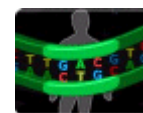


**SIF - FARMACOGENETICA****Newsletter Numero 66 – Ottobre 2014**

---

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

---

**Sommario****⇒ Oncologia**

- AR-V7 e resistenza ad enzalutamide ed abiraterone nel carcinoma prostatico
- Associazione tra polimorfismi in geni responsivi alla radioterapia e la tossicità acuta in pazienti con tumori della testa e del collo
- Analisi del DNA tumorale circolante come metodo diagnostico non invasivo per la determinazione di mutazioni di rilevanza clinica in pazienti non-fumatori affetti da tumore del polmone
- Il genotipo CC del gene antiapoptotico BCL-2 (-938 C/A) è un marker prognostico indipendente per un *outcome* clinico sfavorevole in pazienti con cancro al polmone non a piccole cellule
- Impatto clinico di genotipi ed aplotipi di ABCC1 e ABCC2 nella resistenza ad imatinib in pazienti con leucemia mieloide cronica

**⇒ Neurologia**

- L'agranulocitosi indotta da clozapina è associata agli alleli rari HLA-DQB1 e HLA-B
- Farmacogenetica degli eventi avversi nel trattamento della schizofrenia dopo terapia con ziprasidone, olanzapina e perazina

**⇒ Immunomodulazione**

- La risposta al trattamento con farmaci anti-TNF in pazienti affetti da artrite reumatoide è associata ad una variante del gene NLRP3
- Le varianti HLA-DQA1-HLA-DRB1 conferiscono suscettibilità alla pancreatite indotta da farmaci immunosoppressori tiopurinici

**⇒ Cardiovascolare**

- CYP3A4\*22 E CYP3A5\*3 sono associati ad un aumento dei livelli di concentrazione plasmatica della simvastatina in uno studio di coorte sul colesterolo e la farmacogenetica

**⇒ La metanalisi del mese**

- Ruolo dei polimorfismi del gene ABCB1 nella risposta ad imatinib in pazienti con leucemia mieloide cronica: revisione sistematica e meta-analisi

## ONCOLOGIA

### AR-V7 E RESISTENZA AD ENZALUTAMIDE ED ABIRATERONE NEL CARCINOMA PROSTATICO

A cura della Dott.ssa Lucia Gozzo

Nel carcinoma della prostata resistente alla castrazione vengono utilizzati farmaci che sopprimono la sintesi extra-gonadica di androgeni o che agiscono direttamente a livello del recettore androgenico (AR). Tra questi, l'enzalutamide esercita la sua attività legando il dominio di legame del recettore, determinando uno spiazzamento dei ligandi naturali (testosterone e diidrotosterone) ed inibendo la traslocazione al nucleo e quindi la trascrizione dei geni target. L'abiraterone è un inibitore del CYP17A1 che regola la sintesi dei androgeni surrenalici e intra-tumorali. Entrambi i farmaci sono stati approvati per il trattamento del carcinoma della prostata metastatico castrazione-resistente, tuttavia circa il 20-40% dei pazienti non risponde alla terapia con enzalutamide o abiraterone oppure sviluppa resistenza secondaria. E' noto che la variante 7 del recettore per gli androgeni (AR-V7), codificante per una variante di *splicing* tronca del dominio di legame al C-terminale risulta costitutivamente attiva come fattore di trascrizione in quanto conserva il dominio transattivante N-terminale (Dehm SM et al. *Cancer Res* 2008,68:5469-77; Hu R et al. *Cancer Res* 2009,69:16-22). Poiché l'enzalutamide agisce legando il dominio di legame del recettore degli androgeni, gli Autori di questo studio ipotizzano che la resistenza a tale farmaco potrebbe essere legata alla presenza della proteina tronca. Inoltre, essendo costitutivamente attiva, non può essere inibita da agenti che riducono il ligando come l'abiraterone. Per suffragare tale ipotesi, gli Autori hanno valutato l'associazione tra la presenza della variante 7 di *splicing* del recettore per gli androgeni (AR-V7) nelle cellule tumorali circolanti, e la risposta al trattamento con enzalutamide e abiraterone in pazienti con carcinoma della prostata resistente alla castrazione.

Sono stati arruolati prospetticamente uomini con carcinoma della prostata metastatico castrazione resistente che avevano iniziato un trattamento con prednisone (5 mg x 2/die) in associazione a enzalutamide (160 mg/die) o abiraterone (1000 mg/die) e presentavano, in accordo con le linee guida *Prostate Cancer Clinical Trials Working Group 2* (PCWG2) da due o più settimane livelli crescenti di PSA, con l'ultimo valore  $\geq 2$  ng/ml. Sono stati esclusi i pazienti per i quali era programmato un trattamento concomitante aggiuntivo con altri farmaci. I campioni di sangue periferico sono stati ottenuti dai pazienti eleggibili in tre momenti: al basale, al momento di una eventuale risposta clinica o biochimica ed al momento della progressione clinica o radiografica. In aggiunta, i pazienti sono stati incoraggiati a sottoporsi ad ago-biopsia delle lesioni metastatiche al basale e dopo progressione. I valori di PSA sono stati valutati ogni 1-2 mesi, la TC torace, addome e pelvi e la scintigrafia ossea ogni 2-4 mesi. La terapia è stata continuata fino alla progressione del PSA, alla progressione clinica o radiologica o all'insorgenza di effetti avversi farmaco-correlati. L'*end point* primario era rappresentato dalla proporzione di pazienti con risposta del PSA (riduzione  $\geq 50\%$  nei livelli di PSA rispetto al basale, mantenuta per 4 o più settimane) in qualsiasi momento dall'inizio della terapia ed è stato valutato separatamente per i pazienti trattati con enzalutamide e quelli trattati con abiraterone. Per ogni paziente è stata anche valutata la migliore risposta del PSA (riduzione percentuale massima dei livelli di PSA rispetto al basale). *End point* secondari erano la sopravvivenza libera da progressione del PSA (aumento del livello di PSA del 25% o più rispetto al valore più basso raggiunto), la sopravvivenza libera da progressione clinica (peggioramento dei sintomi correlati alla malattia o nuove complicanze malattia-correlate) o radiologica (incremento  $\geq 20\%$  della somma dei diametri delle lesioni target dei tessuti molli alla TC o 2 o più nuove metastasi alla scintigrafia ossea) e la sopravvivenza globale.

Dal dicembre 2012 al settembre 2013 sono stati arruolati 62 pazienti con cellule tumorali circolanti rilevabili, di cui 31 in trattamento con enzalutamide e 31 con abiraterone. Il 39% (12 su 31) dei pazienti in terapia con enzalutamide ed il 19% (6 su 31) dei pazienti trattati con abiraterone presentava a livello delle cellule tumorali circolanti di livelli detectabili di AR-V7 mRNA in condizioni basali. Nel gruppo trattato con enzalutamide i pazienti AR-V7 positivi avevano livelli più elevati dell'mRNA del recettore degli androgeni *full-length* e di PSA rispetto ai pazienti AR-V7 negativi ed era più probabile presentassero un *performance*

status di 1 o 2, metastasi viscerali e sei o più metastasi ossee e che avessero ricevuto in precedenza un trattamento con docetaxel e abiraterone. Nella coorte trattata con abiraterone, i pazienti AR-V7 positivi presentavano livelli più elevati dell'mRNA del recettore degli androgeni *full-length*, di PSA e di fosfatasi alcalina ed un più alto numero di terapie ormonali precedenti rispetto ai pazienti AR-V7 negativi ed era più probabile che presentassero un *performance status* di 1 o 2 o che avessero ricevuto in precedenza un trattamento con enzalutamide. Il 32% dei pazienti in terapia con enzalutamide ha presentato una risposta del PSA, 0% nei pazienti AR-V7 positivi e 53% nei AR-V7 negativi ( $P = 0.004$ ); la sopravvivenza libera da progressione del PSA è risultata più breve nei pazienti con AR-V7 rilevabile al basale ( $P < 0.001$  nell'analisi univariata); la sopravvivenza libera da progressione clinica o radiografica ( $P < 0.001$  nell'analisi univariata) e la sopravvivenza globale (mediana 5,5 mesi vs non raggiunta;  $P = 0.002$ ) sono risultate più brevi nei pazienti con AR-V7 rilevabile al basale. Il 55% dei pazienti in terapia con abiraterone ha presentato una risposta del PSA, 0% nei pazienti AR-V7 positivi e 68% nei AR-V7 negativi ( $P = 0.004$ ); la sopravvivenza libera da progressione del PSA ( $P < 0.001$  nell'analisi univariata) e la sopravvivenza libera da progressione clinica o radiografica (mediana 10,6 mesi vs non raggiunta;  $P = 0.006$ ) sono risultate più brevi nei pazienti con AR-V7 rilevabile al basale. Dei 42 uomini con AR-V7 non rilevabile al basale, 6 pazienti (4 in trattamento con enzalutamide e 2 con abiraterone) hanno presentato una conversione in AR-V7 positivi. Tutti i pazienti AR-V7 positivi al basale sono rimasti positivi durante il trattamento. Sette pazienti hanno acconsentito all'esecuzione di studi sui tessuti, in 5 sono state eseguite biopsie delle sedi metastatiche e 2 hanno subito l'autopsia post-mortem. Tre pazienti su sette presentavano AR-V7 nelle cellule circolanti e nei tessuti metastatici. Nessuno dei 4 pazienti negativi per l'AR-V7 in circolo presentava positività dei tessuti metastatici.

Una percentuale di pazienti non trae beneficio dal trattamento con enzalutamide e abiraterone. Pertanto, una comprensione maggiore dei meccanismi alla base della resistenza a questi farmaci potrebbe facilitare la selezione di terapie alternative per alcuni pazienti. In questo studio gli Autori mostrano che l'AR-V7 può essere rilevato nelle cellule circolanti ed essere associato con la resistenza a enzalutamide e abiraterone. Questa ipotesi è biologicamente plausibile poiché la proteina codificata dall'AR-V7 manca del dominio di legame del recettore degli androgeni e risulta costitutivamente attiva come fattore di trascrizione indipendentemente dal ligando (Hu R et al. *Cancer Res* 2009,69:16-22; Guo Z et al. *Cancer Res* 2009,69:2305-13). In questo studio nessuno dei pazienti positivi per l'AR-V7 ha presentato apprezzabili benefici clinici dalla terapia con enzalutamide e abiraterone. Se la forte associazione tra la presenza dell'AR-V7 e la resistenza a enzalutamide e abiraterone venisse confermata da altri studi potrebbe essere utilizzato come *biomarker* di resistenza a queste terapie e orientare la scelta del trattamento. Comunque, la presenza dell'AR-V7 potrebbe essere indice di una malattia più avanzata o aggressiva. Studi su pazienti con tumore castrazione-resistente hanno mostrato che le varianti recettoriali sono spesso espresse nelle metastasi (Hörnberg E et al. *PLoS One* 2011,6(4):e19059; Zhang X et al. *PLoS One* 2011,6(11): e27970) e che elevati livelli di queste varianti sono legate ad una progressione più rapida e ad una sopravvivenza più breve. Un approccio alternativo per il trattamento dei pazienti AR-V7 positivi potrebbe essere quello di creare un farmaco mirato per il dominio N-terminale del recettore degli androgeni, che teoricamente potrebbe inibire sia il recettore degli androgeni di lunghezza piena sia l'isoforma mancante del dominio di legame. Questi inibitori sono al momento in fasi precoci di sviluppo (Ravindranathan P et al. *Nat Commun* 2013,4:1923. 24; Andersen RJ et al. *Cancer Cell* 2010,17: 535-46). È probabile che ci possano altri meccanismi alla base della resistenza primaria o acquisita a enzalutamide e abiraterone, in ogni caso sono necessari ulteriori studi per convalidare questi risultati.

