nutrizione parenterale totale (e quindi alla gastrotossicità indotta da melfalan), sia nell'analisi di associazione allelica ( $P=0.0064$ ) che genotipica ( $P=0.0178$ ). Dopo correzione per test multipli (false discovery rate) tale correlazione si conferma statisticamente significativa solo nell'analisi di associazione allelica. Al contrario, nessuno degli SNPs analizzati del gene SLC7A8 risulta essere associato all'insorgenza di gastrotossicità indotta da melfalan. Restringendo l'analisi ai soggetti di sesso maschile, che rappresentano il 70.4% dei pazienti in esame, si riconferma l'associazione tra la variante SLC7A5 rs4240803 e l'insorgenza di gastrotossicità (associazione allelica:  $P=0.011$ ; associazione genotipica:  $P=0.023$ ). Inoltre, dall'analisi di associazione genotipica ristretta ai soggetti di sesso maschile, emergono ulteriori due SNPs del gene SLC7A8 (rs1884545 e rs1015089) come varianti genetiche significativamente associate alla gastrotossicità (rispettivamente:  $P=0.021$ ,  $P=0.049$ ). Infine, l'analisi di regressione logistica univariata conferma l'associazione tra la variante SLC7A5 rs4240803 e l'insorgenza di gastrotossicità, sia nell'intera coorte in studio (OR: 0.45, 95% CI: 0.25-0.79;  $P=0.007$ ) che nel sottogruppo dei pazienti di sesso maschile (OR: 0.40, 95% CI: 0.19-0.80;  $P=0.011$ ).

Il danno gastrointestinale rappresenta, dopo la mielosoppressione, la tossicità più frequente nei pazienti affetti da mieloma multiplo in trattamento con melfalan e trapianto autologo di cellule staminali. In questo contesto clinico, lo sviluppo di mucositi nel tratto gastrointestinale si traduce nella necessità di nutrizione parenterale totale, nell'aumento del rischio di infezioni, in una prolungata ospedalizzazione ed in un maggior rischio di mortalità. La necessità di nutrizione parenterale totale è stata ivi considerata *endpoint* primario dello studio, in quanto proxy dell'instaurarsi di gastrotossicità indotta da melfalan. Tale scelta trova riscontro nel fatto che questo tipo di intervento sul paziente si rende necessario a fronte di qualunque sia la

localizzazione del danno farmaco-indotto a livello del tratto gastrointestinale. Inoltre, trattandosi di uno studio condotto in quattro diverse unità di trapianto afferenti a due distinti centri medici, la rilevazione di tale *endpoint* evita il verificarsi di potenziali bias nella valutazione dei sintomi di gastrotossicità effettuata tramite l'impiego di scale formali specifiche per le mucositi.

I risultati emersi dall'analisi di associazione supportano il ruolo di LAT1 come trasportatore di melfalan all'interno dell'ambiente cellulare. La proteina LAT1 risulta essere espressa a livello delle cellule endoteliali della barriera ematoencefalica e dei tessuti intestinali. Tale localizzazione rende plausibile l'ipotesi che il trasporto di melfalan in questi distretti influisca sul manifestarsi di sintomi tipici della gastrotossicità indotta da melfalan, quali, ad esempio, nausea ed anoressia. La variante rs4240803, risultata associata alla gastrotossicità indotta da melfalan, è localizzata nel primo introne del gene SLC7A5, in prossimità di una regione *enhancer* di trascrizione del gene. È quindi possibile che, la variante come tale, o un polimorfismo in *linkage disequilibrium* con essa, alteri il legame di un fattore di trascrizione alla regione *enhancer*, impattando sulla trascrizione del gene SLC7A5, sull'espressione del trasportatore da esso codificato o sulla sua capacità di trasporto del farmaco all'interno della cellula. Al fine di validare i risultati ottenuti, è attualmente in corso un ulteriore studio prospettico finalizzato ad analizzare in maniera sistematica le sequenze introniche *enhancer* del gene SLC7A5.

La variante SLC7A5 rs4240803 è associata all'insorgenza di gastrotossicità indotta dalla terapia con alte dosi di melfalan e trapianto autologo di cellule staminali in pazienti affetti da mieloma multiplo.

**Parole chiave:** melfalan, mieloma multiplo, SLC7A5

#### Riferimento bibliografico

[Giglia JL](#) et al. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014, 20(7):1014-20

## UNA VARIANTE MISSENSO COMUNE NEL GENE NUDT15 CONFERISCE SUSCETTIBILITÀ ALLA LEUCOPENIA INDOTTA DA TIOPURINA

A cura della Dott.ssa Stefania Cheli

L'azatioprina (AZA) e il suo derivato 6-mercaptopurina (6-MP) sono tiopurine ampiamente utilizzate nel trattamento di pazienti con tumori, trapianto d'organo, e malattie autoimmuni o infiammatorie tra cui le malattie infiammatorie intestinali (IBD). La leucopenia associata al trattamento con tiopurine costituisce un rischio considerevole che si verifica in circa il 5% dei soggetti di discendenza europea con IBD. È nota l'associazione tra la leucopenia indotta da tiopurina e le mutazioni nell'enzima TPMT ed il test della TPMT, prima dell'esposizione a tiopurina, è difatti raccomandato dalla US Food and Drug Administration (FDA). Tuttavia, solo un quarto dei soggetti con IBD, che mostrano leucopenia associata a tiopurina, presenta una mutazione della TPMT, suggerendo l'esistenza di fattori addizionali oltre a mettere in discussione l'utilità del pre-test della TPMT. Curiosamente, anche se la frequenza di mutazioni nella TPMT è più bassa negli asiatici rispetto agli individui di origine europea (~3% rispetto a ~10%), la frequenza con cui si verifica la leucopenia negli asiatici è notevolmente superiore. La leucopenia (definita dalla conta dei globuli bianchi, WBC < 3.000 cellule/mm<sup>3</sup>) è stata osservata nel 31,2% e nel 39,6% degli individui coreani con malattia di Crohn a dosi medie di AZA di 1,34 e 1,80 mg/kg/die, rispettivamente. In questo lavoro è stata condotta un'analisi di associazione su un singolo centro di popolazione coreana con malattia di Crohn per identificare le variazioni genetiche aggiuntive associate a leucopenia indotta da tiopurina.

Su un totale di 1.191 casi coreani di malattia di Crohn trattati con tiopurine, 978 sono stati inclusi nel presente studio. Dei 978 soggetti considerati, 66 hanno sviluppato leucopenia entro 8 settimane dall'inizio della terapia (casi di leucopenia precoce). Altri 280 casi hanno avuto un'esperienza di leucopenia dopo le prime 8 settimane (casi di leucopenia tardiva), i rimanenti 632 soggetti non hanno avuto leucopenia, nonostante l'esposizione ad AZA  $\geq$  1mg/kg/die per  $\geq$  8 settimane (controlli). Tutte le analisi di associazione sono state eseguite mediante regressione logistica con un modello additivo per l'ereditarietà utilizzando il tool statistico PLINK versione 1.07. Al fine di valutare la significatività complessiva delle associazioni rilevate e il potenziale impatto della stratificazione della popolazione è stato generato il grafico quantile-

quantile utilizzando R versione 2.13.1. Il Manhattan  $P$  values $-\log_{10}$  è stato generato usando Haploview versione 4.2. L'analisi di replicazione è stata effettuata mediante analisi separata di follow-up di tutti i campioni, seguita da un'analisi combinata di tutti i casi e i controlli. L'analisi di associazione dei campioni combinati è stata eseguita mediante test di Cochran-Mantel-Haenszel stratificato. Il metodo di Breslow-Day è stato utilizzato per verificare l'eterogeneità degli OR stimati tra i campioni rilevati e quelli di validazione. È stata testata l'indipendenza delle associazioni multiple osservate all'interno della regione cromosomica 13q14 SUCLA2-NUDT15-MED4 mediante analisi di regressione logistica condizionale. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando SPSS per Windows, versione 18.0. Inoltre, sono stati utilizzati dati di ImmunoChip da 504 pazienti con malattia di Crohn provenienti da una ricerca che includeva la genotipizzazione di 726 casi di malattia di Crohn e 469 controlli sani (S.-KY, MH, HC, WZ & Y.J. et al., dati non pubblicati). I restanti 222 casi non sono stati inclusi poiché non hanno ricevuto sufficiente ( $n=112$ ) o alcuna ( $n=110$ ) terapia con tiopurina. La prima analisi si è concentrata sulla leucopenia precoce e ha considerato 33 casi e 307 controlli. L'ImmunoChip comprende 196.524 varianti genetiche in loci di suscettibilità genetica, precedentemente associati ad un rischio per le malattie autoimmuni o infiammatorie o in altre regioni fortemente associate. Come parte del controllo di qualità sono stati esclusi gli SNPs che avevano un successo di genotipizzazione inferiore al 90%, ed una frequenza dell'allele minore (MAF)  $<0,01$  ed una deviazione significativa dall'equilibrio di Hardy-Weinberg ( $P < 2,5 \times 10^{-7}$ ). Per l'analisi di replicazione 10 SNPs selezionati, sono stati genotipizzati mediante sonde TaqMan in altri 33 casi e 325 controlli. I polimorfismi più significativi sono stati replicati in 280 casi di leucopenia tardiva e 632 controlli estratti dalle analisi di "discovery" e di replicazione.