In conclusione, i dati di questo studio supportano l'associazione tra l'AR-V7 e la resistenza ad enzalutamide ed abiraterone in pazienti con carcinoma della prostata resistente alla castrazione.

**Parole chiave:** carcinoma della prostata, enzalutamide e abiraterone, AR-V7

#### Riferimento bibliografico

[Antonarakis ES](#) et al. *N Engl J Med* 2014, 371(11):1028-38.

## ASSOCIAZIONE TRA POLIMORFISMI IN GENI RESPONSIVI ALLA RADIOTERAPIA E LA TOSSICITÀ ACUTA IN PAZIENTI CON TUMORI DELLA TESTA E DEL COLLO

A cura della Dott.ssa. Valeria Conti

I protocolli clinici di radioterapia, oggi sempre più mirati, hanno senza dubbio migliorato la cura di alcuni tumori e aumentato il grado di sopravvivenza dei pazienti oncologici, tuttavia la tossicità correlata ai radioterapici nei tessuti normali del paziente rimane un grande problema. Nei pazienti con tumore della testa e del collo le mucositi orali e gli eritemi cutanei sono complicanze frequenti della radio-chemioterapia che spesso comportano la sospensione del trattamento. Poiché la sensibilità alla radioterapia è strettamente correlata ad alcune sindromi genetiche come l'atassia telangectasia, l'anemia di Fanconi e la sindrome di Bloom è stato ipotizzato un coinvolgimento della componente genetica nelle manifestazioni di tossicità acuta legata all'utilizzo della radioterapia. Inoltre, diversi studi hanno dimostrato l'esistenza di un'associazione tra genotipo ed effetti sia acuti sia a lungo termine dei radioterapici nei tessuti normali. Sebbene alcune ricerche abbiano suggerito che polimorfismi in geni candidati potrebbero influire sulla determinazione delle reazioni avverse da radioterapici, la loro applicabilità clinica come bio-marcatori rimane da chiarire. In questo studio sono stati analizzati polimorfismi a singolo nucleotide e delezioni in geni codificanti alcune citochine, coinvolti nei meccanismi di danno e riparo del DNA e nella risposta cellulare antiossidante, con l'obiettivo di ricercare un'eventuale associazione tra tali varianti genetiche e le reazioni avverse causate dal trattamento radio-chemioterapico.

La popolazione in studio era rappresentata da 183 pazienti con tumori della testa e del collo; la maggior parte dei pazienti (148/183) erano trattati con un protocollo di radio-chemioterapia a base di cisplatino, i rimanenti con la sola radioterapia. Gli eventi avversi acuti (mucositi orali e reazioni cutanee) sono stati registrati durante e dopo il protocollo terapeutico in accordo con i criteri del *Radiation Therapy Oncology Group* (RTOG). L'isolamento dei campioni di DNA è stato eseguito tramite la tecnica del *salting out* e le analisi di genotipizzazione mediante PCR e digestione enzimatica. Un'analisi di conferma è stata fatta nel 5% dei campioni analizzati.

Su 183 individui, 71 (38,79%) avevano manifestato mucositi orali di grado severo (grado 3 e 4) e 44 (24,04%) reazioni cutanee gravi. Sino a una tossicità di grado 2, le reazioni avverse sono generalmente tollerate dal paziente senza bisogno di instaurare una terapia mirata, ma i gradi 3 e 4 richiedono l'intervento terapeutico. Sulla base di questo criterio, stabilito dai medici oncologi, i pazienti sono stati quindi suddivisi in due gruppi, uno includente individui con reazioni avverse di grado  $\leq 2$  e l'altro gruppo con grado  $> 2$ . Mentre non è stata dimostrata alcuna correlazione tra i polimorfismi analizzati e le reazioni cutanee, il polimorfismo rs1805794 del gene NBN, che codifica per la nibrina, una proteina coinvolta nel riparo delle rotture nel doppio filamento del DNA e una variante nel gene che codifica per lo *scavenger* molecolare catalasi (rs7943316) sono stati associati rispettivamente a un rischio più elevato e a un rischio inferiore di sviluppare mucositi orali di grado  $> 2$ . L'analisi di multivariata ha poi confermato solo l'influenza del polimorfismo nel gene NBN sulla determinazione delle mucositi orali. Anche l'aplotipo (rs1805787, rs1805794) del gene NBN è stato associato all'insorgenza di mucosite orale. Infine, gli autori hanno analizzato il pattern di *linkage disequilibrium* per gli SNPs nel gene XRCC1, un altro fattore coinvolto nella risposta al danno del DNA, e hanno trovato che i polimorfismi rs3213245, rs1799782, rs25489 e rs25487 erano associati con le reazioni cutanee gravi.

Sebbene sia stato suggerito che fattori genetici influenzino la suscettibilità dei pazienti in trattamento radioterapico a sviluppare eventi avversi acuti, non è ancora stato chiarito se essi possano rappresentare marcatori predittivi di tossicità. Finora i pochi studi che hanno investigato l'influenza delle varianti genetiche in geni fondamentali per la regolazione dei meccanismi di riparo del DNA e le manifestazioni tossiche in pazienti con tumori della testa e del collo hanno prodotto risultati controversi. Al contrario, diverse ricerche hanno studiato l'impatto di polimorfismi del gene TGF $\beta$ 1 e diversi geni del riparo al DNA (come XRCC1), o coinvolti nella risposta antiossidante, (come SOD2 e GSTP1) sullo sviluppo della tossicità tissutale. Alcuni studi precedenti avevano messo in evidenza l'effetto di aplotipi genetici nel predire gli eventi acuti di tossicità della radioterapia, in questo lavoro è stata suggerita l'influenza dell'aplotipo (rs1805787, rs1805794) del gene NBN. Una limitazione di questo studio è che non è stato possibile stratificare i dati

ottenuti relativamente ai trattamenti chemioterapici e radioterapici (considerati singolarmente) data l'esiguità del campione rappresentato dai pazienti (35) trattati con il solo protocollo radioterapico.

In conclusione, questo studio descrive un'associazione tra varianti genetiche e aplotipi del gene NBN e il rischio di sviluppare mucositi orali nei pazienti con tumori della testa e del collo sottoposti a protocolli di chemio/radioterapia. La replicazione di questi risultati in coorti di pazienti più ampie e di diversa origine potrà aiutare ad analizzare l'utilizzo dei polimorfismi come bio-marcatori e quindi a stimare il loro impatto nella pratica clinica.

**Parole chiave:** radioterapia, chemio-radioterapia, tumore della testa e del collo, NBN, nibrina, aplotipo

#### Riferimento bibliografico

[Venkatesh GH](#) et al. *PLoS One* 2014, 9(3):e89079.

## ANALISI DEL DNA TUMORALE CIRCOLANTE COME METODO DIAGNOSTICO NON INVASIVO PER LA DETERMINAZIONE DI MUTAZIONI DI RILEVANZA CLINICA IN PAZIENTI NON-FUMATORI AFFETTI DA TUMORE DEL POLMONE

*A cura della Dott.ssa Valentina Citi e della Dott.ssa Marzia Del Re*

L'analisi delle mutazioni somatiche di importanti oncogeni è gradualmente diventata un'analisi routinaria nella pratica dell'oncologia toracica, in quanto non sempre è possibile effettuare la biopsia. Nel tumore del polmone, le mutazioni somatiche e i geni coinvolti variano se il paziente è fumatore o no. Infatti il tumore del polmone in pazienti non fumatori presenta mutazioni principalmente a carico del gene che codifica per il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR): lo stato mutazionale di EGFR è infatti considerato un importante biomarcatore per selezionare pazienti idonei per la somministrazione di farmaci inibitori delle tirosin chinasi. A causa della difficile accessibilità al campione tissutale, il DNA tumorale circolante (cftDNA) ha attirato molta attenzione in campo oncologico. Il cftDNA si ritrova nel plasma come piccolissimi frammenti, rilasciati da processi infiammatori, necrotici ed apoptotici dalle cellule. Inoltre rappresenta una vera e propria "biopsia liquida" che a differenza del prelievo del campione tissutale, non è invasiva. Il problema e la sfida rimangono principalmente tecnici, in quanto per individuare mutazioni sul cftDNA sono necessarie metodologie molto sensibili a causa della sua bassa concentrazione plasmatica.

Lo scopo di questo lavoro riguarda l'individuazione di mutazioni somatiche clinicamente rilevanti in pazienti non fumatori affetti da tumore del polmone utilizzando il cftDNA. Il sequenziamento è stato effettuato attraverso il Next-Generation Sequencing e le mutazioni prese in esame riguardano regioni dei geni EGFR, KRAS, BRAF, HER2 e PIK3CA implicate nella tumorigenesi. Inoltre sono stati confrontati i risultati ottenuti dall'analisi del cftDNA con quelli ottenuti sequenziando il DNA tumorale tissutale (tDNA) considerato come riferimento.

In questo studio sono stati inclusi 106 pazienti non fumatori (13 maschi e 93 femmine) di origine caucasica (91,3%), africana (5,4%), asiatica (1,1%) e nord americana (2,2%) a cui è stata diagnosticata la malattia in età compresa tra 55 e 81 anni. Al 91% dei pazienti è stato diagnosticato adenocarcinoma al polmone, al 3,8% carcinoma a cellule larghe e all'8% carcinoma a cellule squamose allo stadio IV (78%). Dei 106 pazienti reclutati, in 68 casi è stato possibile avere sia il campione tissutale per l'estrazione del DNA tumorale sia il prelievo di sangue da cui estrarre il cftDNA prima dell'inizio della terapia. Il cftDNA è stato estratto da campioni di 1 mL di plasma usando il QIAmp *circulating nucleic acid kit* (Qiagen) seguendo il protocollo e in seguito quantificato: è stato osservato che la concentrazione di cftDNA è associata significativamente sia al numero di siti metastatici (M), sia allo stadio del tumore (T). La concentrazione di cftDNA in campioni di plasma relativi a pazienti con tumori al primo stadio con scarso interessamento linfonodale e siti metastatici inferiori a 2 è di  $32,7 \pm 25,0$  ng/mL; aumentando lo stadio del tumore e il numero di metastasi si ha un significativo incremento della concentrazione di cftDNA arrivando a  $103,0 \pm 117,0$  ng/mL. Le sequenze di interesse dei geni codificanti per EGFR, KRAS, BRAF, HER2 e PIK3CA sono state amplificate tramite PCR e in seguito sequenziate attraverso Next-Generation Sequencing: dall'analisi del tDNA sono state trovate mutazioni clinicamente significative in 50 campioni, mentre 18 sono risultati *wild type*. In particolare il 44%

di queste riguardano l'esone 19 di EGFR, il 18% l'esone 21 di EGFR, mentre non sono state trovate mutazioni a carico dell'esone 20 di PIK3CA, dell'esone 11 di BRAF, dell'esone 3 di KRAS e dell'esone 19 di HER2. Per quanto riguarda l'analisi del cftDNA, sono state confermate 26 mutazioni riscontrate nell'analisi del tDNA; 3 campioni di cftDNA, però presentano mutazioni non rilevate dall'analisi del tDNA (due a carico di EGFR e una a carico di PIK3CA): in questi casi è possibile che la biopsia non sia totalmente rappresentativa del tumore. Infatti recenti scoperte evidenziano che la massa tumorale può comprendere diversi cloni cellulari con diversi profili mutazionali.

Confrontando quindi i risultati ottenuti sequenziando il tDNA con quelli ottenuti dal sequenziamento del cftDNA, è stato riscontrato il 58% di sensibilità e una concordanza del 68%.

Molti studi precedenti hanno evidenziato il potenziale uso del cftDNA come metodo alternativo non invasivo per la determinazione di biomarcatori diagnostici, concentrandosi però su un unico biomarcatore ed includendo solamente pazienti con stadi avanzati di tumore (IIIB/IV). In questo studio sono stati inclusi pazienti affetti da tumore a diverso stadio, mettendo in evidenza la correlazione tra la concentrazione del cftDNA con lo stadio tumorale.