Quattro polimorfismi sono risultati associati alla leucopenia ad un  $P < 1 \times 10^{-5}$ : rs9843344 (3p25.1, FBLN2), rs1986731 (6p22.3, CMAHP pseudogene), rs2945770 (8q24.22, ST3GAL1) e rs17109616 (14q31.1, NRXN3). Inoltre, è stata identificata un'associazione interessante con il gene TPMT (rs1142345, TPMT\*3C) (OR=7.11,  $P=1.61 \times 10^{-4}$ ). Allo scopo di aumentare la copertura delle varianti genetiche, è stata effettuata un'ulteriore analisi di 436.011 SNPs aggiuntivi e sono stati identificati 4 loci supplementari di associazione ad un  $P < 1 \times 10^{-5}$  (1q32, 8q22, 13q14 e 14q31). Solo la regione 13q14 SUCLA2-NUDT15-MED4 ha mostrato associazioni *genome-wide* significative ( $P < 5 \times 10^{-8}$ ) (rs79076357, rs116855232, rs142829497 e rs73481212), con una maggiore significatività per rs142829497 (OR=24.2,  $P=2.36 \times 10^{-23}$ ). Un SNP in ognuno degli otto loci identificati con un  $P < 1 \times 10^{-5}$ , così come il polimorfismo rs116855232 che causa una sostituzione aminoacidica in posizione 139 della proteina (arginina basica in cisteina polare) codificata da NUDT15 e il polimorfismo rs1142345 nel gene TPMT, sono stati scelti per lo studio di replicazione in ulteriori 33 casi indipendenti di leucopenia precoce e 325 controlli. Dato che il saggio per SNP rs142829497 non è riuscito, è stato analizzato il polimorfismo rs73481212 in completo *linkage disequilibrium* (LD) con rs142829497;  $r^2=1.00$ ). Due SNPs all'interno della regione SUCLA2-NUDT15-MED4 del 13q14 sono stati replicati raggiungendo associazioni *genome-wide* significative. Il polimorfismo non sinonimo, rs116855232 (codificante per p.Arg139Cys), ha mostrato un'associazione più significativa e più forte con la leucopenia precoce nell'analisi combinata di "discovery" (ImmunoChip) e di replicazione (OR=35.6;  $P_{\text{combined}}=4.88 \times 10^{-94}$ ). L'altro SNP, rs73481212, è stato trovato in forte LD con rs116855232 ( $r^2=0.93$ ). Anche l'allele TPMT\*3C (rs1142345) ha mostrato una forte associazione con la leucopenia precoce nel campione di replicazione ( $P < 0.05$ ), ma non raggiunge la significatività *genome-wide* nell'analisi combinata ( $P_{\text{combined}}=2.95 \times 10^{-5}$ ). Infine, utilizzando gli stessi criteri per leucopenia, gli autori hanno trovato che l'allele NUDT15 codificante per p.Arg139Cys (la frequenza complessiva dell'allele negli individui di discendenza europea è di  $\sim 0.004$ ) era significativamente associato con leucopenia indotta da tiopurina in una coorte IBD statunitense di 1.188 soggetti *wild-type* per la TPMT (la frequenza dell'allele è risultata del 2,74% nei casi di leucopenia rispetto a 0,31% senza leucopenia nei casi IBD trattati con tiopurine; OR=9.50;  $p=4,64 \times 10^{-4}$ ). Combinando i campioni coreani di "discovery" e di replicazione l'allele NUDT15 è stato identificato nel 89,4% (59/66) dei casi di leucopenia precoce e solo nel 6,8% (43/632) dei controlli, indicando che la presenza di quest'allele ha una sensibilità del 89,4% (59/66) e una specificità del 93,2% (589/632) per la leucopenia precoce, con un'area sotto la curva (AUC) del valore di 0,92. Ipotizzando che nella popolazione coreana la prevalenza della leucopenia precoce sia del 7% (66/978), dovrebbero essere testati 16 casi per evitare 1 caso di leucopenia precoce. I soggetti portatori di una copia dell'allele NUDT15 hanno mostrato un rischio maggiore di 88 volte (eterozigote OR) di sviluppare leucopenia precoce indotta da tiopurina rispetto ai non portatori e nessun controllo era omozigote per l'allele di rischio. Inoltre, è stato osservato che, ad un aumento del numero di copie dell'allele di rischio NUDT15 corrispondeva una diminuzione della dose di

tiopurine in cui si verificava la leucopenia, una diminuzione dell'intervallo tra l'inizio della terapia e lo sviluppo di leucopenia e un grado maggiore di quest'ultima.

Complessivamente questi dati suggeriscono un effetto gene-dose dell'allele di rischio NUDT15 nello sviluppo di leucopenia associata a tiopurina. Al contrario, le varianti TPMT hanno mostrato solo una moderata associazione con la leucopenia precoce. In questo studio, le mutazioni TPMT sono state trovate solo nel 3,8% (13/346) dei casi coreani di malattia di Crohn con leucopenia associata a tiopurina, in accordo con i dati pubblicati, e con una frequenza molto più bassa del ~25% riportata nei casi IBD di discendenza europea. Inoltre, se si escludono dall'analisi i 9 casi che presentano entrambi gli alleli di rischio, TPMT\*3C e NUDT15, solo il 1,2% (4/346) dei casi di malattia di Crohn coreana che hanno avuto leucopenia durante la terapia con tiopurina presentava mutazioni della TPMT. Questi risultati suggeriscono che la genotipizzazione della TPMT prima di iniziare la terapia con tiopurina ha un utilizzo limitato alla popolazione asiatica. Tuttavia, la pratica clinica attuale in Corea prevede di iniziare il trattamento con tiopurine ad una dose bassa e di titolarla gradualmente in base alla risposta per ridurre al minimo gli eventi avversi. Questa pratica può aver portato ad una sottostima degli effetti di entrambe le varianti, TPMT e NUDT15. L'allele di rischio NUDT15 è molto più comune negli asiatici rispetto agli individui di origine europea, con frequenze alleliche riportate del 10,4% nei coreani, 7% nei giapponesi, 13% nei cinesi e del 2% in una popolazione americana mista. Quest'allele di rischio è presente negli individui di discendenza europea ma ad una frequenza molto bassa; tuttavia, gli individui di origine europea portatori dell'allele presentano un rischio significativo di leucopenia durante la terapia con tiopurina.

La variante NUDT15 p.Arg139Cys è associata ad un aumento del rischio di leucopenia indotta da tiopurina in diverse popolazioni. I risultati dello studio possono spiegare la maggiore prevalenza di tale effetto avverso nella popolazione asiatica, nonostante una minore prevalenza di mutazioni nella TPMT.

**Parole chiave:** tiopurine, azatioprina, leucopenia, TPMT, NUDT15

#### Riferimento bibliografico

[Yang SK](#) et al. *Nat Genet* 2014, 46(9):1017-20

## **POLIMORFISMI A SINGOLO NUCLEOTIDE NEL *PATHWAY* DI VEGF E *OUTCOME* DI PAZIENTI TRATTATI CON CHEMIOTERAPIA CITOTOSSICA COMBINATA CON BEVACIZUMAB PER CANCRO COLON-RETTALE AVANZATO**

*A cura della Dott.ssa Gloria Ravegnini*

Bevacizumab, un anticorpo monoclonale umanizzato, lega VEGF prevenendo il legame al recettore e la cascata di segnale associata all'angiogenesi. L'*overall survival* (OS) di pazienti affetti da cancro colon-rettale (CRC) in stadio avanzato è stata notevolmente implementata negli ultimi decenni e le recenti terapie a bersaglio molecolare hanno prolungato la sopravvivenza fin sopra ai 24 mesi. Sebbene la combinazione di agenti antiangiogenici con chemioterapici citotossici comporti un prolungamento dell'OS, tuttavia i benefici variano notevolmente da paziente a paziente. Ciò potrebbe essere dovuto alla presenza di polimorfismi a singolo nucleotide che avrebbero effetti sulla regolazione dell'espressione genica o sulla funzione delle proteine codificate. Ad oggi, la maggior parte degli studi di farmacogenetica sul CRC sono stati condotti su pazienti in stadio iniziale mentre solo raramente su individui in stadio avanzato. Attualmente bevacizumab in combinazione con agenti citotossici rappresenta il trattamento standard per CRC metastatico, tuttavia pochi studi hanno riportato un'associazione tra SNPs della via di VEGF e *outcome* clinico. Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare una possibile associazione tra SNPs in geni del *pathway* dell'angiogenesi e *outcome* clinico, in pazienti con cancro colon-rettale metastatico o di ricaduta in trattamento con chemioterapia citotossica combinata con bevacizumab.

Nell'analisi sono stati arruolati un totale di 125 pazienti coreani e il DNA è stato genotipizzato per un pannello di 16 SNPs in 7 geni: VEGFA rs699947, rs833061, rs1570360, rs2010963, rs3025039 – VEGFR1 rs9513070, rs9554316, rs9554320, rs9582036 – VEGFR2 rs1531289, rs2305948, rs1870377 – IL8 rs4073 – IL10 rs1800896 – CXCR2 rs2230054 – COL18A1 rs12483377. Dei 125 individui, 27 erano in trattamento

con chemioterapia basata sull'irinotecano + bevacizumab e 98 con chemioterapia basata sull'oxaliplatino + bevacizumab; al momento della raccolta dei dati, la durata media del periodo di follow-up era stata di 20.2 mesi, con 113 progressioni (90.4%) e 97 morti (77.6%). Un paziente è stato escluso per morte antecedente alla valutazione della risposta. Nei rimanenti 124, il tasso di risposta oggettiva (ORR) è stato del 62.9% (risposta completa, CR, n=4; risposta parziale, PR, n=74), il tasso di controllo della malattia dell'87% (CR=4, PR=74, malattia stabile (SD) = 31), mentre 15 sono andati in progressione. La PFS media (*progression free survival*) è stata di 7.6 mesi [95% CI 6.67-8.53] mentre l'OS media di 20.8 mesi [95% CI 15.45-26.15]. Il grado istologico ha mostrato un'associazione con ORR [ben differenziate (WD) + moderatamente differenziate (MD) vs scarsamente differenziate (PD): 67.6 vs 35.7%; p=0.035], PFS (WD+MD vs PD: 8.2 vs 5.1 mesi; p=0.014) e OS (WD+MD vs PD: 24.7 vs 12.5 mesi; p=0.001); inoltre ORR aveva mostrato un'associazione sia con PFS (CR+PR vs.SD+*progressive disease*: 10.1 vs. 4.9 mesi; p<0.0001) sia con OS (CR+PR vs.SD+*progressive disease*: 27.6 vs.15.4 mesi; p<0.0001).

Il genotipo è stato determinato con successo nel 99.2% dei casi. FLT1 rs9554316 e COL18A1 rs12483377 sono stati esclusi dalle analisi per MAF di 0.4% mentre VEGFA rs699947 e CXCR2 rs2230054 perché non rispettavano l'equilibrio di HW. Il genotipo TT per VEGFA rs3025039 (n=5) è stato rilevato più frequentemente negli adenocarcinoma poco differenziati rispetto agli altri tipi istologici (WD+MD vs PD: 1.9% vs. 21.4%; p=0.012); nessun altro SNP ha mostrato associazione significativa con le caratteristiche cliniche. Il genotipo VEGFA rs833061 TT era significativamente associato con una superiore ORR comparato con i genotipi alternativi (p=0.004); la significatività è stata mantenuta nell'analisi multivariata con il grado istologico (VEGFA rs833061 TT vs. TC+CC; p =0.08). FLT1 rs9513070 AA ha mostrato una PFS superiore rispetto ai genotipi alternativi (p=0.001), risultato confermato mediante analisi multivariata con grado istologico e numero di siti metastatici (FLT1 rs9513070 AA vs. GA+GG; p=0.001). Lo stesso SNP di FLT1 ha mostrato un'ulteriore associazione con OS: individui portatori del genotipo AA avevano un OS maggiore se comparati con i portatori di GA o GG (p=0.006); il risultato rimaneva significativo anche nell'analisi multivariata con grado istologico e numero di siti metastatici [HR 0.637; 95%CI 0.416-0.975, p=0.038].

Per quanto riguarda gli aplotipi di VEGFA rs833061/ rs15703607/ rs2010963/ rs3025039, TGCC (24%), TGCT (12.4%), TGGC (21.2%) e CAGC (18.0%), sono stati identificati nel 75.6% dei casi del totale del pool degli aplotipi possibili; Nessuno dei 4 aplotipi ha mostrato una differenza in ORR, PFS ed OS; solo i pazienti che avevano un aplotipo non-CAGC mostravano un trend verso una migliore ORR, paragonati con quelli che possedevano 1 o 2 copie di CAGC (n=83 vs. 41; 68.5% vs. 48.6%; p=0.076).

Per quanto riguarda gli aplotipi di FLT1 rs9513070/ rs9554320/ rs9582036, ACA (55.2%), GCA (19.2%), AAC (18.0%), sono stati identificati nel 97.2% sul totale del pool di aplotipi. In un'analisi univariata, l'aplotipo GCA ha mostrato un'associazione con PFS (p=0.002): gli individui con 1 o 2 copie di GCA (n=45) avevano una PFS media inferiore a 6.6 mesi, mentre quelli privi di copie (n=80) superiore a 8.6 mesi. Nell'analisi multivariata con grado istologico, numero di siti metastatici e con gli altri aplotipi di FLT1, la presenza di GCA era ancora associata in modo significativo con la PFS [HR 1.822; 95% CI 1.214-2.734, p=0.004]. Inoltre, la presenza di tale aplotipo risultava in un OS media inferiore a 16.1 mesi, mentre pazienti con un aplotipo diverso avevano un OS superiore a 25.4 mesi (p=0.011); nell'analisi multivariata con grado istologico, numero di siti metastatici e con gli altri aplotipi, GCA è rimasto un predittore significativo di OS [HR 2.862; 95%CI 1.043-7.853, p=0.041]. Per quanto riguarda gli aplotipi di KDR rs15312897 rs23059487 rs1870377, GCT (40.4%), GCA (31.6%), ACT (16.0%), e GTA (10.4%), sono stati identificati nel 98.4% sul totale degli aplotipi possibili. Nessuno è risultato associato con ORR, OS o PFS.

Questo è il primo studio che ha investigato l'associazione tra SNPs nella via di VEGF ed *outcome* in pazienti asiatici con cancro colon-rettale e trattati con bevacizumab + chemioterapia citotossica. Dall'analisi è emerso che il polimorfismo di VEGFA rs833061 era associato con ORR, e che FLT1 rs9513070 e l'aplotipo GCA erano entrambi associati con PFS e OS. In questo contesto, tali risultati suggeriscono che VEGFA rs833061 e FLT1rs9513070 potrebbero essere biomarkers genetici per la terapia antiangiogenica. Nell'era di bevacizumab, studi precedenti che avevano dimostrato un legame tra SNPs di VEGFA e outcome di pazienti nel cancro ovarico e nel cancro al seno (Schultheis AM et al. *Clin Cancer Res* 2008, 14:7554-63; Schneider BP et al. *J Clin Oncol* 2008, 26: 4672-78). Tuttavia tale associazione non è consistente in diversi tipi tumorali e rimane non del tutto chiarita. Al contrario, i risultati sono consistenti con gli studi che dimostrano l'associazione tra polimorfismi di FLT1 e sopravvivenza. Lambrechts e colleghi (*EJC Supplements*

2009;7:10) dimostrarono che in pazienti con cancro pancreatico, trattati con bevacizumab +chemioterapia citotossica, lo SNP rs9582036 era associato significativamente con OS; lo stesso SNP risultava associato con tasso di risposta nel CRC nel lavoro di Hansen et al. (*Int J Colorectal Dis* 2012, 27:715-20). Tuttavia nello studio qui descritto, il polimorfismo significativamente associato con la sopravvivenza non era rs9582036 ma rs951370. Nell'analisi sono stati infine esclusi FLT1 rs9554316 e COL18A1 rs12483377 a causa di una MAF troppo bassa; essa è comunque in linea con quella di altre popolazioni asiatiche in NCBI e potrebbe quindi rappresentare un tratto distintivo di tale etnia. Non va dimenticato che un allele con un effetto importante sul fenotipo clinico e con varianti deleterie sulla sopravvivenza, per selezione negativa non potrà avere una frequenza allelica alta; ne consegue che l'investigazione degli SNPs rari non andrebbe ignorata.

In conclusione, con l'intento di identificare candidati come biomarkers genetici nell'era di bevacizumab, in questo studio sono stati identificati gli SNPs VEGFA rs833061 e FLT1 rs951370 in pazienti affetti da CRC metastatico e di ricaduta.

**Parole chiave:** cancro del colon-retto, chemioterapia citotossica+bevacizumab, VEGF *pathway*

#### Riferimento bibliografico

[Sohn BS](#) et al. *Oncology* 2014, 87(5):280-92

## SAGGI DELLA TIOPURINA METILTRANSFERASI PER UNA SOMMINISTRAZIONE SICURA ED EFFICACE DEI FARMACI TIOPURINICI: UNA REVISIONE SISTEMATICA DELLE LINEE GUIDA CLINICHE

*A cura delle Dott.sse Eva Cuzzoni e Raffaella Franca*

Nonostante l'aumentata disponibilità di test farmacogenetici, il loro uso nella pratica clinica è ancora limitato a causa della scarsa confidenza del personale medico con i test da scegliere e con l'interpretazione dei risultati conseguiti. Lo sviluppo di linee guide cliniche, redatte in modo rigoroso sulla base di evidenze scientifiche e protocolli di cura, è quindi necessario per orientare i medici verso un uso appropriato di questi saggi in modo da ottimizzare le terapie farmacologiche a priori. Il test farmacogenetico più noto è quello per la tiopurin-S-metiltransferasi (TPMT), un enzima coinvolto nel metabolismo dei farmaci tiopurinici (azatioprina (AZA); 6-mercaptopurina (6-MP) e 6-tioguanina (6-TG)). Le tiopurine sono usate come immunosoppressivi nel trattamento delle malattie infiammatorie intestinali (MICI), nell'epatite autoimmune, nell'artrite idiopatica e in diverse patologie dermatologiche; sono inoltre impiegate come chemioterapici nella terapia di mantenimento della leucemia linfoblastica acuta (LLA) e nella prevenzione del rigetto nel trapianto d'organi. Nei Caucasicci, circa l'89% della popolazione ha un'attività enzimatica di TPMT normale, l'11% è geneticamente eterozigote ed ha un'attività intermedia e lo 0,3% presenta varianti genetiche in omozigosi con conseguente perdita della proteina. Quando trattati con dosi standard di tiopurine, gli individui con un deficit enzimatico di TPMT rischiano di sviluppare delle tossicità severe (mielosoppressione, anemia, sanguinamento, leucopenia ed infezioni gravi), potenzialmente letali. La comparsa di questi eventi avversi comporta ricoveri e degenze ospedaliere prolungate, sostanziale morbidità e in generale un'ulteriore riduzione nella qualità di vita in soggetti che già soffrono di gravi malattie. E' quindi importante identificare lo stato di TPMT prima della somministrazione di questi farmaci. In caso contrario, i pazienti devono essere trattati inizialmente con dosaggi standard di tiopurine poi aggiustati sulla base degli effetti neutropenici indotti, seguendo una procedura quindi che ritarda il raggiungimento di una risposta terapeutica ottimale nei soggetti con un'attività di TPMT normale ed espone gli altri al rischio di gravi complicazioni. La valutazione dello stato di TPMT a priori consentirebbe quindi un'ottimizzazione più immediata e sicura dell'uso delle tiopurine, ma non servirebbe a prevenire del tutto i possibili effetti avversi né ad eliminare la necessità dei monitoraggi durante la terapia poiché non valuta eventuali difetti causati da carenze di altri enzimi chiave della stessa via metabolica. Lo stato di TPMT può essere valutato a livello di genotipo (caratterizzazione dei polimorfismi) oppure di fenotipo (misurazione dell'attività in vitro tramite quantificazione dei metaboliti prodotti dopo incubazione di un preparato contenente l'enzima con un suo substrato). Non è ancora chiaro quale approccio sia più appropriato dal momento che entrambi presentano dei limiti: i test genetici disponibili commercialmente caratterizzano solo i polimorfismi a singolo nucleotide

più frequenti e non tutte le varianti genetiche capaci di compromettere la funzionalità di TPMT; i risultati del saggio enzimatico possono invece essere alterati dall'assunzione contemporanea di altri farmaci o dalle trasfusioni di sangue a cui è stato sottoposto il paziente.