In conclusione, questo studio evidenzia che la determinazione delle mutazioni clinicamente rilevanti attraverso l'analisi del cftDNA è applicabile alla clinica nel tumore del polmone indipendentemente dallo stadio del tumore stesso, data la buona concordanza tra l'analisi del tDNA e il cftDNA (68%) e la buona sensibilità del metodo (58%)

**Parole chiave:** DNA tumorale circolante, biopsia liquida, tumore del polmone, mutazioni

#### Riferimento bibliografico

[Couraud S](#) et al. *Clin Cancer Res* 2014, 20(17):4613-24.

---

## IL GENOTIPO CC DEL GENE ANTIAPOPTOTICO BCL-2 (-938 C/A) È UN MARKER PROGNOSTICO INDIPENDENTE PER UN OUTCOME CLINICO SFAVOREVOLE IN PAZIENTI CON CANCRO AL POLMONE NON A PICCOLE CELLULE

*A cura della Dott.ssa Gloria Ravegnini*

Il cancro al polmone è la principale causa di morte cancro-relata nel mondo, con una stima di 1.4 milioni di morti ogni anno. Il tumore non a piccole cellule (NSCLC, non small-cell lung cancer), caratterizza circa l'85% dei pazienti ed è il principale tipo di cancro del polmone. Nonostante i miglioramenti nei trattamenti disponibili, tuttavia la sopravvivenza a 5 anni è migliorata solo marginalmente, passando dal 13 al 16%.

In India, uno dei paesi con il più alto tasso di cancro, si stima che nel 2015 le morti saranno circa 700.000; il tasso di mortalità varia notevolmente da stato a stato, ed è stato osservato che in città come Calcutta, Mumbai e Nuova Delhi, il tumore al polmone rappresenta circa l'11% di tutti i tumori che colpiscono gli uomini con età compresa tra 30 e 69 anni.

L'apoptosi, controllata da specifici geni pro e anti apoptotici, gioca un ruolo chiave nel controllo della crescita cellulare. Qualsiasi deviazione dal suo regolare funzionamento conduce a molte malattie compreso il cancro; è stato dimostrato che la distribuzione genotipica degli SNPs nei geni che modulano il processo apoptotico può essere sfruttata come parametro predittivo in vari tumori.

La famiglia BCL-2 rappresenta un insieme di proteine in grado di regolare l'apoptosi generando segnali per la sopravvivenza o la morte. Polimorfismi a livello del gene BCL-2 possono influenzare la sua espressione e promuovere apoptosi nelle cellule normali così come trascrizione ciclo-dipendente aberrante. Tra questi, lo SNP rs2279115, -938C>A, localizzato nella regione del promotore, è stato studiato in diversi tipi di cancro ed è stato osservato che i genotipi CC e AA hanno diverse capacità di legame del fattore di trascrizione con una conseguente alterazione dell'attività del promotore e dell'espressione del gene.

Lo scopo del presente studio è stato quello di investigare l'associazione dello SNP rs2279115 sul rischio e sulla prognosi di NSCLC in pazienti indiani.

Nell'analisi sono stati coinvolti 155 pazienti affetti da NSCLC di nuova diagnosi e 155 individui sani.

Le due coorti arruolate erano composte entrambe da 122 maschi e 33 femmine di cui il 18,7% con età <18 anni e l'81,3% con età >18; il 71% dei casi erano fumatori di cui 65 (58,6%) avevano smesso da più di 6 mesi.

Per quanto riguarda la distribuzione genotipica, è stata osservata una differenza statisticamente significativa nelle frequenze dei genotipi AA, AC e CC tra pazienti e controlli ( $p=0,0003$ ); in particolare la frequenza dell'allele C (fC) è risultata più alta tra gli individui malati (0,59), mentre fA risultava maggiore in quelli sani (0,58). Caratteristiche demografiche e clinicopatologiche, compresi sesso ( $p = 0,002$ ), età alla diagnosi ( $p = 0,004$ ), stadio TNM ( $p = 0,0006$ ), metastasi ( $p=0,024$ ), presenza di casi di cancro in famiglia ( $p= 0,015$ ) sono risultati significativamente associati con il genotipo di BCL-2 rs2279115; è stata inoltre osservata un prevalenza di fC tra i casi con adenocarcinoma (0,65), in stadio avanzato (0,68) e con metastasi (0,65). Allo scopo di stimare il grado di associazione tra il genotipo di BCL-2 rs2279115 e il rischio di NSCLC in pazienti indiani, è stata condotta un'analisi multivariata basata su regressione logistica (odds ratio, OR, risk ratio, RR, risk difference, RD). I risultati hanno suggerito un possibile effetto dominante dell'allele A in maniera dosaggio allele dipendente: per il genotipo AC e CC sono stati stimati valori di OR 2,8 (1,18-3,66) e 3,68 (1,92-6,79), RR 1,36 (1,08-1,71) e 1,87 (1,35-2,57) e RD 17,74 (4,68-30,81) e 31,03 (16,79-45,27) comparati con il genotipo AA.

Le analisi di sopravvivenza sono state condotte sui 155 casi. Il follow-up medio per l'*overall survival* (OS) è stato di 11,95 mesi (mediana 10,50; range 0,5-127,5 mesi), e il numero di morti correlate a NSCLC è stato di 87 (56,1%). Pazienti omozigoti per l'allele C esibivano un OS significativamente inferiore rispetto a quelli con genotipo AA. La sopravvivenza media per pazienti con genotipo AA, AC, CC+AC e CC era rispettivamente di 35,5, 14,0, 11,0, 8,0 mesi. Un OS significativamente ridotta è stata ritrovata in pazienti CC sia in stadio TNM precoce ( $p=0,01$ ) che avanzato ( $p<0,0001$ ).

I dati raccolti in questa analisi suggeriscono che individui omozigoti per l'allele C dello SNP di BCL2 rs2279115, hanno un rischio di 3,6 volte maggiore di sviluppare NSCLC rispetto agli omozigoti AA e che tale polimorfismo è un marker prognostico indipendente di *outcome* clinico non favorevole. Pazienti omozigoti CC avevano inoltre un rischio più alto di morte comparati con quelli con genotipo AA.

Precedenti studi hanno dimostrato che l'allele A è associato ad un livello di espressione di Bcl-2 maggiore; indici apoptotici e proliferativi sono significativamente più elevati con BCL-2 CC rispetto a CA o AA; il genotipo AA è stato inoltre correlato con risposte terapeutiche positive anche nel tumore al seno, orofaringeo, renale e in carcinoma della testa e del collo (Bachmann HS et al. *Clin Cancer Res* 2007,13(19):5790-7; Lehnerdt GF et al. *Ann Oncol* 2009,20(6):1094-9; Hirata H et al. *J Urol* 2009,181(4):1907-12), mentre in B-CLL, nel cancro alla prostata ed esofageo era associato con un *outcome* sfavorevole (Bachmann HS et al. *Int J Cancer* 2011,129(10):2390-9; Faderl S et al. *Leukemia* 2002,16(6):1045-52). In diversi tipi di tumore, quindi, l'espressione di Bcl-2 risulta avere comportamenti biologici diversi: potrebbe agire in modo anti apoptotico promuovendo la crescita tumorale (Cory S et al. *Nat Rev Cancer* 2002,2(9):647-56; Zinkel S et al. *Cell Death Differ* 2006,13(8):1351-9) o favorire l'apoptosi portando dunque ad una risposta positiva al trattamento come nel caso dell' NSCLC.

In conclusione, il polimorfismo di BCL-2 rs2279115 contribuisce al rischio di sviluppare NSCLC e rappresenta un nuovo marker prognostico per identificare i pazienti ad alto rischio per un *outcome* terapeutico sfavorevole.

**Parole chiave:** NSCLC, BCL-2

#### Riferimento bibliografico

[Javid J](#) et al. *Clin Transl Oncol* 2014 Sep 26 [Epub ahead of print]

## IMPATTO CLINICO DI GENOTIPI ED APLOTIPI DI ABCC1 E ABCC2 NELLA RESISTENZA AD IMATINIB IN PAZIENTI CON LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA

A cura della Dott.ssa Eleonora Turrini

Imatinib (IM) rappresenta un esempio di terapia target specifica che ha notevolmente migliorato l'*outcome* terapeutico e la qualità di vita di pazienti affetti da leucemia mieloide cronica (CML). Nonostante ciò, lo sviluppo di resistenza e la risposta farmacologica subottimale rappresentano due problematiche terapeutiche consistenti. La resistenza è imputabile a fattori Bcr-Abl-dipendenti, come mutazioni a carico del gene, oppure indipendenti come fattori che influenzano i livelli plasmatici ed intracellulari di IM. I geni responsabili del trasporto di membrana assumono un ruolo fondamentale nei processi di sensibilità e resistenza ai farmaci nelle cellule tumorali. È nota l'associazione tra trasportatori della famiglia ABC e lo sviluppo di meccanismi di resistenza in pazienti CML; pertanto la farmacogenetica di questi trasportatori può influenzare la risposta clinica ad IM. In particolare, per i trasportatori ABCB1 e ABCG2 gli stessi autori del presente lavoro, nella medesima popolazione in studio, hanno in precedenza riscontrato un'associazione significativa con la risposta ad IM, in particolare, un aplotipo di ABCB1 (C<sub>1236</sub>G<sub>2677</sub>C<sub>3435</sub>) è stato associato ad un più alto rischio di sviluppare resistenza, mentre il diplotipo di ABCG2 (A<sub>34</sub>A<sub>421</sub>) è stato correlato ad una buona risposta ad IM. Rimane da esplorare il potenziale impatto farmacogenetico dei trasportatori ABCC1 e ABCC2 sulla risposta ad IM. Infatti, scopo del presente lavoro è stato quello di investigare l'associazione tra i polimorfismi di ABCC1 e ABCC2 e la modulazione della risposta ad IM in un gruppo di pazienti malesi affetti da CML.

215 pazienti affetti da CML (cromosoma Philadelphia-positivi) sono stati reclutati da 4 ospedali della Malesia. Il protocollo è stato approvato dal comitato etico malese. I pazienti erano eleggibili per lo studio se sottoposti a trattamento con IM per almeno 18 mesi e se avevano mostrato risposta molecolare o citogenetica in accordo ai criteri di valutazione dell'*European Leukemia-Net*. I pazienti arruolati sono stati suddivisi in 107 responsivi alla terapia e 108 resistenti ad IM. I polimorfismi di ABCC1 analizzati sono stati 2012G>T (rs45511401) e 2168G>A (rs4148356), mentre per ABCC2 -24C>T (rs717620), 1249G>A (rs2273697) e 3972C>T (rs3740066). Il genotipo, le frequenze alleliche e di aplotipi sono state confrontate tra i due gruppi di pazienti, responsivi e non.