L'obiettivo dello studio di Burnett e collaboratori è stato quello di esaminare la letteratura in modo sistematico e critico, considerando gli articoli di stampo clinico (linee guida e protocolli di cura) che riportano dichiarazioni sull'impiego dei saggi per la caratterizzazione di TPMT prima della somministrazione dei farmaci tiopurinici, indipendentemente dal test considerato, dall'obiettivo finale dell'articolo, dalla malattia e dall'età dei pazienti. A tale scopo, usando alcune parole chiave per la ricerca come: "TPMT, tiopurinametiltransferasi, raccomandazione, consenso clinico e dichiarazione di consenso", sono stati identificati 370 documenti (pubblicati tra il 1980 e settembre 2012) nei database bibliografici "Medline", "Embase", e "CINAHL" nei cui titoli comparivano espressioni tipo "linee guida pratiche, protocolli clinici, 6-mercaptopurina, azatioprina e tioguanina". Dopo essere stati vagliati da un singolo revisore, gli articoli che non fornivano raccomandazioni a favore o contro l'uso dei test per TPMT (n=104), i protocolli di laboratorio (n=158) e i documenti non redatti in lingua inglese (n=88) sono stati esclusi. Solo 20 documenti sono risultati eleggibili per una successiva valutazione qualitativa. Di questi, 8 trattavano di MICI, 3 di disturbi infiammatori della pelle, 3 di epatite autoimmune, 2 di malattia reumatica, 2 di LLA e 2 trattavano i saggi farmacogenetici in generale; 6 di questi documenti si riferivano al trattamento di pazienti pediatrici. La valutazione qualitativa è stata condotta indipendentemente da 3 revisori utilizzando lo strumento AGREE (Appraisal of Guidelines for Research & Evaluation)-II (<http://www.agreetrust.org>; [http://www.gimbe.org/pubblicazioni/traduzioni/AGREE\\_IT.pdf](http://www.gimbe.org/pubblicazioni/traduzioni/AGREE_IT.pdf)), secondo cui ogni linea guida clinica viene valutata su 23 punti indipendenti tra loro raggruppabili in 6 categorie (1: ambiti di applicazione e finalità (tre voci); 2: coinvolgimento dei soggetti interessati (tre voci), 3: rigore metodologico (otto voci); 4: chiarezza espositiva (tre voci); 5: applicabilità (quattro voci) e 6: indipendenza editoriale (due voci)). Per ogni voce veniva assegnato un punteggio da 1-fortemente in disaccordo a 7-fortemente in accordo, per cui ad un punteggio più alto corrispondeva una valutazione qualitativa migliore dell'articolo su quel punto. Per le categorie, il punteggio veniva calcolato sommando i punteggi delle rispettive voci, esprimendo poi il totale come percentuale rispetto al massimo possibile (tutte le voci a 7). In questo modo i punteggi per categoria vengono standardizzati ed espressi da 0 (qualità peggiore) a 100 (qualità migliore). Infine, il punteggio complessivo dell'articolo veniva definito dalla media dei punteggi delle singole categorie. Il punteggio complessivo medio dei 20 documenti considerati è stato di 47,14 (range 10,42–78,59). Le migliori linee guida in termini di punteggio complessivo sono risultate quelle per la MICI redatte dall'Istituto Nazionale statunitense per la Salute e l'Eccellenza Clinica (NICE) nel 2012, per la MICI pediatrica redatte dall'Ospedale Pediatrico di Cincinnati (CCHMC) nel 2007 e per la reumatologia redatte dai Professionisti Sanitari inglesi in Reumatologia (BHPR) nel 2008 (78,6, 75,7 e 71,1 rispettivamente). Cinque documenti raccomandavano in modo esplicito la genotipizzazione di TPMT e 4 invece la caratterizzazione del fenotipo, ma generalmente non veniva specificato il tipo di saggio genetico o enzimatico da eseguire. Tra questi 9 documenti, le indicazioni fornite nel 2011 dall'Associazione inglese dei dermatologi (BAD) per le malattie infiammatorie dermatologiche, hanno avuto il miglior punteggio in termini di rigore metodologico (83,3). La categoria 3 è incentrata sulla qualità delle raccomandazioni su TPMT e nel caso specifico veniva raccomandata la genotipizzazione di TPMT solo nei pazienti con fenotipo intermedio o in quelli a cui era stata eseguita di recente una trasfusione di sangue. Tredici documenti fornivano indicazioni sulla posologia delle tiopurine rispetto allo stato di TPMT e, tra questi, 5 indicavano in modo esplicito le dosi o gli aggiustamenti percentuali da applicare. Per quanto riguarda l'AZA, i 5 articoli erano coerenti nei dosaggi proposti per ogni genotipo/fenotipo e concordi nell'evitare il farmaco in pazienti omozigoti o con attività estremamente bassa o assente di TPMT (ad eccezione delle linee guida del 2011 redatte dal Consorzio per l'implemento della Farmacogenetica Clinica (CPIC) che proponevano una dose iniziale 10 volte inferiore al normale con aggiustamento successivo sulla base della tolleranza al farmaco del paziente) e nel ridurre le dosi di circa il 30-50% nei pazienti eterozigoti o con attività intermedia. Per la 6-MP, si osservava una maggiore variabilità nelle posologie suggerite (3 documenti), con riduzioni dal 30 al 70% per le condizioni di TPMT intermedie ed indicazioni diverse a seconda della malattia per le carenze enzimatiche forti o totali (mancata prescrizione della 6-MP e scelta di una terapia farmacologica alternativa nei pazienti non oncologici; 10% della dose normale nei pazienti con neoplasie). Soltanto le linee guida CPIC 2011 proponevano i dosaggi per la 6-TG, con aggiustamenti paragonabili a quelli consigliati per la 6-MP.

Questo studio ha messo in evidenza che le linee guida riportate in letteratura sull'uso clinico dei test per la caratterizzazione dello stato di TPMT prima della somministrazione dei farmaci tiopurinici sono generalmente discordanti tra loro e riflettono la mancanza di chiare prove a sostegno della validità clinica e della scelta tra i vari test disponibili così come la mancanza di un forte rigore metodologico nell'elaborazione delle linee guida. Una collaborazione interdisciplinare tra gli esperti nel campo della genetica, della farmacologia e della medicina è necessaria per sviluppare linee guida consensuali affidabili.

**Parole chiave:** linee guida, tiopurine, TPMT

#### **Riferimento bibliografico**

[Burnett HF](#) et al. *Pharmacogenomics J* 2014 Aug 26 [Epub ahead of print]

## **DNA TUMORALE CIRCOLANTE COME METODO INNOVATIVO PER LA DETERMINAZIONE DELLE MUTAZIONI DI EGFR IN PAZIENTI CAUCASICI AFFETTI DA NSCLC IN TRATTAMENTO CON GEFITINIB**

*A cura delle Dott.sse Valentina Citi e Marzia Del Re*

L'analisi delle mutazioni a carico del recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) in pazienti affetti da tumore del polmone non a piccole cellule (NSCLC) ha consentito di individuare trattamenti mirati ed ottimali. Infatti, quei tumori che esprimono mutazioni attivanti dell'EGFR hanno un tasso di risposta molto elevato se trattati con inibitori di tirosin-chinasi, come gefitinib ed erlotinib. Tuttavia nella maggior parte dei casi dopo un periodo di risposta i pazienti vanno incontro a progressione di malattia, causata, molto spesso, dalla comparsa di mutazioni secondarie dell'EGFR associate a resistenza ad inibitori di tirosin-chinasi (es. T790M). Il tessuto tumorale è considerato il campione più idoneo per le analisi mutazionali, ma in alcuni casi (circa il 10-15%) non è possibile effettuare biopsie ed in questi pazienti la scelta della terapia su base molecolare diventa impossibile. Per questo motivo l'attenzione si è spostata sulla valutazione di altri tipi di campioni per l'analisi delle mutazioni di EGFR: in particolare negli ultimi anni l'utilizzo del DNA tumorale circolante (*cell free tumor DNA*, cftDNA) sta attirando l'attenzione sia per quanto riguarda la facilità di reperire il campione (ottenuto attraverso metodi molto meno invasivi rispetto alla biopsia in quanto le analisi vengono effettuate su plasma), sia per quanto riguarda la crescente affidabilità della metodologia.

Nello studio NCT01203917 pazienti affetti da NSCLC con delezioni dell'esone 19 ed L858R a carico di EGFR, trattati con gefitinib, viene confrontata l'analisi su tessuto tumorale e su plasma per determinare la concordanza delle mutazioni a carico di EGFR. Le analisi delle mutazioni attivanti per EGFR sono state effettuate alla diagnosi di malattia. Inoltre, per confermare la sensibilità e la riproducibilità dei risultati ottenuti con il DNA tumorale circolante i campioni di plasma dello stesso paziente sono stati analizzati in duplicato.

Lo studio presentato, a braccio singolo, di fase IV, con trattamento di prima linea con gefitinib 250 mg/die, ha arruolato 1060 pazienti caucasici affetti da NSCLC stadio IIIA/B/IV istologicamente confermato, con mutazioni di EGFR attivanti. I pazienti arruolati erano di età maggiore di 18 anni, con aspettativa di vita maggiore a 12 settimane, sia fumatori che non fumatori.

Sono stati quindi raccolti campioni di tessuto tumorale e due campioni di plasma (plasma 1 e 2) da ogni paziente all'inizio del trattamento per l'estrazione del DNA e la determinazione delle mutazioni su EGFR. L'estrazione del DNA tumorale circolante è stata effettuata utilizzando il kit Qiagen QIAmp Circulating Nucleic Acid (Qiagen), mentre il DNA dal tessuto tumorale è stato ottenuto con il kit Qiagen QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen). L'analisi delle mutazioni di EGFR è stata effettuata usando la tecnologia Scorpion Amplification Refractory Mutation System utilizzando il kit Therascreen EGFR RGQ PCR kit (Qiagen) in grado di determinare 29 mutazioni del gene EGFR.

Le mutazioni analizzate sia su tessuto, sia su DNA tumorale circolante sono state la delezione dell'esone 19 e le mutazioni puntiformi L858R e T790M; lo stato mutazionale di EGFR è stato definito positivo se il campione presentava una o più delle precedenti mutazioni, negativo se non era presente alcuna mutazione.

Di tutti i pazienti arruolati, i campioni di tessuto tumorale al basale disponibili per l'analisi mutazionale erano 1033, 118 positivi, con una frequenza di EGFR mutato pari al 13,7 %.

I campioni di plasma 1 disponibili erano 803 su 1060 (82 positivi con una frequenza del 10,5%). La concordanza tra i 652 campioni di tessuto e plasma 1 è stata del 94,3% (confrontando le singole mutazioni).

I campioni di plasma 2 disponibili erano 803 su 1060 (65 positivi con frequenza del 9,7%). La concordanza tra i duplicati di plasma 1 e plasma 2 e il dato da tessuto è stata del 96,9%.

La concordanza delle mutazioni tra il tessuto ed il plasma è risultata del 96,9%. Inoltre, i risultati sul cftDNA mostrano il 99,8% di specificità ed il 65,7% di sensibilità.

In conclusione, l'alta concordanza, la specificità e la sensibilità riportate in questo studio tra le analisi su tessuto tumorale e su DNA circolante per quanto riguarda le mutazioni a carico di EGFR, dimostrano che tali mutazioni possono essere accuratamente determinate usando il cftDNA come alternativa al tessuto laddove non fosse possibile effettuare una biopsia.

**Parole chiave:** DNA tumorale circolante, NSCLC, mutazioni, EGFR, gefitinib

#### Riferimento bibliografico

[Douillard JY](#) et al *J Thorac Oncol* 2014, 9(9):1345-53.

## INFETTIVOLOGIA

### IL POLIMORFISMO CYP2B6 C.983T>C È ASSOCIATO CON L'IPERSENSIBILITÀ DA NEVIRAPINA IN PAZIENTI DEL MALAWI E DELL'UGANDA CON INFEZIONE DA HIV

A cura della Dott.ssa Valeria Conti

La nevirapina (NVP) è un inibitore non-nucleosidico della trascrittasi inversa (NNRTI) utilizzato nella terapia dell'infezione da HIV e nell'AIDS. I pazienti che assumono questo farmaco sono esposti a un rischio dal 6 al 10% di sviluppare una reazione d'ipersensibilità (NVP-HSR). Tale reazione comprende numerosi fenotipi clinici come febbre, tossicità epatica e rash cutanei anche molto gravi, come la sindrome di Stevens-Johnson (SJS) e la necrolisi epidermica tossica (*toxic epidermal necrolysis*, TEN).

Il rischio di HSR associata alla nevirapina è più alto negli individui che iniziano una terapia con un'alta conta di linfociti CD4+. La NVP è metabolizzata prevalentemente dall'isoforma CYP2B6 dei citocromi, che è caratterizzata da un'ampia variabilità inter-individuale nell'espressione e attività enzimatica a livello del fegato. Recentemente, il polimorfismo c.516G>T del CYP2B6 è stato associato con le manifestazioni cutanee della NVP-HSR sia nelle popolazioni africane sia nelle caucasiche e tale associazione è più forte quando si combina con la variante allelica HLA-Cw\*04 del complesso maggiore d'istocompatibilità. Lo SNP c.516G>T è stato anche correlato alla neurotossicità indotta da NVP, ma non con l'epatotossicità.

Uno studio *in vitro* ha dimostrato che la variante CYP2B6\*18 identificata dallo SNP c.983T>C (rs28399499) comporta l'inattivazione dell'enzima CYP2B6, mentre altri polimorfismi, come il c.516G>T sarebbero responsabili solo di una riduzione dell'attività enzimatica (*Pharmacogenet Genom* 2010, 20: 459-62).

Nonostante l'utilizzo della NVP sia molto diffuso nelle popolazioni africane, gli effetti delle varianti polimorfiche nei geni che codificano per gli enzimi responsabili del metabolismo di questo farmaco non sono stati ancora sufficientemente studiati.

Lo scopo di questo studio è stato quello di determinare, in un'ampia coorte di pazienti del Malawi e dell'Uganda, se gli SNP c.516G>T e c.983T>C possano effettivamente predire le manifestazioni di ipersensibilità correlate alla NVP. Inoltre, gli autori hanno investigato sugli effetti della combinazione delle varianti HLA-C\*04:01 e di CYP2B6 per capire se tale assetto genetico possa aumentare il rischio di NVP-HSR.

Millecentodiciassette pazienti arruolati presso l'ospedale Queen Elizabeth Central Hospital (Blantyre, Malawi) sono stati inclusi nello studio prospettico nel momento in cui iniziavano una terapia antiretrovirale standard con stavudina, lamivudina e nevirapina e seguiti per sei mesi. Cinquantasette pazienti/1117 avevano sviluppato NPV-HSR. Inoltre, 149 pazienti con NVP-HSR sono stati arruolati nello stesso centro al momento della comparsa della reazione avversa al farmaco, indipendentemente dallo studio prospettico, e altri 28 sono stati identificati in maniera retrospettiva mediante lettura delle cartelle cliniche. I controlli inclusi nello studio erano pazienti in trattamento con NVP che durante i sei mesi di osservazione non avevano sviluppato nessun segno di ipersensibilità.

Per replicare i dati ottenuti nella coorte prospettica (*discovery cohort*) sono stati arruolati in maniera retrospettiva altri 24 individui del Malawi e 32 dell'Uganda con diverse manifestazioni fenotipiche di NVP-HSR. Questi ultimi pazienti hanno rappresentato la coorte di replicazione (*replication cohort*).

Il DNA è stato isolato da sangue intero mediante la procedura del *salting-out* e DNA sufficiente per le analisi di genotipizzazione è stato ottenuto da un totale di 672 pazienti della *discovery cohort* (463 controlli e 209 pazienti con NVP-HSR). Per quanto riguarda invece la *replication cohort*, il DNA sufficiente per le analisi è stato estratto dal 94% degli individui (per un totale di 29 controlli e 53 casi). Tutti i campioni sono stati genotipizzati per gli SNPs c.516G>T (CYP2B6\*9) e c.983T>C (CYP2B6\*18) mediante la tecnica *TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assays* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Il numero medio di linfociti T CD4+ nel gruppo di pazienti che aveva sviluppato eventi avversi era significativamente più elevato del numero rilevato nei pazienti di controllo tolleranti alla terapia (294 versus 174 cellule/mm<sup>3</sup>).

I pazienti con NVP-HSR sono stati distinti sulla base delle diverse manifestazioni cliniche di HSR come rash cutanei, febbre, tosse e disfunzione epatica, SJS e TEN.

La variante c.983C era significativamente associata con il rischio di manifestare le reazioni avverse gravi SJS/TEN, mentre la presenza della combinazione HLA-C\*04:01/c.983T>C non era associata con questo fenotipo.

In questo studio è stata trovata un'associazione tra il polimorfismo c.983T>C del gene CYP2B6 e la reazione d'ipersensibilità manifestata come SJS/TEN e tale associazione non è stata riscontrata con nessun altro fenotipo d'ipersensibilità.

Un dato interessante è l'identificazione di tre individui, tutti con fenotipo SJS/TEN, omozigoti per c.516T ed eterozigoti per c.983C e due individui, entrambi tolleranti alla terapia, eterozigoti per c.516G>T e omozigoti per c.983C. Tuttavia, la mancanza di un potere statistico adeguato non ha permesso di trarre conclusioni sull'eventuale ruolo di questi aplotipi nella determinazione del rischio di sviluppare una NVP-HSR di tipo SJS/TEN.

Il numero delle cellule T CD4+ era correlato al rischio di NVP-HSR come già evidenziato in studi precedenti. La ragione di tale correlazione va ricercata nel fatto che in un paziente HIV positivo in trattamento con nevirapina è necessario che si attivi, anche se parzialmente, il sistema immunitario. Per questa ragione sarebbe stato prevedibile trovare un'associazione tra l'assetto genetico HLA-C\*04:01/c.983T>C e il fenotipo d'ipersensibilità SJS/TEN, che, tuttavia, non è stata rilevata, probabilmente anche in questo caso, per la mancanza di potere statistico.

Una limitazione di questo studio è il numero d'individui arruolati nella *replication cohort*, sensibilmente inferiore al numero di quelli arruolati nella *discovery cohort*. A causa di questa differenza numerica il risultato dell'associazione tra lo SNP e la NVP-HSR con fenotipo SJS/TEN non è stata confermata nella coorte di replicazione.

In conclusione, questo studio mostra un'associazione tra il polimorfismo CYP2B6 c.983T.C e la reazione d'ipersensibilità alla nevirapina manifestata clinicamente con la sindrome di Stevens Johnson e necrolisi epidermica tossica. Tale polimorfismo si presenta con una frequenza del 5-10% in diverse popolazioni africane, ma non è stato ritrovato nei caucasici, suggerendo che tale variante rappresenti un fattore di predisposizione strettamente dipendente dall'origine etnica del paziente portatore.