L'età media dei pazienti malesi CML arruolati nello studio era 41,5 anni (tra 11 e 75 anni), con i pazienti di sesso maschile che presentavano età media più alta rispetto alle donne (42,5 versus 40,5, rispettivamente). Tutti i pazienti hanno ricevuto IM 400-800 mg tra i 18 ed i 129 mesi dal momento del reclutamento. Il 50,2% è risultato resistente al trattamento con IM, mentre il 49,8% dei pazienti è risultato responsivo. La risposta citogenetica a IM è stata raggiunta dal 56,7% dei pazienti, mentre il 43,3% ha mostrato risposta citogenetica parziale o assente. La risposta molecolare maggiore è stata raggiunta dal 54,9% dei pazienti entro i 18 mesi dall'inizio del trattamento. Per quel che riguarda il polimorfismo raro 2012G>T di ABCC1 non sono state rilevate differenze significative tra i pazienti responsivi e non responsivi. Per lo SNP G2168A sullo stesso gene la frequenza del genotipo eterozigote è risultata maggiore tra i pazienti resistenti ad IM rispetto ai responsivi. Nella valutazione del rischio questo polimorfismo nella forma eterozigote mostra un OR di 1,36 (95%CI: 0,549-3,478), sebbene l'associazione non sia significativa dal punto di vista statistico. Per quel che riguarda i polimorfismi del gene ABCC2, OR più elevati si sono riscontrati per i genotipi polimorfi -24TT e 3972TT (OR 1,60, 95%CI: 0,652-3,910; OR 1,69, 95%CI: 0,528-0,543, rispettivamente), ma anche in questo caso non si è raggiunta la significatività statistica. Lo studio non ha evidenziato associazioni significative tra risposta citogenetica ed i genotipi di ABCC1 e ABCC2. Sia per i genotipi omozigoti polimorfi di ABCC1 che per ABCC2 si osservano valori di OR più elevati nel gruppo di pazienti che non raggiungono la risposta molecolare maggiore, ma anche in questo caso i dati non raggiungono la significatività statistica. L'analisi degli aplotipi ha mostrato per il gene ABCC2 una frequenza significativamente maggiore di T<sub>24</sub>G<sub>1249</sub>T<sub>3972</sub> nei pazienti che sono risultati resistenti rispetto ai pazienti che hanno mostrato una buona risposta alla terapia con IM (11,2% versus 5,8%,  $P = 0,046$ ). Questi risultati suggeriscono che le varianti dell'aplotipo -24T e 3972T potrebbero essere associate con una diminuita espressione della proteina ABCC2 ed una riduzione dell'attività del trasportatore, che potrebbero quindi contribuire allo sviluppo di resistenza ad IM.

Non emergono associazioni significative tra i genotipi di ABCC1 e ABCC2 e risposta ad IM in pazienti malesi affetti da CML. Ciononostante, nella valutazione del rischio, pazienti portatori dell'aplotipo T<sub>24</sub>G<sub>1249</sub>T<sub>3972</sub> sono stati associati a resistenza al trattamento con IM. I risultati ottenuti non sono sufficienti per ritenere questo aplotipo come un *marker* predittivo di risposta ad IM.



Una limitazione cruciale dello studio è il numero inadeguato di pazienti analizzati, si tratta quindi di uno studio pilota che dovrà essere confermato in una coorte più ampia di pazienti. Inoltre, la stima dei livelli intracellulari e plasmatici di IM e la correlazione con i genotipi, i livelli di espressione di mRNA di ABCC1 e ABCC2 dovranno essere investigati.

**Parole chiave:** ABCC1, ABCC2, leucemia mieloide cronica, SNPs, resistenza ad imatinib

#### Riferimento bibliografico

[Au A](#) et al. *J Clin Pharm Ther* 2014 Jul 24 [Epub ahead of print]

## NEUROLOGIA

### L'AGRANULOCITOSI INDOTTA DA CLOZAPINA È ASSOCIATA AGLI ALLELI RARI HLA-DQB1 E HLA-B

A cura della Dott.ssa Giusy Russomanno

L'agranulocitosi/granulocitopenia è una reazione avversa (ADR) rara che si verifica nell'1% degli individui in trattamento con clozapina che può rivelarsi fatale se non precocemente diagnosticata (Alvir J et al. *N Engl J Med* 1993,329:162–67). A causa di tale ADR, la clozapina è sottoutilizzata nonostante la sua efficacia e la sua utilità nel trattamento della schizofrenia resistente. Identificare i fattori di rischio genetici per l'agranulocitosi/granulocitopenia potrebbe consentire un uso più sicuro e più diffuso di clozapina.

Vista la natura specifica di questa reazione avversa e il ruolo svolto del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) nelle ADR, diversi studi *candidate gene* si sono focalizzati sull'antigene leucocitario umano (HLA) (Dettling M et al. *Pharmacogenomics J* 2007,7:325–32; Athanasiou MC et al. *J Clin Psychiatry* 2011,72:458–63). Tuttavia, fino ad ora, non vi erano evidenze di una significativa associazione tra agranulocitosi/granulocitopenia e MHC.

Per identificare il maggior numero di casi di agranulocitosi/granulocitopenia a livello mondiale, nonché i rispettivi controlli trattati che non avevano manifestato tale ADR, è stato istituito il *Clozapine-Induced Agranulocytosis Consortium*. I casi analizzati in questo studio includevano tutti i casi riportati all'*International Severe Adverse Events Consortium* (iSAEC, <http://www.saeconsortium.org>), quelli registrati dalle case farmaceutiche (<https://www.clozarilcare.com/care>, <https://www.clozapineregistry.com>) e quelli presenti nella banca dati del sistema ospedaliero dello Stato della Pennsylvania (USA). Sono stati così identificati 98 casi (60.1%) di agranulocitosi (neutrofili < 500 mm<sup>-3</sup>), 61 casi (37.4%) di granulocitopenia (conta dei neutrofili compresa tra 500 mm<sup>-3</sup> e 1500 mm<sup>-3</sup>) e 4 pazienti (2.5%) a rischio di agranulocitosi/granulocitopenia (conta dei neutrofili inferiore a 1500 mm<sup>-3</sup>) in stretto monitoraggio. I controlli trattati avevano assunto clozapina da almeno un anno senza manifestare segni di agranulocitosi/granulocitopenia. Tutti i campioni sono stati genotipati con tecnologia Illumina.

Gli autori hanno condotto uno studio di associazione *genome-wide* su 8809853 varianti in 161 casi di agranulocitosi/granulocitopenia indotta da clozapina e 1196 controlli di origine europea.

Il polimorfismo a singolo nucleotide (SNP) maggiormente associato ad agranulocitosi/granulocitopenia era localizzato in un introne di HLA-B (rs41549217,  $p=2.07 \times 10^{-7}$ , OR=4.66, CI 95%=2.6-8.3).

Gli autori, inoltre, hanno analizzato le varianti alleliche nella regione codificante per le proteine utilizzando i dati di sequenziamento dell'intero esone di 67 casi di agranulocitosi/granulocitopenia indotta da clozapina e 376 controlli non trattati. Una variante missenso a bassa frequenza in *BTNL2* è risultata significativa (rs28362679,  $p=4.14 \times 10^{-7}$ , OR=3.9, IC 95%=1.2-12.9). *BTNL2* è localizzato nella regione del MHC ed è in forte *linkage disequilibrium* con HLA-DQB1 e HLA-DRB1, entrambi associati a diverse malattie autoimmuni e reazioni avverse ai farmaci, tra le quali anche l'agranulocitosi/granulocitopenia da clozapina (Athanasiou MC et al. *J Clin Psychiatry* 2011,72:458–63). *BTNL2* codifica per la proteina 2 simile alla butirofilina ed è un membro della superfamiglia dei geni per le immunoglobuline implicato nella regolazione dell'attivazione delle cellule T (Mitsunaga S et al. *J Hum Genet* 2013,58:210-15). Tuttavia, utilizzando i dati

di 146 casi e 3364 controlli per la costruzione di modelli predittivi di agranulocitosi/granulocitopenia, il modello che prendeva in considerazione HLA-DQB1 e HLA-B 158T risultava essere 27000 volte più efficiente nel predire l'agranulocitosi/granulocitopenia del modello che prendeva in considerazione due varianti di *BTNL2*, rs28362679, risultata in forte *linkage disequilibrium* con HLA-DQB1 126Q ( $R^2=0.618$ ), e rs143211074, che aveva una scarsa correlazione con HLA-B 158T ( $R^2=0.042$ ). Includendo nel primo modello rs143211074, il potere predittivo aumentava di 13 volte, ma non si aveva nessun miglioramento inserendo rs28362679. Tenendo conto del fatto che rs143211074 e HLA-DQB1 erano fortemente correlati ( $R^2=0.77$ ), rs143211074 non è risultato essere pertanto significativo di per sé.

Infine, la gravità dell'agranulocitosi/granulocitopenia (in termini di conta assoluta dei neutrofili) è stata correlata allo stato di portatore degli alleli HLA-DQB1 e HLA-B (149 casi). Nei casi portatori dell'allele HLA-B 158T, la conta neutrofila era significativamente inferiore rispetto ai non portatori ( $p<0.01$ ). Tuttavia, quasi tutti i casi portatori dell'allele HLA-B 158T analizzati in questo studio erano di ascendenza ebraica (Ashkenaziti). La correzione dell'analisi per il fenotipo di ascendenza portava ad una notevole riduzione della significatività ( $p=0.049$ ).

In ogni caso, anche se i risultati di questo studio chiariscono notevolmente il contributo delle variazioni a carico di HLA nell'agranulocitosi/granulocitopenia, gli odds ratios non ne suggeriscono una applicazione clinica immediata come strumenti per la screening. Se si considerasse un test genetico positivo per un portatore di entrambi i fattori di rischio, la sua sensibilità e specificità sarebbero rispettivamente 0.36 e 0.89. Poiché più della metà dei pazienti che hanno manifestato agranulocitosi/granulocitopenia non erano portatori di entrambi gli alleli rari, un test predittivo basato solo su HLA-DQB1 e HLA-B non sarebbe funzionale ad identificare pazienti in cui l'uso di clozapina sarebbe effettivamente da ritenersi sicuro. Va sottolineato, comunque, che sette casi di agranulocitosi/granulocitopenia (4.3%) erano portatori di entrambi gli alleli, suggerendo che questa combinazione allelica espone ad un maggiore rischio di agranulocitosi/granulocitopenia rispetto alla popolazione generale (0.3-0.4%).

In conclusione, quanto emerge da questo studio è di notevole aiuto nella comprensione dei processi biologici alla base dell'agranulocitosi/granulocitopenia indotta da clozapina ed è la prima evidenza del ruolo del complesso maggiore di istocompatibilità in tale ARD. Quanto dimostrato dagli autori potrebbe rivelarsi il primo importante tassello per l'identificazione di un test di screening dei pazienti in cui l'uso di clozapina possa ritenersi sicuro.

Due loci nel complesso maggiore di istocompatibilità sono indipendentemente associati a agranulocitosi/granulocitopenia indotta da clozapina: HLA-DQB1 e HLA-B. Tali associazioni evidenziano il ruolo di questi geni nei fenotipi immunogenetici e nelle reazioni avverse ai farmaci (ADRs), oltre a fornire importanti delucidazioni sulla fisiopatologia dell'agranulocitosi/granulocitopenia indotta da clozapina.

**Parole chiave:** agranulocitosi, granulocitopenia, clozapina, HLA, complesso maggiore di istocompatibilità

#### Riferimento bibliografico

[Goldstein JJ](#) et al. *Nat Commun* 2014, 5:4757.

---

## FARMACOGENETICA DEGLI EVENTI AVVERSI NEL TRATTAMENTO DELLA SCHIZOFRENIA DOPO TERAPIA CON ZIPRASIDONE, OLANZAPINA E PERAZINA

A cura della Dr.ssa Donatella Carretta

La schizofrenia è una malattia psichiatrica che colpisce circa l'1% della popolazione mondiale. Nonostante la suscettibilità sia simile nella popolazione generale, alcune famiglie sviluppano la schizofrenia più frequentemente di altre. La terapia farmacologica è la principale modalità di trattamento dei sintomi psicotici nella schizofrenia; tuttavia, i benefici della terapia antipsicotica sono a volte inconsistenti e difficili da predire nei singoli pazienti. Uno studio multicentrico ha mostrato che più del 70% dei pazienti in trattamento cronico per la schizofrenia sospende la farmacoterapia a causa della scarsa efficacia o intollerabilità ai farmaci antipsicotici. Si ritiene che le differenze interindividuali dell'effetto terapeutico e degli eventi avversi dei farmaci antipsicotici dipendano, almeno in parte, da fattori ereditari. Gli antipsicotici usati per la terapia della schizofrenia sono classificati in due gruppi: i neurolettici tipici o classici che hanno un'alta affinità per

il sistema dopaminergico e i nuovi antipsicotici atipici che hanno affinità per differenti recettori dei sistemi dopaminergico e serotoninergico. L'efficacia degli antipsicotici classici nel trattamento dei sintomi positivi della schizofrenia è associata ad un rischio elevato di eventi avversi a seguito della terapia a lungo termine: sintomi extrapiramidali (*extrapyramidal symptoms*, EPS), parkinsonismo, acatisia, reazioni distoniche acute e discinesia tardiva (TD). I neurolettici di seconda generazione sono altrettanto efficaci per i sintomi positivi, ma mostrano un potenziale significativo anche per il trattamento dei sintomi negativi della schizofrenia. Inoltre, i pazienti a cui si somministrano farmaci antipsicotici atipici sono meno esposti al rischio di EPS, anche se sono probabilmente esposti ad un maggior rischio di aumento di peso e di disturbi metabolici.

Lo scopo primario del presente studio è valutare le eventuali associazioni tra i geni correlati ai sistemi dopaminergico, serotoninergico e glutammatergico e gli eventi avversi dopo trattamento antipsicotico nei pazienti con schizofrenia paranoide. Il secondo scopo dello studio è confrontare la gravità di questi sintomi indotti da terapia con farmaci antipsicotici atipici (ziprasidone e olanzapina) rispetto a quelli tipici (perazina). Nel presente studio sono stati reclutati 191 pazienti caucasici di discendenza Polacca (89 maschi e 102 femmine) affetti da schizofrenia paranoide. Per la diagnosi di schizofrenia paranoide sono state utilizzate la versione polacca del *Composite International Diagnostic Interview* (CIDI) e i criteri dell'ICD-10. I pazienti con gravi malattie neurologiche o internistiche sono stati esclusi dallo studio. L'età media al primo episodio psicotico era di  $26,2 \pm 7,4$  anni. Prima dell'ammissione allo studio, i soggetti non hanno assunto alcun farmaco antipsicotico per 3-7 giorni; sono quindi entrati nello studio a causa dell'esacerbazione della schizofrenia paranoide e assegnati in maniera *random* ai gruppi di monoterapia con perazina, olanzapina o ziprasidone per 3 mesi. Tutti i pazienti erano stati trattati in precedenza con farmaci antipsicotici, ma nessuno era stato trattato con perazina, olanzapina o ziprasidone prima di essere incluso nello studio. Il *range* delle dosi di ziprasidone (120-160 mg = equivalente a 200-300 mg/die di clorpromazina), di olanzapina (10-20 mg = equivalente a 200-400 mg/die di clorpromazina), e perazina (300-600 mg = equivalente a 300-600 mg/die di clorpromazina) usati nel presente studio sono in accordo con il trattamento standard utilizzato nel Paese per la schizofrenia.

I pazienti sono stati valutati usando la *Positive and Negative Syndrome Scale* (PANSS) al momento dell'ammissione nello studio (T0) e dopo 2 (T1) e 12 settimane (T2) di monoterapia con perazina, olanzapina o ziprasidone. La percentuale di variazione del punteggio totale del PANSS da T0 (baseline) a T1 e da T0 a T2 è stata considerata misura dell'efficacia del trattamento antipsicotico.

I polimorfismi dei geni *D2(DRD2)*, *5HT2A*, *GRIK3*, e *COMT* sono stati analizzati tramite PCR-RFLP. I polimorfismi dei geni *DAT1*, *SERT*, e *MAOA* sono stati analizzati tramite PCR-VNTR.

Lo studio ha rivelato una significativa riduzione del punteggio PANSS nel tempo senza differenze significative della percentuale di riduzione del punteggio tra i pazienti trattati con i differenti antipsicotici. Dopo 3 mesi di terapia, l'aumento di peso era maggiore nel gruppo trattato con olanzapina e minore nel gruppo trattato con ziprasidone. I polimorfismi genici esaminati non erano associati in maniera significativa alle alterazioni di peso corporeo dopo 12 settimane di trattamento. Per quanto riguarda gli EPS, alterazioni significative nei punteggi della *Barnes Akathisia Scale* e della *Simpson-Angus Extrapyramidal Rating Scale* sono stati registrati dopo 12 settimane di trattamento con antipsicotici: i pazienti trattati con perazina mostravano una gravità significativamente maggiore di EPS. I polimorfismi genici esaminati non erano associati in maniera significativa alle alterazioni dell'EPS dopo 12 settimane di terapia.

Nel presente studio sono stati selezionati solo polimorfismi noti per avere un significato funzionale, che si ritiene siano coinvolti nelle malattie psichiatriche e che potrebbero in teoria influire sull'efficacia e la sicurezza dei farmaci antipsicotici.

Il più frequente e grave effetto collaterale dei farmaci antipsicotici è rappresentato da EPS, TD e dall'aumento di peso con sindrome metabolica. Un possibile meccanismo fisiopatologico degli EPS prevede l'ipersensibilità dei recettori dopaminergici; l'antagonismo dopaminergico ad opera dei farmaci antipsicotici risulta infatti in una *up-regulation* dei recettori D2 che contribuisce alla iperattività dopaminergica nigrostriatale. Pertanto, le varianti dei geni della dopamina e di altri recettori potrebbero giocare un ruolo chiave in tale meccanismo. A dispetto di tale presupposto teorico, i polimorfismi esaminati in questo studio non hanno mostrato associazioni significative indicando che probabilmente non sono coinvolti nella comparsa di EPS; è importante tuttavia sottolineare che il gene *DRD2* è ampio ed è quindi difficile esaminare tutti i possibili SNPs.

Gli antipsicotici di seconda generazione hanno un'alta affinità per i recettori della serotonina. È stato ipotizzato che l'inibizione serotoninergica della funzione della dopamina contribuisca allo sviluppo degli effetti collaterali extrapiramidali. Alcuni studi hanno mostrato associazioni tra varianti del recettore 5-HT<sub>2A</sub> e 5-HT<sub>2C</sub> e EPS, anche se altri studi, incluso questo, non sono stati in grado di confermare tali risultati.

L'aumento del peso corporeo e la sindrome metabolica sono frequenti effetti collaterali degli antipsicotici, in particolare di quelli di seconda generazione, quali l'olanzapina e la clozapina. I dati qui riportati mostrano che l'aumento di peso era maggiore nei pazienti trattati con olanzapina, in accordo con la letteratura. Nel presente studio non è emersa alcuna associazione tra l'aumento di peso e le varianti genetiche esaminate, anche se precedenti studi suggeriscono che un fattore genetico contribuisca alla comparsa di questo effetto collaterale. Tale discrepanza richiede quindi ulteriori indagini al fine di identificare altri geni coinvolti nell'aumento di peso indotto dagli antipsicotici.

L'interpretazione dei dati negativi del presente studio non è semplice, poiché in letteratura sono disponibili solo pochi studi che, nella maggior parte dei casi, sono stati realizzati su piccole popolazioni di pazienti.

In conclusione, i polimorfismi dei geni *DRD2*, *5HT2A*, *GRIK3*, *COMT*, *DAT1*, *SERT* e *MAOA* selezionati nel presente studio non sono primariamente coinvolti nelle alterazioni di peso corporeo e nella comparsa di sintomi extrapiramidali correlati alla terapia con antipsicotici in pazienti con schizofrenia paranoide.

**Parole chiave:** schizofrenia, antipsicotici, polimorfismi genici, effetti collaterali, aumento di peso, sintomi extrapiramidali

#### Riferimento bibliografico

[Tybura P](#) et al. *Psychiatry Res* 2014, 219:261-67.

## IMMUNOMODULAZIONE

### LA RISPOSTA AL TRATTAMENTO CON FARMACI ANTI-TNF IN PAZIENTI AFFETTI DA ARTRITE REUMATOIDE È ASSOCIATA AD UNA VARIANTE DEL GENE NLRP3

A cura della Dott.ssa Sarah Cargnin

Gli inibitori del fattore di necrosi tumorale  $\alpha$  (anti-TNF) sono farmaci biologici efficaci nella terapia farmacologica dell'artrite reumatoide. Tuttavia, emergono rilevanti limitazioni al loro impiego, dettate dall'assenza di risposta alla terapia in circa un terzo dei pazienti trattati e dalla comparsa di reazioni avverse gravi. Numerosi studi sono stati finalizzati all'individuazione di fattori predittivi della risposta al trattamento con farmaci anti-TNF. Ad ora, solo un locus nel gene PTPRC è stato validato come potenziale marker genetico predittivo della risposta alla terapia con farmaci anti-TNF. Recentemente, è stata inoltre evidenziata una correlazione tra la risposta alla terapia con antagonisti del TNF ed alcune varianti in geni codificanti per l'inflammasoma-NLRP3 (NLRP3, CARD8), per il fattore nucleare  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) e per le vie di segnalazione del recettore Toll-like (TLR2, TLR4, MyD88, CHUK). Il gene NLRP3 codifica per una delle proteine che costituiscono l'inflammasoma-NLRP3, un complesso proteico intracellulare responsabile dell'attivazione della caspasi-1 e del rilascio di potenti citochine infiammatorie (IL-1 $\beta$  e IL-18). Il complesso NF- $\kappa$ B è invece un fattore di trascrizione, attivato da TNF- $\alpha$ , che regola l'espressione di più di 150 geni implicati nel processo dell'infiammazione, tra cui TLR2, TLR9, IL6 e IL10. I farmaci anti-TNF agiscono bloccando il legame di TNF con il suo recettore TNFR1 ed impediscono così l'attivazione della via di segnalazione pro-infiammatoria di NF- $\kappa$ B. Obiettivo dello studio è stato quello di validare o, eventualmente individuare, potenziali correlazioni tra 41 varianti funzionali in 28 geni coinvolti nelle vie di segnalazione di NF- $\kappa$ B, TNF, TLRs, NLRP3 e la risposta al trattamento con farmaci anti-TNF in pazienti affetti da artrite reumatoide.

Lo studio è stato condotto su 538 pazienti danesi affetti da artrite reumatoide e naïve per il trattamento con farmaci anti-TNF. I dati clinici dei soggetti arruolati sono stati raccolti al *baseline* (visita effettuata 0-30 giorni prima dell'inizio del trattamento con anti-TNF) e nel follow-up (60-180 giorni post trattamento). Nello specifico, sono stati registrati i dati relativi alla tumefazione a carico di 28 articolazioni, ai livelli di proteina C-reattiva (CRP, mg/l) e alla percezione algica valutata tramite scala VAS (100mm); tali dati, analizzati in combinazione tra loro, hanno fornito il punteggio DAS28 relativo all'attività di malattia. L'*outcome* primario dello studio risiede nella valutazione della risposta clinica alla terapia valutata tramite criteri EULAR. Come *outcomes* secondari sono stati invece considerati la variazione relativa nei punteggi di DAS28 [ $\text{relDAS28} = (\text{DAS28 al baseline} - \text{DAS28 al follow-up}) / \text{DAS28 al baseline}$ ] e la risposta valutata tramite criteri ACR50 (*American College of Rheumatology outcome measure*). Le varianti genetiche analizzate sono state scelte sulla base di evidenze in letteratura che suggeriscono un loro ruolo biologico nella patologia o una potenziale correlazione con altre malattie autoimmuni. Il DNA genomico è stato estratto da sangue intero e la genotipizzazione per i polimorfismi di interesse è avvenuta tramite tecnica di PCR Competitiva Allele Specifica (KASP).