**Parole chiave:** nevirapina, reazione d'ipersensibilità, CYP2B6, sindrome di Stevens Johnson, necrolisi epidermica tossica

**Riferimento bibliografico:**

[Carr DF](#) et al. *J Antimicrob Chemother.* 2014 Aug 20 [Epub ahead of print]

**NEUROLOGIA****ASSOCIAZIONI FARMACOGENETICHE DEL GENE PER IL RECETTORE METABOTROPICO PER IL GLUTAMMATO DI TIPO 3 (GRM3) CON LA RISPOSTA AGLI ANTIPSICOTICI, IN TERMINI DI WORKING MEMORY E SINTOMI CLINICI, NEL PRIMO EPISODIO DI SCHIZOFRENIA**

A cura della Dott.ssa Donatella Carretta

Gli antipsicotici, farmaci di prima scelta nella terapia della schizofrenia, hanno effetti variabili in termini di efficacia clinica, tollerabilità ed effetti sulle funzioni cognitive dei pazienti. Gli studi farmacogenetici sulla schizofrenia sono spesso compromessi dalla precedente esposizione al trattamento farmacologico che può alterare l'espressione dei recettori e della struttura e funzionalità cerebrali. I deficit cognitivi nella schizofrenia sono la causa primaria della persistente disabilità funzionale associata alla malattia. Ad oggi gli aspetti farmacogenetici della risposta cognitiva agli antipsicotici non sono stati ancora studiati in esteso nei pazienti con primo episodio di schizofrenia. E' stato dimostrato che l'utilizzo di *oculomotor tasks* (che valutano specifici indici neurofisiologici delle funzioni cognitive) è un metodo sensibile ed efficace per misurare gli effetti di un farmaco sulle funzioni cognitive e quindi un utile approccio traslazionale per studiare gli effetti cognitivi di farmaci che agiscono a livello del sistema nervoso centrale. Tali misurazioni neurofisiologiche consentono di identificare uno degli effetti cognitivi della terapia con antipsicotici nei pazienti schizofrenici, cioè il peggioramento della *working memory* spaziale (*spatial working memory*, SWM). Alcuni pazienti presentano alterazioni più gravi rispetto ad altri a seguito della terapia farmacologica; pertanto, l'identificazione farmacogenetica che predispone alcuni individui ad un peggioramento dei deficit cognitivi esistenti come risultato del trattamento antipsicotico diventa importante al fine di ottimizzare la terapia. Le alterazioni della trasmissione glutammatergica sembrano influenzare la presentazione dei sintomi e i deficit cognitivi nella schizofrenia. Si ritiene, inoltre, che le varianti genetiche che influenzano il *signaling* del glutammato attraverso il recettore per il glutammato di tipo 3 siano correlate alla risposta cognitiva agli antipsicotici. Il gene del recettore metabotropico per il glutammato di tipo 3 (*GRM3*) codifica per la proteina mGluR3; tale proteina modula il *signaling* dei recettori NMDA che hanno un ruolo importante nella genesi dei deficit cognitivi e dei sintomi negativi della schizofrenia. Studi farmacogenetici in letteratura hanno identificato associazioni del *GRM3* con i processi cognitivi in pazienti schizofrenici trattati cronicamente; ad oggi tali correlazioni non sono ancora state investigate in pazienti trattati per il primo episodio clinico. Nel presente studio sono stati reclutati pazienti con una minima o assente precedente esposizione ad antipsicotici e studiati SNPs che includevano le varianti del gene *GRM3* note per essere correlate al glutammato ed altri polimorfismi nelle regioni dei geni *COMT* e del recettore D2 e *ANKK1 (DRD2/ANKK1)* implicati nella regolazione del *signaling* della dopamina.

Sono stati reclutati 61 pazienti che rispondevano ai criteri diagnostici del DSM-IV, 55 *naïve* per gli antipsicotici e 6 che avevano ricevuto una precedente terapia antipsicotica minima (sospesa almeno 3 giorni prima dello studio), e 130 controlli. Criteri di inclusione: età 15-45, assenza di storia di malattie neurologiche o traumi cranici, di abuso di sostanze attive o di dipendenza, punteggio al *Wide Range Achievement Test (WRAT)*  $\geq 70$ , nessuna assunzione di caffeina o nicotina 1 ora prima del test, buona acuità visiva, sospensione delle benzodiazepine da almeno 48 ore prima del test. Criteri di esclusione per i controlli: disordini dell'Asse I, anamnesi positiva per disturbi psicotici e del tono dell'umore nei parenti di primo grado. La gravità dei sintomi è stata valutata tramite la *Brief Psychiatric Rating Scale (BPRS)*. La SWM è stata valutata tramite il paradigma dell'*oculomotor tasks*. Dopo una prima valutazione iniziale i pazienti sono stati trattati per 6 settimane con dosi flessibili di antipsicotici utilizzando il risperidone come antipsicotico di prima scelta o, in alternativa, altri farmaci quali olanzapina, aloperidolo, aripiprazolo, quetiapina. Gli SNPs

sono stati selezionati per determinare eventuali associazioni tra varianti del *GRM3* e performance della SWM prima e dopo il trattamento con antipsicotici. Sono stati inoltre studiati SNPs funzionali della *COMT* e di *DRD2/ANKK1*. Sono stati investigati 5 SNPs del *GRM3* (rs6465084, rs274622, rs1989796, rs1468412 e rs2228595), due del *DRD2/ANKK1* [rs1799732 (-141C Ins/ del) e rs1800497 (TaqIA)] e uno nel *COMT* [rs4680 (Val158Met)]. L'analisi genetica è stata incentrata sugli effetti della terapia nei pazienti schizofrenici; i dati dei soggetti di controllo sono stati usati solo per valutare il grado di deficit cognitivo nei pazienti nelle due sessioni di valutazione.

Dopo terapia, i sintomi clinici, misurati tramite la BPRS totale ( $t_{1,59}=5.88$ ;  $p<0.0001$ ), e i punteggi positivi ( $t_{1,60}=6.54$ ;  $p<0.0001$ ) erano migliorati in misura significativa. I sintomi negativi, invece, non avevano subito miglioramenti rilevanti. I deficit della SWM erano raddoppiati dopo il trattamento con antipsicotici. L'analisi delle associazioni genotipiche con le performance della SWM ha mostrato che due varianti del *GRM3* (rs274622 e rs1468412), ma non di *COMT* o *DRD2*, sono associate alle alterazioni delle performance della SWM dopo terapia. Il gruppo con genotipo rs1468412\_TT ( $n=11$ ) mostrava un sostanziale peggioramento delle performance della SWM dopo trattamento (genotipo $\times$ time interaction  $p=0.001$ ) rispetto ai portatori dell'allele A ( $n=50$ ). Entrambi i genotipi rs1468412\_TT e rs6465084\_AA erano associati agli effetti avversi sulla SWM ( $p<0.007$ ). Due SNPs del *GRM3* (rs6465084 e 1989796) erano associati alle alterazioni dei punteggi BPRS dei sintomi negativi; il gruppo con genotipo rs6465084\_AA ( $n=33$ ) mostrava una ridotta gravità dei sintomi negativi dopo trattamento, mentre i portatori dell'allele G avevano minime alterazioni o un peggioramento dei sintomi negativi (time $\times$ genotype interaction  $p=0.046$ ).

Il presente studio dimostra che varianti del gene *GRM3* sono associate ad un peggioramento dei deficit della SWM e ad una riduzione dei sintomi negativi dopo terapia con antipsicotici; questi dati sono consistenti con studi precedenti riportati in letteratura. Questo è il primo studio che dimostra che SNPs del *GRM3* influenzano il rischio di comparsa di effetti cognitivi a seguito dell'assunzione di antipsicotici. I presenti dati contribuiscono ad identificare geneticamente specifici gruppi di pazienti che possono avere un rischio maggiore di sviluppare eventi cognitivi avversi correlati alla terapia farmacologica. Si ritiene che le anomalie del *signaling* glutammatergico siano importanti componenti della fisiopatologia della schizofrenia. Nei cervelli *postmortem* di pazienti schizofrenici è stato dimostrato che varianti del gene *GRM3* sono associate ad un'alterata espressione dell'*excitatory amino acid transporter-2*. Le alterazioni del *signaling* del glutammato sono inoltre associate ai deficit delle performance della *working memory* e delle funzioni cerebrali nei pazienti schizofrenici. Questi dati suggeriscono che interventi glutammatergici possano essere una strategia efficace per minimizzare gli effetti negativi della terapia. Il presente studio ha due limitazioni: la prima si riferisce alla dimensione del campione esaminato che consente di rilevare gli effetti macroscopici, ma non le più fini relazioni genotipo-fenotipo o le interazioni gene-gene. L'altra limitazione consiste nell'aver considerato un campione che comprendeva più gruppi etnici: per alcuni SNPs sono state osservate differenze nelle frequenze alleliche tra i gruppi etnici, ma le dimensioni del campione hanno limitato la valutazione comprensiva dell'influenza dell'etnia sui risultati dello studio.

In conclusione, il presente studio mostra che il peggioramento della *spatial working memory* dopo terapia con antipsicotici è associato al polimorfismo rs1468412 del gene *GRM3* e che il miglioramento dei sintomi negativi è associato al polimorfismo rs6465084 dello stesso gene.