I pazienti arruolati nello studio sono stati trattati con infliximab (31.2%), etanercept (30.9%), adalimumab (24.9%), golimumab (9.1%) o certolizumab (3.9%). Il 29.6% dei soggetti trattati con tali farmaci non ha risposto alla terapia farmacologica mentre il 42,9% e il 27,5% dei soggetti ha risposto, rispettivamente, in maniera ottimale o moderata al trattamento. Delle 41 varianti genetiche analizzate, solo 3 SNPs (NLRP3 rs4612666, IFNG rs2430561 e TNFRSF1A rs4149570) risultano essere correlati alla risposta alla terapia con farmaci anti-TNF, valutata tramite criteri EULAR. Tuttavia, tali associazioni non raggiungono la significatività statistica dopo correzione per test multipli (*False Discovery Rate*). Nello specifico, i portatori della variante NLRP3 rs4612666 hanno una probabilità inferiore rispetto ai soggetti *wild-type* di avere una risposta ottimale (OR 0.65, IC 95% 0.43-1.00,  $P=0.050$ ,  $q=0.97$ ) oppure ottimale/moderata (OR 0.64, IC 95% 0.44-0.95,  $P=0.025$ ,  $q=0.95$ ) ai farmaci anti-TNF. Tale trend di associazione si riconferma nel sottogruppo di soggetti con artrite reumatoide sieropositiva (risposta ottimale: OR 0.59, IC 95% 0.36-0.96,  $P=0.032$ ; risposta ottimale/moderata: OR 0.58, IC 95% 0.37-0.90,  $P=0.016$ ). I soggetti omozigoti per l'allele mutato della variante IFNG rs2430561 hanno una probabilità più bassa di rispondere in maniera ottimale alla terapia con anti-TNF (OR 0.40, IC 95% 0.21-0.76,  $P=0.005$ ,  $q=0.18$ ); tale trend si riconferma nuovamente nei pazienti con artrite reumatoide sieropositiva (risposta ottimale: OR 0.42, IC 95% 0.20-0.87,  $P=0.020$ ; risposta ottimale/moderata: OR 0.51, IC 95% 0.26-0.96,  $P=0.038$ ). I pazienti eterozigoti per la variante TNFRSF1A rs4149570 ed affetti da artrite reumatoide sieropositiva hanno una probabilità minore di rispondere in maniera ottimale/moderata al trattamento con anti-TNF (OR 0.59, IC 95% 0.36-0.98,  $P=0.040$ ,  $q=0.76$ ). Infine, dopo stratificazione dei pazienti per abitudine al fumo, emerge che la variante NLRP3 rs4612666 risulta essere statisticamente associata alla risposta ottimale/moderata alla terapia con anti-TNF nel sottogruppo di pazienti fumatori (OR 0.24;  $P=0.001$ ;  $q=0.04$ ).

I risultati ottenuti da questo studio confermano il potenziale coinvolgimento del gene NLRP3 nel modulare la risposta alla terapia con farmaci anti-TNF. Un lavoro condotto da Mathews e colleghi (*Ann Rheum Dis* 2014,73(6):1202-10) ha, infatti, precedentemente riscontrato una correlazione significativa tra tre varianti del gene NLRP3 (rs4925659, rs10925026, rs4925648) e la risposta alla terapia con antagonisti del TNF, valutata tramite criteri EULAR. È rilevante evidenziare come una di queste tre varianti genetiche (NLRP3 rs10925026) sia in *linkage disequilibrium* con la variante NLRP3 rs4612666 ( $D^2=0.81$ ), suggerendo come l'associazione tra il gene NLRP3 e la risposta al trattamento con farmaci anti-TNF possa essere plausibile. Il ruolo dell'inflammasoma-NLRP3 nella patogenesi dell'artrite reumatoide sembra essere inoltre confermato dal riscontro di un aumento dei suoi livelli di mRNA in tessuti sinoviali di pazienti affetti da artrite reumatoide. La variante funzionale NLRP3 rs4612666 determina, invece, in un'alterazione dell'attività di una regione *enhancer* localizzata nell'introne 7 del gene NLRP3 a cui consegue una riduzione dei livelli di mRNA. Dall'analisi statistica emerge anche come, nel sottogruppo di pazienti fumatori, la correlazione tra la variante NLRP3 rs4612666 e la risposta alla terapia con farmaci anti-TNF sia statisticamente significativa anche dopo correzione per test multipli. A tale proposito gli Autori ipotizzano che l'aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno indotte dal fumo possa risultare in un aumento dell'espressione degli inflammasomi-NLRP3 e quindi in una consistente alterazione della risposta al trattamento. In assenza di un'interpretazione meccanicistica convincente, ulteriori studi sono pertanto necessari per meglio comprendere le basi biologiche alla base di tale associazione.

La variante NLRP3 rs4612666 è associata ad un rischio maggiore di scarsa risposta alla terapia con farmaci anti-TNF nei affetti da artrite reumatoide, in modo particolare tra i fumatori.

**Parole chiave:** NLRP3, anti-TNF, artrite reumatoide

#### Riferimento bibliografico

[Mathews RJ](#) et al. *Ann Rheum Dis* 2014, 73(6):1202-10

## LE VARIANTI HLA-DQA1-HLA-DRB1 CONFERISCONO SUSCETTIBILITÀ ALLA PANCREATITE INDOTTA DA FARMACI IMMUNOSOPPRESSORI TIOPURINICI

A cura della Dott.ssa Eva Cuzzoni

La mercaptopurina e il suo profarmaco azatioprina sono i farmaci immunosoppressori più comunemente prescritti per mantenere la remissione e prevenire le recidive postoperatorie nei pazienti con malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI). Al di fuori della gastroenterologia sono ampiamente utilizzati come farmaci antirigetto dopo trapianti d'organo e come agenti "steroid-sparing" in malattie come l'artrite reumatoide. Nonostante il loro ampio utilizzo, è stato stimato che il 17% dei pazienti che assumono questi farmaci sviluppano effetti collaterali che necessitano dell'interruzione del trattamento. La pancreatite acuta dopo la terapia con le tiopurine è una reazione avversa dose indipendente con un'incidenza di circa 4-7% nei pazienti con MICI. La patogenesi della pancreatite indotta da tiopurine è ancora sconosciuta e il quadro clinico è poco descritto. Lo sviluppo di questo effetto collaterale impedisce al paziente di continuare la convenzionale terapia immunosoppressiva con tiopurine e richiede l'uso di altri agenti, che possono essere meno efficaci e più costosi. Studi recenti in letteratura hanno sottolineato come alcuni effetti collaterali rari a terapie farmacologiche siano associati a varianti genetiche che possono essere identificate con studi di associazione *genome-wide* (GWAS). Lo scopo degli autori in questo lavoro è stato quello di analizzare le caratteristiche cliniche della pancreatite indotta dalle tiopurine ed identificare marcatori genetici che possano predire lo sviluppo di questa grave reazione avversa al farmaco.

I pazienti sono stati reclutati da 115 ospedali del servizio sanitario nazionale (NHS) inglese e 53 internazionali. I criteri di inclusione per il reclutamento dei pazienti sono stati: (I) insorgenza acuta di forte dolore addominale entro 3 mesi dall'inizio del trattamento con mercaptopurina o azatioprina per la colite ulcerosa o la malattia di Crohn; (II) un aumento doppio o maggiore di amilasi e lipasi rispetto ai limiti superiori di normalità; e (III) la sospensione della terapia tiopurinica. Un gruppo di esperti gastroenterologi ha controllato ciascun caso e valutato un nesso causale tra trattamento con azatioprina o mercaptopurina e lo sviluppo di pancreatite utilizzando una versione modificata del *Liverpool Causality Assessment Tool*. Sono stati inclusi nello studio solamente gli individui classificati come casi certi di sviluppo di pancreatite ricorrente dopo il trattamento con tiopurine oppure casi probabilmente associati alle tiopurine, che hanno cioè dimostrato una chiara relazione temporale con la somministrazione di tiopurine, in assenza di altri fattori di rischio identificabili per l'insorgenza di pancreatite, compreso l'uso concomitante di altri farmaci potenzialmente causa di pancreatite.

Nella prima parte è stato condotto uno studio GWAS su 217 pazienti con pancreatite indotta da tiopurina (di cui 37 certi) e 2035 casi controllo genotipizzati in precedenza (malattia di Crohn o colite ulcerosa), ma non selezionati per il trattamento con tiopurine o per lo sviluppo di pancreatite. Dai primi 217 l'analisi è stata limitata a 177 pazienti di discendenza europea. Il DNA è stato estratto da campioni di sangue periferico ed i campioni sono stati genotipizzati con metodica Illumina InfiniumHumanCoreExome beadchip, per lo studio di 264909 tag SNP e 244593 marker esonici. Dopo il controllo di qualità per la genotipizzazione sono stati mantenuti 172 casi. Da questa analisi, gli autori hanno identificato una forte associazione all'interno della regione HLA di classe II, in particolare con lo SNP rs2647047. Siccome l'associazione è apparsa all'interno della regione HLA, gli autori hanno eseguito un'imputazione dedicata dei polimorfismi di questa regione, utilizzando la piattaforma SNP2HLA, che considera il pannello di riferimento T1DGC di 5224 individui con gli HLA classici tipizzati, assieme a SNPs ed indel mediante Immunochip. Questa analisi approfondita ha

indicato che l'associazione più significativa con l'insorgenza di pancreatite è risultata per lo SNP rs2647087 (odds ratio 2,59, CI 95% 2,07-3,26,  $P = 2 \times 10^{-16}$ ) e con gli alleli HLA-DQA1-\*02:01 e HLA-DRB1\*07:01. Tali alleli sono risultati in *linkage* solo parziale con rs2647087 ( $r^2 = 0,49$ ) e delle analisi statistiche sull'associazione fra l'incidenza di pancreatite e gli alleli HLA considerati e lo SNP rs2647087 in combinazione, hanno suggerito che la variante causale potrebbe essere un allele raro ancora non identificato in *linkage* con i due alleli HLA. Le analisi di imputazione degli alleli HLA sono state validate mediante genotipizzazione con PCR a *primer* sequenza specifici effettuata su 160 casi.

E' noto che il fumo rappresenta un fattore di rischio per l'incidenza di pancreatite. Gli autori hanno quindi eseguito un'analisi suddividendo i casi sulla base dello status fumatore al momento dell'insorgenza della pancreatite. Lo SNP rs2647087 ha presentato odds ratios pari a 2.99 nei pazienti fumatori e 2.19 in quelli non fumatori, rilevando l'assenza ( $P = 0,17$ ) di un'interazione tra fumo ed il genotipo.

Gli alleli varianti di TPMT (TPMT\*3A, TPMT\*3C, TPMT\*2, TPMT\*4 o TPMT\*8) che predispongono i pazienti all'insorgenza di tossicità midollare durante il trattamento con tiopurine, non sono risultati associati alla comparsa di pancreatite ( $P = 0,99$ ). Studi precedenti con un approccio a gene candidato hanno indicato un'associazione fra i polimorfismi di ITPA e la pancreatite indotta da tiopurine: tuttavia questo studio non è stato in grado di replicare questa osservazione (rs1127354,  $P = 0,18$ ).

Successivamente i risultati sono stati replicati in modo indipendente su una coorte di 78 casi con MICI e come gruppo di controllo sono stati utilizzati 472 pazienti con MICI già con tiopurine senza sviluppo di pancreatite e genotipizzati per rs2647087 ed altre tre varianti (rs6935723, rs2647089 e rs7745656), tutte in *linkage* completo con rs2647087. Fra queste varianti, rs6935723 è stata genotipizzata con maggiore successo (98,2%) ed ha indicato una replicazione robusta dell'associazione (odds ratio 2,21,  $P = 4 \times 10^{-6}$ ).

La prevalenza di pancreatite in pazienti trattati con tiopurine è di circa 4-7%. I risultati di questo studio suggeriscono che gli individui eterozigoti per rs2647087 presentano una probabilità 2,5 volte maggiore di sviluppare pancreatite e gli individui omozigoti mutati un rischio di 5 volte più alto rispetto agli individui omozigoti *wild-type*. In particolari, pazienti eterozigoti per il polimorfismo rs2647087 presentavano un rischio del 9% di sviluppo di pancreatite dopo la somministrazione di una tiopurina, mentre gli omozigoti mutati un rischio del 17%.