**Parole chiave:** schizofrenia, farmacogenetica, antipsicotici, glutammato, dopamina, *GRM3*, *COMT*, *DRD2*

#### Riferimento bibliografico

[Bishop JR](#) et al. *Psychopharmacology (Berl)*. 2014 Aug 7 [Epub ahead of print]

## VARIAZIONE NEL GENE *CYP3A43* ASSOCIATA CON LA RISPOSTA AGLI ANTIPSIOTICI

A cura della Dott.ssa Lucia Gozzo

I farmaci antipsicotici sono altamente efficaci nel trattamento di vari sintomi della schizofrenia, tuttavia esiste un'ampia variabilità interindividuale nella risposta clinica. Diversi fattori, quali un miglioramento

precoce dei sintomi, l'età di insorgenza, il sesso e la dieta, sono stati imputati nell'influenzare la risposta al trattamento con antipsicotici, sebbene i metodi attuali non permettano di predire sufficientemente quali pazienti risponderanno. È noto che i fattori genetici giocano un ruolo nella risposta agli antipsicotici, e diverse associazioni tra geni e risposta, inclusi il gene del recettore 2 della dopamina e del recettore 2A della serotonina, sono state replicate in studi indipendenti (Brandl et al. *Can J Psychiatry* 2014, 59:76–88). È stato, inoltre, valutato in diversi studi il ruolo di geni implicati nella farmacocinetica degli antipsicotici. Gli enzimi della famiglia del citocromo p450 (CYP) giocano un ruolo chiave nel metabolismo di molti antipsicotici, e diversi fattori genetici ne influenzano l'attività. Ad esempio, la variazione genetica del *CYP2D6*, che metabolizza aloperidolo, risperidone, aripiprazolo ed altri farmaci, ha mostrato di influenzare in maniera consistente i livelli plasmatici di antipsicotici (Altar et al. *Int Rev Psychiatry* 2013, 25:509–33). Oltre al metabolismo epatico dei farmaci, studi precedenti hanno dimostrato espressione ed attività degli enzimi CYP a livello cerebrale, con effetti sul metabolismo dei neurotrasmettitori e sui livelli locali di farmaco (Ravindranath and Strobel *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2013, 9:551–58). Pertanto, i membri della famiglia del CYP rimangono geni candidati per essere studiati per il ruolo importante su risposta ed effetti avversi del trattamento con antipsicotici. Il *CYP3A43* fa parte della famiglia del CYP3A ed è localizzato in un cluster di geni di citocromi sul cromosoma 7q22.1 (*CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP3A7* e *CYP3A43*). La sequenza amminoacidica del *CYP3A43* è molto simile a quella del *CYP3A4* e del *CYP3A5*. Il *CYP3A43* è espresso in vari tessuti, incluso il cervello, il fegato, il pancreas, la prostata e i reni (Domanski et al. *Mol Pharmacol* 2001, 59:386–92): l'espressione epatica è molto bassa se paragonata a quella del *CYP3A4* e del *CYP3A5* (Westlind et al. *Biochem Biophys Res Commun* 2001, 281:1349–55), mentre a livello cerebrale è stata dimostrata un'espressione molto più elevata (Agarwal et al. *PLoS One* 2008, 3:e2337). Il ruolo funzionale del *CYP3A43* non è ancora completamente noto. Ad oggi, solo uno studio ha valutato l'impatto delle variazioni genetiche del *CYP3A43* sulla risposta agli antipsicotici (Bigos et al. *Mol Psychiatry* 2001, 16:620–25). Bigos ha valutato diversi geni candidati coinvolti nella farmacocinetica dell'olanzapina, trovando che l'rs472660 del *CYP3A43* predice la clearance dell'olanzapina, spiegando le differenze tra pazienti di origine europea e afro-americana. Inoltre, i pazienti con clearance più elevata legata al genotipo del *CYP3A43* hanno mostrato una risposta peggiore al trattamento ed i pazienti con clearance più bassa avevano un tasso più elevato di interruzione della terapia per effetti avversi.

In questo studio è stata valutata l'associazione tra la risposta agli antipsicotici e la presenza della variante rs472660, precedentemente associata alla clearance dell'olanzapina, e la variante missenso rs680055.

Sono stati arruolati 152 pazienti di origine europea con schizofrenia o disturbo schizoaffettivo secondo i criteri del DSM-III o IV e divisi in due gruppi: gruppo A (n=86) comprendente pazienti trattati con vari antipsicotici e valutati prospetticamente per 6 settimane; gruppo B (n=66) comprendente pazienti trattati con clozapina e valutati prospetticamente per 6 settimane. La risposta al trattamento è stata valutata usando cambiamenti percentuali rispetto al basale nello *score brief psychiatric rating scale* (BPRS), e considerando *responder* un paziente con una riduzione di almeno il 25% rispetto al basale. Il farmaco più utilizzato in questa popolazione di pazienti era la clozapina (49% dei pazienti, ovvero tutti i pazienti del gruppo B e l'11% di quelli del gruppo A), seguita da risperidone (16%), olanzapina (11%), aripiprazolo (10%), aloperidolo (5%), amisupride (4%), quetiapina (3%); un solo paziente assumeva rispettivamente flufenazina e ziprasidone.

In totale 104 soggetti hanno presentato una riduzione  $\geq 25\%$  dello *score* BPRS rispetto al basale. La riduzione dello *score* BPRS è stata influenzata in maniera significativa dal sito di studio ( $p = 0,008$ ), dalla durata dello studio ( $p = 0,016$ ), dal tipo di farmaco (clozapina si/no;  $p = 0,015$ ) e dal valore BPRS basale ( $p = 0,005$ ). L'età ( $p = 0,454$ ) ed il sesso ( $p = 0,413$ ) non hanno influenzato in maniera significativa la riduzione del BPRS. L'SNP rs680055 ha mostrato un'associazione significativa con lo status di *responder*, con i portatori dell'allele minore G più responsivi al trattamento (16 su 17 -94,1 %- dei portatori dell'allele G vs. 85 di 132 - 64,4 %- degli omozigoti per l'allele maggiore;  $p = 0,013$ ). I portatori dell'allele G mostravano uno *score* BPRS significativamente più basso alla fine dello studio rispetto ai portatori dell'allele C (genotipo GC: N = 17:  $33.59 \pm 6.8$ ; genotipo CC: N = 133:  $37.4 \pm 9.8$ ; ANCOVA con sito dello studio, durata e BPRS basale come covariate;  $p = 5,9 \times 10^{-4}$ ). È stata anche individuata un'associazione significativa tra il genotipo rs680055 ed il cambiamento dello *score* BPRS dal basale. Non è stata individuata associazione tra l'SNP rs472660 e lo status di *responder* ( $p = 0,28$ , ma l'aplotipo rs680055G-rs472660A è stato associato con la risposta al trattamento ( $p = 0,016$ ).

Questo studio sembra essere il primo a dimostrare che la variante rs680055 predice il miglioramento dei sintomi indotto dal trattamento con antipsicotici. Il polimorfismo rs680055 (noto anche come allele \*3) è una mutazione missenso localizzata sull'esone 10 del *CYP3A43* che porta ad una sostituzione in posizione 340 tra prolina ed alanina (Cauffiez et al. *Hum Mutat* 2004, 23:101). L'impatto di questa variante sull'attività enzimatica non è stata ancora studiata. Esistono diversi studi sul rapporto tra questa variante ed il fenotipo di cellule cancerose e Stone e colleghi (Stone et al. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005, 14:1257–61) hanno individuato un'associazione con un rischio più elevato di carcinoma della prostata. Gli autori ipotizzano che la sostituzione amminoacidica conseguenza del polimorfismo possa modificare la struttura e l'avvolgimento della proteina, risultando in una riduzione dell'attività enzimatica e quindi in una riduzione dell'ossidazione del 6-β-idrossitestosterone.

L'unica variante precedentemente investigata in merito alla risposta agli antipsicotici è l'rs472660. Bigos et al. hanno trovato una più elevata *clearance* dell'olanzapina nei portatori dell'allele minore. L'influenza dell'enzima *CYP3A43* sul metabolismo degli antipsicotici non è completamente nota, ma considerati i risultati di Bigos sull'impatto delle variazioni genetiche sulla *clearance* dell'olanzapina, il polimorfismo rs680055 potrebbe essere legato ad una *clearance* alterata. Si potrebbe pertanto ipotizzare che il polimorfismo del *CYP3A43* porti ad una ridotta attività enzimatica risultante in livelli plasmatici più elevati e di conseguenza in una migliore risposta. Un meccanismo alternativo per l'influenza del *CYP3A43* sulla risposta agli antipsicotici potrebbe essere legato ad un alto livello di espressione a livello cerebrale.

In conclusione, questo studio suggerisce la presenza di un'influenza del *CYP3A43* sulla risposta agli antipsicotici, e rappresenta un importante contributo per comprendere l'importanza clinica di questo enzima.

Limiti dello studio possono essere rappresentati dal basso numero di pazienti, dalla mancanza dei dati sui livelli plasmatici, sullo status di fumatore o sull'espressione del *CYP3A43* e dalla mancata inclusione nello studio di altre etnie oltre a quella europea. Inoltre, la risposta agli antipsicotici rappresenta un fenotipo complesso influenzato da diversi fattori genetici ed ambientali, non considerati in questo studio.

**Parole chiave:** antipsicotici, *CYP3A43*

#### Riferimento bibliografico

[Brandl EJ](#) et al. *J Neural Transm.* 2014 Aug 24. [Epub ahead of print]

## LA METANALISI DEL MESE

### ANALISI MUTAZIONALE ESTESA DEI GENI DELLA FAMIGLIA RAS E BENEFICIO SULLA SOPRAVVIVENZA IN SEGUITO A TERAPIA CON ANTICORPO MONOCLONALE ANTI-EGFR IN PAZIENTI CON CANCRO METASTATICO DEL COLON-RETTO: META-ANALISI DI TRIAL CLINICI RANDOMIZZATI

A cura del Dott. Vittorio Simeon

Gli anticorpi monoclonali (mAbs) cetuximab e panitumumab sono un'importante opzione terapeutica per i pazienti con cancro del colon retto metastatico (mCRC). Il bersaglio di questi anticorpi è il dominio extracellulare del recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR). L'EGFR in coppia con il *pathway* MAPK produce le cascate di *signaling* intracellulare di cui le proteine RAS sono degli importanti effettori a valle. Mutazioni a singolo nucleotide nei codoni 12 e 13 dell'esone 2 del gene KRAS portano all'attivazione costitutiva del *pathway* MAPK, comportando una resistenza al trattamento anti-EGFR. Di conseguenza, il trattamento con questa classe di farmaci è stato approvato unicamente per i pazienti wild-type per questo tipo di mutazione, in modo da ridurre al minimo la tossicità per i pazienti non responsivi e migliorare il rapporto costo-beneficio del trattamento.