Gli autori hanno effettuato analisi cliniche e genetiche su larga scala di pancreatite indotta dal trattamento con tiopurine e hanno identificato una associazione significativa con una variante comune nella regione HLA di classe II. Questo è il primo lavoro che descrive un'associazione genetica con la pancreatite da farmaci e sebbene in questo studio l'utilizzo delle tiopurine è stato limitato a pazienti con IBD, i risultati potrebbero essere generalizzabili a molte altre popolazioni in cui sono utilizzate azatioprina e mercaptopurina.

**Parole chiave:** azatioprina, mercaptopurina, pancreatite, HLA

#### Riferimento bibliografico

[Heap GA](#) et al. *Nat Genet* 2014, 46(10):1131-4.

## CARDIOVASCOLARE

### CYP3A4\*22 E CYP3A5\*3 SONO ASSOCIATI AD UN AUMENTO DEI LIVELLI DI CONCENTRAZIONE PLASMATICA DELLA SIMVASTATINA IN UNO STUDIO DI COORTE SUL COLESTEROLO E LA FARMACOGENETICA

A cura della Dott.ssa Cheli Stefania

La simvastatina è uno dei farmaci più utilizzati per il trattamento dell'ipercolesterolemia. Formulato come profarmaco, la simvastatina lattone [simvastatina (SV)] viene metabolizzata a simvastatina idrossi-acida [simvastatina acida (SVA)], che è la forma attiva del farmaco. SVA è un potente inibitore competitivo dell'enzima limitante (HMG-CoA reduttasi) della sintesi intra-epatica del colesterolo, di conseguenza riduce

la concentrazione plasmatica di colesterolo. SV e SVA sono metabolizzati principalmente dal CYP3A4/5. Polimorfismi che riducono l'attività del CYP3A risultano in un' aumentata esposizione alla simvastatina e di conseguenza ai suoi effetti farmacodinamici. In uno studio a dose singola di SV (20 mg) è stato dimostrato che l'area sotto la curva concentrazione-tempo a 12 ore ( $AUC_{12}$ ) nei soggetti omozigoti per l'allele a "perdita-di-funzione (LOF)" CYP3A5\*3 era 3,3 volte superiore a quella nei soggetti omozigoti *wild-type* (\*1/\*1). Allo stesso modo, in una coorte di Caucasici trattati con simvastatina, atorvastatina o lovastatina (tutte statine metabolizzate principalmente dal CYP3A4/5) è stato trovato che i soggetti "non esprimenti" il CYP3A5 (\*3/\*3) mostrano una maggiore riduzione del colesterolo totale rispetto ai soggetti "esprimenti" il CYP3A5 (\*1/\*1 o \*1/\*3). Inoltre, la riduzione di funzione (DOF) dell'allele CYP3A4\*22 è stata associata ad un metabolismo ridotto delle statine ed una loro maggiore efficacia. L'attività enzimatica nel fegato con genotipo *wild-type* del CYP3A4 (\*1/\*1) era 2,5 volte superiore a quella con genotipo CYP3A4/\*1/\*22 o CYP3A4\*22/\*22. Attualmente, la FDA impone di aggiungere nel foglietto illustrativo della simvastatina l'avviso di controindicazione all'impiego concomitante di inibitori del CYP3A4/5.

**Pazienti e metodi.** I ricercatori hanno arruolato 1007 pazienti nello studio Colesterolo e Farmacogenomica (CAP, ([clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov) identificativo NCT00451828). Scopo primario dello studio era la valutazione dell'associazione tra varianti nucleotidiche e la farmacodinamica della simvastatina. In totale, sono stati genotipizzati 944 partecipanti, ma i dati completi (genotipo del CYP3A4/5 e concentrazioni plasmatiche di simvastatina) erano disponibili solo per 830 partecipanti (555 auto-riferiti come Caucasici e 275 auto-riferiti come Afro-Americani).

**Analisi del genotipo.** Per i soggetti Caucasici, lo stato del CYP3A5\*3 (rs776746) è stato determinato utilizzando le piattaforme di genotipizzazione Illumina HumanHap300 o HumanHap610-Quad (San Diego, California, Stati Uniti d'America). Per i soggetti Afro-Americani, lo stato del CYP3A5\*3 è stato determinato utilizzando le sonde di genotipizzazione TaqMan (Life Technologies, Grand Island, New York, USA). Per tutti i soggetti, l'allele CYP3A4\*22 (rs35599367) è stato determinato mediante genotipizzazione con sonde TaqMan. Per convalidare il saggio TaqMan per il polimorfismo rs776746, in ogni piastra di qPCR, sono stati inclusi controlli di ogni classe genotipica. Questi controlli positivi derivavano da soggetti Caucasici per i quali erano disponibili i dati *genome-wide*. Il saggio TaqMan rs35599367 è stato convalidato in maniera simile. Tuttavia, non erano presenti nella popolazione in studio campioni omozigoti per l'allele minore da utilizzare come controlli positivi. Un sottogruppo di campioni ( $\leq 10\%$ ) sono stati ri-analizzati, e non è stato evidenziato nessuno scambio di campione né alcuna falsa genotipizzazione.

**Quantificazione di simvastatina e simvastatina acida.** Le concentrazioni plasmatiche di SV e SVA sono state misurate nei partecipanti allo studio CAP dopo 6 settimane di trattamento con simvastatina a 40 mg/die. I campioni sono stati raccolti circa 12 ore dopo l'ultima dose. La quantificazione è stata eseguita su uno strumento PE SCIEX API 365 (Framingham, Massachusetts, USA), per cromatografia liquida ad alta prestazione-spettrometria di massa "a triplo-quadruplo". I campioni sono stati valutati su una colonna Kromasil C18 (Saint Louis, Missouri, USA) seguendo il protocollo precedentemente pubblicato. SV e SVA purificate sono state donate da Merck (New Jersey, USA); diluizioni seriali sono state utilizzate per generare le curve standard.

**Analisi statistiche.** Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando Stata/IC-12 (StataCorp., College Station, Texas, USA) per Windows. Tutte le analisi sono state eseguite utilizzando test non parametrici dato che le distribuzioni dei dati non erano normali.

Sulla base degli studi sul metabolismo in vitro è stato ipotizzato quanto segue: (i) le concentrazioni di simvastatina sono superiori nei partecipanti portatori di almeno un allele DOF CYP3A4\*22 rispetto ai soggetti *wild-type* (\*1/\*1); (ii) le concentrazioni di simvastatina sono superiori nei "non esprimenti" l'allele CYP3A5 (\*3/\*3) rispetto agli "esprimenti" CYP3A5 (\*1/\*3 o \*1/\*1); e (iii) le concentrazioni di simvastatina sono più elevate negli individui con genotipo combinato CYP3A4/5, definiti "metabolizzatori lenti" ( $PM_S$ ) rispetto ai "metabolizzatori intermedi" ( $IM_S$ ) e ai "metabolizzatori estensivi" ( $EM_S$ ). La metodologia riguardante la classificazione genotipo-definito della combinazione CYP3A4/5 è stata descritta per la prima volta da Elens et al. (Elens L et al. *Clin Chem* 2011,57:1574–83), ed è stata successivamente utilizzata nello studio di vari substrati del CYP3A. Tutte le analisi sono state stratificate per etnia. I fattori potenzialmente confondenti come fumo, sesso, età, indice di massa corporea, e *compliance* sono stati testati per le associazioni significative con le concentrazioni di simvastatina, utilizzando il test U di Mann-Whitney e il test di correlazione non-parametrico di Spearman. Inoltre, sono state analizzate le associazioni tra i gruppi genotipo-definiti utilizzando il test U di Mann-Whitney e il test H di Kruskal-Wallis per confrontare le medie



delle variabili numeriche e il test  $\chi^2$  di Pearson per il confronto tra le percentuali. La media e lo scarto interquartile di SV e SVA sono stati determinati per i gruppi genotipo-definiti. I test U di Mann-Whitney unilaterali sono stati eseguiti per le analisi a singolo-gene confrontando i valori medi di SV e SVA tra i due gruppi genotipo-definiti. Poiché il BMI è stato associato con SV e SVA ( $P < 0,05$ ), e dato che queste sono entrambe lipofiliche, ed il partecipante medio allo studio CAP è stato classificato come in sovrappeso, tutte le analisi sono state ripetute con concentrazioni di simvastatina aggiustate sulla base del valore di BMI.

**Risultati.** Le frequenze degli alleli CYP3A4\*22 e CYP3A5\*3 sono risultate significativamente più alte nei Caucasici, ed è emersa una distribuzione significativamente diversa nei vari gruppi genotipo-definiti tra Caucasici e Afro-Americani. In entrambi i gruppi etnici, le distribuzioni dei genotipi CYP3A4\*22 e CYP3A5\*3 erano in Hardy-Weinberg. Gli alleli erano in *linkage disequilibrium* parziale (LD) e anche il grado di LD era differente tra Caucasici e Afro-Americani ( $r^2=0,06$  e  $0,14$ , rispettivamente). Le uniche caratteristiche cliniche che hanno mostrato associazioni significative con la concentrazione di simvastatina ( $P < 0,05$ ) sono state il gruppo etnico e il BMI, implicando che le analisi stratificate per etnia e simvastatina dovevano essere corrette per BMI. Le analisi sono state anche ripetute con concentrazioni aggiustate per il peso corporeo. Nelle analisi per singolo gene dei Caucasici, l'allele CYP3A5\*3 non era significativamente associato con le concentrazioni di SV o di SVA, mentre i *carriers* del CYP3A4\*22 mostravano concentrazioni aumentate del 14% per SVA ( $P=0,04$ ) e concentrazioni di SV più elevate del 20% ( $P=0,06$ ) rispetto ai *non-carriers*. Nell'analisi per singolo gene degli Afro-Americani, i *carriers* del CYP3A4\*22 presentavano concentrazioni di SV più elevate del 170% rispetto ai *non-carriers* ( $P < 0,01$ ), ma non è stata rilevata alcuna differenza significativa per le concentrazioni di SVA; i "non esprimenti" il CYP3A5 (CYP3A5\*3/\*3) avevano concentrazioni di SV superiori al 33% degli "esprimenti" CYP3A5 (CYP3A5\*1/\*3 o \*1/\*1) ( $P=0,02$ ), ma non è stata rilevata alcuna differenza significativa per le concentrazioni di SVA. Sia i *carriers* del CYP3A4\*22 Caucasici che quelli Afro-Americani mostravano dunque una maggiore SVA dei *non-carriers* ( $P < 0,05$ ); tuttavia, questo effetto era molto più rilevante negli Afro-Americani rispetto ai Caucasici (aumento del 170 vs 14%, rispettivamente). L'effetto dell'allele CYP3A5 era significativo solo per gli Afro-Americani; SV era superiore del 33% nei "non esprimenti" CYP3A5 (\*3/\*3) rispetto agli "esprimenti" CYP3A5 (\*1/\*3 o \*1/\*1) ( $P=0,02$ ).

Questo articolo descrive le associazioni tra le concentrazioni di simvastatina in vivo e gli alleli CYP3A5\*3 e CYP3A4\*22. L'allele DOF CYP3A4\*22 è stato associato ad un aumento delle concentrazioni di simvastatina sia nei soggetti Caucasici che Afro-Americani. Il CYP3A5\*3 invece, è risultato influente solo negli Afro-Americani. Le differenze osservate nelle frequenze alleliche del locus CYP3A e nel LD tra Afro-Americani e Caucasici sono coerenti con le analisi di frequenza allelica precedentemente riportati. In questo studio sono presenti alcune limitazioni: è un'analisi retrospettiva di farmacocinetica progettata principalmente per la misurazione farmacodinamica; non vengono analizzati polimorfismi in altri geni che sono noti influenzare la farmacocinetica della simvastatina (ad esempio, SLCO1B1); le categorie etniche sono auto-riferite e, anche se la stratificazione tiene conto delle differenze di etnia del LD, non tiene però conto dello stato allelico sbilanciato tra i gruppi *carrier* dei polimorfismi; infine, alcuni gruppi genotipo-determinati non sono adeguatamente rappresentati (ad esempio, solo due di 275 partecipanti Afro-Americani rappresentano il gruppo CYP3A4/5 definito PM). I punti di forza dello studio sono: la grande dimensione complessiva del campione, la semplicità dei raggruppamenti dei genotipi permessa dall'utilizzo di robuste analisi statistiche non parametriche; il profilo del sesso ben bilanciato; i range del BMI e dell'età sono marginali; e la dose di simvastatina, la forza, e la durata del trattamento sono omogenei; infine, nel progetto è stato vietato l'uso di farmaci concomitanti e di alcuni alimenti che potessero indurre o inibire il CYP3A.

Quest'analisi ha rivelato un'associazione tra le concentrazioni di simvastatina in vivo e l'allele CYP3A4\*22 in entrambi i gruppi etnici e un'associazione con il CYP3A5 solo negli Afro-Americani (*self-reported*).

**Parole chiave:** CYP3A4, CYP3A5, metabolismo, farmacogenetica, simvastatina

#### Riferimento bibliografico

[Kitzmiller JP](#) et al. *Pharmacogenet Genomics* 2014, 24(10):486-91.

## LA METANALISI DEL MESE

### RUOLO DEI POLIMORFISMI DEL GENE ABCB1 NELLA RISPOSTA AD IMATINIB IN PAZIENTI CON LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA: REVISIONE SISTEMATICA E META-ANALISI

A cura del Dott. Vittorio Simeon

L'imatinib, inibitore competitivo di BCR-ABL, è utilizzato in prima linea per il trattamento della leucemia mieloide cronica (CML). L'utilizzo di imatinib ha drasticamente migliorato l'*outcome* clinico e la prognosi per i pazienti con CML, ciononostante esiste una percentuale di pazienti che sviluppa resistenza a questo tipo di terapia. Tra i numerosi meccanismi di resistenza proposti, l'eterogeneità farmacocinetica del farmaco (nell'assorbimento, nella distribuzione e nel metabolismo dell'imatinib) sembra svolgere un ruolo importante. Tra i geni potenzialmente implicati in questi processi vi è il gene ABCB1 (*ATP-binding cassette, subfamily B member 1*) che codifica per la glicoproteina-P (Pgp), una proteina di membrana appartenente alla superfamiglia dei trasportatori ABC e coinvolta nei processi di resistenza multifarmaco. Imatinib è un substrato della Pgp e la concentrazione intracellulare del farmaco viene influenzata dai livelli di espressione della proteina. I polimorfismi del gene ABCB1 hanno la potenzialità di alterare l'espressione e il funzionamento della Pgp e, di conseguenza, di modificare la biodisponibilità di imatinib. I polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) c.1236C4T, c.2677G4T/A e c.3435C4T, in *linkage disequilibrium* tra di loro, sono quelli più frequenti nella regione codificante del gene ABCB1. Le varianti c.1236C4T (nell'esone 12 in posizione 412) e c.3435C4T (nell'esone 26 in posizione 1145) sono SNPs sinonimi, mentre c.2677G4T/A nell'esone 21 comporta una sostituzione amminoacidica di alanina in posizione 893 rispettivamente con serina (2677T) o treonina (2677A). Report preliminari hanno evidenziato come variazioni funzionali del gene ABCB1 possano spiegare, almeno in parte, la variabilità di risposta all'imatinib. Recentemente è stato dimostrato che mutazioni silenti nella Pgp sono in grado di alterare la specificità al substrato, la tempistica del folding co-traslazionale e l'inserimento in membrana della proteina. Inoltre, è stato dimostrato che il polimorfismo c.3435C4T è responsabile di una diminuzione dei livelli di espressione dell'mRNA. Prese insieme, queste evidenze lasciano supporre un ruolo, anche se non ben definito, nell'alterazione del funzionamento della Pgp e, di conseguenza, nell'associazione alla risposta ad imatinib in pazienti con CML. Purtroppo la bassa numerosità campionaria degli studi presi in considerazione, con una potenza statistica insufficiente, non permette di definire in maniera conclusiva l'associazione di questi SNPs con la risposta ad imatinib. Nella presente meta-analisi sono state raccolte ed analizzate le evidenze disponibili per l'associazione tra i polimorfismi di ABCB1 e la risposta ad imatinib nei pazienti con CML.

La ricerca della letteratura è stata effettuata utilizzando i database Pubmed, ISI web of knowledge, Embase e Cochrane, fino al gennaio 2014, con i seguenti termini: 'leucemia mieloide cronica', 'CML', 'ABCB1' e 'imatinib'. Gli studi per essere eleggibili dovevano rispettare i seguenti criteri: (1) avere dati indipendenti e pubblicati su giornali *peer-reviewed*; (2) avere come obiettivo la valutazione dell'impatto degli SNP c.1236C4T, c.2677G4T/A, e c.3435C4T sulla risposta ad imatinib nei pazienti con CML; (3) garantire sufficienti informazioni sul genotipo per il calcolo degli odds ratio (OR) e dei relativi intervalli di confidenza al 95%. Gli studi con dati sovrapponibili e/o con insufficienti informazioni sul genotipo sono stati esclusi. L'effetto di ogni polimorfismo sulla risposta all'imatinib è stata esaminata utilizzando i modelli genetici additivi, recessivi e dominanti. Gli ORs combinati sono stati calcolati utilizzando modelli ad effetti-fissi (metodo di Mantel-Haenszel) o ad effetti-casuali (metodo di DerSimonian-Laird). L'analisi per sottogruppo è stata effettuata in accordo con l'area geografica (Europa, Asia, America o Africa), l'approccio terapeutico (imatinib da solo o imatinib/+altri farmaci) e i criteri di risposta (risposta molecolare minima – MMR – o altri criteri non-uniformi). L'eterogeneità degli studi analizzati è stata valutata con il test statistico Q di Cochran e il test  $I^2$ . È stata inoltre effettuata un'analisi di sensibilità omettendo in modo sequenziale gli studi per valutare la stabilità dei risultati. Il test di Egger e il funnel plot (grafico a imbuto) sono stati utilizzati per identificare il bias di pubblicazione.

Sulla base dei criteri di eleggibilità, nella revisione sistematica/meta-analisi sono stati inclusi 12 studi, comprendenti un totale di 1826 pazienti. Tra questi studi, cinque sono stati condotti in Europa, quattro in Asia, uno in Sud America, uno in Africa e l'ultimo tra Asia e Nord America. In nove studi i pazienti sono stati trattati con imatinib alla dose di 300-800 mg al giorno. In due studi i pazienti, trattati rispettivamente con imatinib/+interferone e con imatinib+citarabina, sono stati inclusi nel gruppo imatinib/+altri farmaci. Il criterio di risposta è stato definito come MMR in sei studi, di cui 5 con un follow-up a 12 mesi. I risultati dei rimanenti sei studi sono stati classificati con criteri non uniformi e raggruppati insieme per l'analisi.

*Polimorfismo c.1236C4T* – Per l'analisi di questo polimorfismo sono stati utilizzati 11 studi, con un totale di 1623 pazienti. La presenza del genotipo 1236CC, in un modello dominante, era in grado di migliorare la risposta ad imatinib nei pazienti asiatici con CML (OR = 0.59, P = 0.036).

*Polimorfismo c.2677G4T/A* – La meta-analisi su 10 studi con 1579 pazienti non ha rivelato alcuna associazione con la risposta all'imatinib nella popolazione generale. Nell'analisi per sottogruppi, i pazienti portatori dell'allele 2677T/A avevano una risposta migliore quanto il criterio di classificazione della risposta era quello non uniforme (odds per l'allele G - OR = 1.42, P = 0.031).

*Polimorfismo c.3435C4T* – Nove studi presentavano dati a sufficienza per effettuare l'analisi finale, per un totale di 1373 pazienti. Nell'analisi globale, utilizzando un modello genetico additivo, la presenza dell'allele 3435T era indicatore di una risposta peggiore ad imatinib (P = 0.042). Nell'analisi per sottogruppi, il gruppo trattato con imatinib/+ altri farmaci sia con modello additivo (OR = 0.72, P = 0.044) che recessivo (OR = 0.58, P = 0.035) e il gruppo valutato con il sistema MMR con modello dominante (OR = 0.72, P = 0.021) mostravano dei risultati statisticamente significativi. Non c'era differenza significativa tra le diverse regioni geografiche.

L'analisi di sensibilità e di bias di pubblicazione non ha mostrato risultati significativi per nessuno dei polimorfismi presi in analisi.

I risultati di studio suggeriscono che la probabilità di successo del trattamento con imatinib può essere influenzata, almeno in parte, dalle varianti del gene ABCB1. In particolare, il genotipo 1236CC nella popolazione Asiatica o il genotipo 3435C sarebbero indicatori di una migliore risposta all'imatinib nei pazienti con CML. Tuttavia, questo studio presenta molti limiti. Innanzitutto, la meta-analisi comprende un limitato numero di pazienti, dovuta al fatto che in otto studi erano stati inclusi meno di 100 casi. Secondo, vi è una notevole eterogeneità tra gli studi in termini di criteri di selezione dei pazienti, di caratteristiche cliniche dei pazienti tra cui lo stadio di malattia, e di terapie farmacologiche precedenti. Terzo, sono stati inclusi nella meta-analisi studi con diversi criteri di valutazione dell'efficacia terapeutica con imatinib. Per tutti questi motivi i risultati di questa meta-analisi devono pertanto essere presi con una certa cautela. Inoltre, la farmacocinetica dell'imatinib in pazienti con CML non è pienamente compresa e pertanto sono necessari ulteriori studi per chiarire le basi molecolari di questo processo ed in particolare del ruolo della pompa di resistenza multifarmaco Pgp.

La probabilità di successo del trattamento con imatinib può essere influenzata dalle varianti di ABCB1. Il genotipo 1236CC nella popolazione Asiatica o il genotipo 3435C sono indicatori di una migliore risposta all'imatinib nei pazienti con CML.

**Conflitto d'interesse:** Un Autore (NT) dichiara di aver ricevuto finanziamenti e onorari professionali da Novartis, Bristol-Myers Squibb e Pfizer, all'infuori del presente lavoro. Gli altri Autori non dichiarano alcun conflitto di interesse.

**Parole chiave:** ABCB1, Pgp, CML, imatinib

#### Riferimento bibliografico

[Zheng Q](#) et al. *Pharmacogenomics J* 2014 Sep 23 [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) 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 (AO Polo Universitario "L. Sacco" di Milano) Dott.ssa Valentina Citi (Università di Pisa) Dott.ssa Valeria Conti (Università di Salerno) Dott.ssa Eva Cuzzoni (Università di Trieste) Dott.ssa Marzia Del Re (Università di Pisa) Dott.ssa Lucia Gozzo (Università di Catania) Dott.ssa Gloria Ravegnini (Università di Bologna) Dott.ssa Giusy Russomanno (Università di Salerno) 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)

---

### DISCLAMER – Leggere attentamente

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

---

### RICEZIONE NEWSLETTER

Nella consapevolezza che le e-mail indesiderate sono oggetto di disturbo, vi informiamo che il vostro indirizzo viene conservato e trattato nel rispetto del DL 196/03 ed in qualsiasi momento potrà esserne richiesta la modifica o cancellazione come previsto dall'articolo 13. Tutti i destinatari della e-mail sono in copia nascosta (Privacy L. 75/96).

Qualora non intendeste ricevere ulteriori comunicazioni vi preghiamo di inviare una risposta all'indirizzo [sif.farmacologia@segr.it](mailto:sif.farmacologia@segr.it) con oggetto: CANCELLA.

---

---