Studi recenti, in particolare il trial PRIME (Douillard JY et al. *N Engl J Med* 2013, 369(11):1023-34), suggeriscono come altre mutazioni nei geni della famiglia RAS (sia nel gene KRAS che NRAS) possano essere associate ad una ridotta risposta al trattamento anti-EGFR.

Nella recente meta-analisi pubblicata su *Annals of Oncology*, i ricercatori Sorich MJ et al. hanno analizzato le evidenze emerse dai trial clinici con lo scopo di quantificare il valore predittivo delle altre mutazioni di RAS in seguito a terapia anti-EGFR nei pazienti mCRC. I criteri di inclusione per questa meta-analisi erano: studi randomizzati di fase II e III con trattamento anti-EGFR (sia in monoterapia che in combinazione con chemioterapico); analisi mutazionale degli altri siti dei geni RAS oltre all'esone 2 di KRAS [esone 3 (codoni 59,61), esone 4 (codoni 117, 146) di KRAS, oppure esoni 2, 3, 4 di NRAS]; dati di follow-up per la sopravvivenza senza progressione (PFS) e/o sopravvivenza generale (OS).

Il gruppo di pazienti *wild-type* per la mutazione dell'esone 2 di KRAS è stato suddiviso in due sottogruppi a seconda della presenza o meno delle altre mutazioni dei geni RAS, ottenendo così tre sottogruppi finali: 1) pazienti con mutazione nell'esone 2 di KRAS (e non responsivi alla terapia); 2) pazienti *wild-type* per l'esone 2 di KRAS ma con mutazioni negli altri siti dei geni RAS (e che potenzialmente potrebbero non beneficiare della terapia); 3) *wild-type* per l'esone 2 di KRAS e per gli altri siti RAS (pazienti per cui è attesa la miglior risposta terapeutica).

L'effetto del trattamento anti-EGFR è stato valutato calcolando il rapporto dell'hazard ratio (HR) tra i tre sottogruppi di RAS. L'HR per i sottogruppi "RAS *wild-type*" o "mutati esone 2 di KRAS" è stato diviso per l'HR del nuovo sottogruppo "nuove mutazioni di RAS". Un rapporto <1 indicava un effetto del trattamento inferiore per il sottogruppo "nuove mutazioni di RAS". Le stime dei rapporti di ogni studio sono state raggruppate utilizzando un modello ad effetti-casuali ed il metodo della varianza inversa. È stato inoltre valutato il tasso di risposta oggettiva, basata sui criteri RECIST, definita sia come completa che parziale. L'eterogeneità tra gli studi è stata valutata utilizzando il test Q di Cochrane e l'I<sup>2</sup>. L'effetto dovuto a piccoli studi (con il rischio di bias di pubblicazione) è stato valutato attraverso una visualizzazione del funnel plot e il test di regressione di Egger.

L'analisi mutazionale estesa è stata valutata in nove trial clinici, con un totale di 5948 partecipanti. La mutazione dell'esone 2 di KRAS era valutabile dal 79% al 100% della popolazione in studio, e le nuove mutazioni di RAS erano valutabili dal 65% al 100% della popolazione *wild-type* per l'esone 2. Circa il 19.9% (95%CI; 16.7% - 23.4%) dei tumori *wild-type* per l'esone 2 era portatore di nuove mutazioni in RAS. È stata osservata una eterogeneità significativa tra gli studi per la prevalenza delle mutazioni (p=0.016, I<sup>2</sup>=67%).

Otto trial clinici riportavano dati a sufficienza per valutare l'efficacia di anti-EGFR nei diversi sottogruppi di RAS. L'efficacia del trattamento anti-EGFR era superiore, e statisticamente significativo, per il sottogruppo "RAS *wild-type*" quando comparato ai pazienti con "nuove mutazioni di RAS", sia per quanto riguarda la PFS che l'OS. Invece, non c'era differenza in termini di PFS e OS tra i sottogruppi "nuove mutazioni di RAS" e "mutazione esone 2 KRAS". Il test Q di Cochrane non ha evidenziato alcuna eterogeneità tra gli studi presi in analisi a questo scopo.

L'analisi sul tasso di risposta rispecchia perfettamente i risultati dell'analisi di sopravvivenza. Il gruppo dei pazienti "RAS *wild-type*" aveva un tasso di risposta maggiore rispetto al sottogruppo "nuove mutazioni di RAS", mentre non c'era differenza significativa tra i gruppi "mutazione esone 2 KRAS" e "nuove mutazioni di RAS".

Non si evidenziava alcun beneficio sia in termini di PFS (HR 0.99 [0.77 – 1.27]) che di OS (HR 1.16 [0.91 – 1.47]) in seguito a terapia con anti-EGFR per i pazienti portatori delle nuove mutazioni analizzate. Anche accorpando i gruppi "mutazione esone 2 di KRAS" e "nuove mutazioni di RAS" in "qualunque mutazione in RAS" non era evidente alcun beneficio in termini di PFS e OS in seguito a terapia anti-EGFR. Per quest'ultima analisi era presente una eterogeneità significativa in relazione alla PFS (p=0.02, I<sup>2</sup>=63%), ma non alla OS (p=0.29, I<sup>2</sup>=19%).

La meta-analisi condotta da Sorich e colleghi stabilisce che i pazienti con tumore *wild-type* per KRAS esone 2 (che includono sia 'tutti i *wild-type*' che le 'nuove mutazioni di RAS') non dovrebbero essere considerati come un gruppo omogeneo per quanto riguarda l'efficacia della terapia anti-EGFR. I risultati di questo lavoro indicano che i tumori con una delle nuove mutazioni di RAS dovrebbero essere raggruppati, in maniera più appropriata, con i tumori con la mutazione dell'esone 2 di KRAS.

Per i pazienti con tumore "RAS *wild-type*", e cioè senza alcuna mutazione di RAS, è stato osservato un beneficio significativo in termini di PFS e OS dopo aggiunta di anti-EGFR. Al contrario, questo beneficio era assente per i pazienti con tumore con almeno una mutazione di RAS. Da questi dati, circa il 53% dei tumori mCRC (~ 42% con mutazioni nell'esone 2 di KRAS e ~ 11% con mutazioni negli esoni 3 o 4 di KRAS o negli esoni 2, 3 o 4 di NRAS) sono potenzialmente resistenti alla terapia con anti-EGFR. In questa meta-analisi è evidente una eterogeneità per quanto riguarda la frequenza delle mutazioni di RAS tra gli studi, che potrebbe essere spiegata, almeno in parte, dalla differente metodica utilizzata per analizzare le mutazioni di RAS. È ovvio che in questo caso occorrono ulteriori indagini per capire con certezza la frequenza esatta di queste mutazioni in pazienti mCRC.

I ricercatori si spingono in discussione ad ipotizzare nuove opportunità future di ricerca: 1 – valutare le mutazioni 'individuali' di RAS per capire il peso reale di ogni singola mutazione sull'efficacia di anti-EGFR, anche se, data la bassa prevalenza di alcune mutazioni, la potenza statistica per evidenziare le differenze tra singole mutazioni potrebbe essere il fattore limitante. 2 – analisi mutazionale approfondita ed espressione degli altri geni del *pathway* MPAK come PTEN, PIK3CA e EREG.

I risultati di questa meta-analisi suggeriscono quindi che un'estesa analisi delle mutazioni di RAS dovrebbe essere intrapresa prima della somministrazione dell'mAb anti-EGFR. Il peso di queste evidenze indica che sia cetuximab che panitumumab dovrebbero essere prescritti esclusivamente ai pazienti con mCRC *wild-type* per tutte le mutazioni note dei geni RAS.

Circa il 53% dei tumori mCRC (~ 42% con mutazioni nell'esone 2 di KRAS e ~ 11% con mutazioni negli esoni 3 o 4 di KRAS o negli esoni 2, 3 o 4 di NRAS) sono potenzialmente resistenti alla terapia con anti-EGFR. I pazienti con tumore *wild-type* per KRAS esone 2 ma con mutazioni negli altri geni di RAS dovrebbero essere raggruppati, in maniera più appropriata, con i tumori con la mutazione dell'esone 2 di KRAS, per mancanza di beneficio in termini di PFS e OS in seguito a terapia con mAb anti-EGFR

**Conflitto d'interesse:** CSK è membro dell'Advisory Board per Amgen e Merck Serono. GK è un membro onorario dell'Advisory Board per Bayer. Gli altri Autori non dichiarano alcun conflitto di interesse.

**Parole chiave:** cetuximab, panitumumab, cancro colon retto, KRAS, NRAS

#### Riferimento bibliografico

[Sorich MJ](#) et al. *Ann Oncol* 2014 Aug 12 [Epub ahead of print]



#### Sostieni la Società Italiana di Farmacologia

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

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

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

[sif.informazione@segr.it](mailto:sif.informazione@segr.it); [sif.farmacologia@segr.it](mailto:sif.farmacologia@segr.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)<br>Dott. Salvatore Terrazzino (Università del Piemonte Orientale)   |
| Web Editor                         | Dott. Federico Casale (Università di Torino)  |
| Hanno contribuito a questo numero: | Dott.ssa Sarah Carginin (Università del Piemonte Orientale)<br>Dott.ssa Donatella Carretta (Università di Bologna)<br>Dott.ssa Stefania Cheli (A. O. Polo Universitario "Sacco" di Milano)<br>Dott.ssa Valentina Citi (Università di Pisa)<br>Dott.ssa Valeria Conti (Università di Salerno)<br>Dott.ssa Eva Cuzzoni (Università di Trieste)<br>Dott.ssa Marzia Del Re (Università di Pisa)<br>Dott.ssa Raffaella Franca (Università di Trieste)<br>Dott.ssa Lucia Gozzo (Università di Catania)<br>Dott.ssa Gloria Ravegnini (Università di Bologna)<br>Dott. Vittorio Simeon (IRCCS – CROB) |

---

**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.