

**SIF - FARMACOGENETICA****Newsletter Numero 68 – Dicembre 2014**

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

Sommario**Oncologia**

- o Crizotinib nel carcinoma polmonare non a piccole cellule con ri-arrangiamento di ROS1
- o Alti livelli sierici di microRNA-335 predicono una progressione tumorale aggressiva e una prognosi sfavorevole nella leucemia mieloide acuta pediatrica
- o associazione tra i polimorfismi del gene EGFR, eruzioni cutanee e risposta alla terapia anti-EGFR in pazienti con carcinoma metastatico coloretale
- o mTORC1 come fattore predittivo per l'efficacia di everolimus nel tumore avanzato della mammella: studio traslazionale all'interno del trial TAMRAD

Neurologia

- o Associazione sinergistica dei polimorfismi di PI4KA e GRM3 con mancata risposta agli antipsicotici in pazienti schizofrenici dell'India del Sud con bassa severità di malattia
- o Polimorfismo del gene *multidrug resistance 1* MDR1/ABCB1 C3435T e risposta ai farmaci antiepilettici nell'epilessia del lobo temporale

Immunomodulazione

- o Il polimorfismo a singolo nucleotide CYPA4*22 C>T è associato a ridotta *clearance* di midazolam e tacrolimus in pazienti sottoposti a trapianto allogenico di rene e stabilizzati
- o Alterazioni genetiche nella sindrome nefrosica sporadica correlate con la resistenza all'immunosoppressione

Diabetologia

- o Associazione farmacogenetica tra una variante nel gene calpain 10 (CAPN10) e la risposta alla terapia con metformina in pazienti affetti da diabete di tipo 2

ONCOLOGIA

CRIZOTINIB NEL CARCINOMA POLMONARE NON A PICCOLE CELLULE CON RI-ARRANGIAMENTO DI ROS1

A cura della Dott.ssa Lucia Gozzo

L'oncogene *ROS1* codifica per un recettore con attività tirosin-chinasica correlato alla chinasi del linfoma anaplastico (ALK), insieme ai membri della famiglia dei recettori dell'insulina, e risulta attivato da un ri-arrangiamento cromosomico in diverse patologie tumorali, tra cui il tumore polmonare non a piccole cellule (*non-small-cellungcancer*, NSCLC), il colangiocarcinoma, il carcinoma gastrico, il carcinoma ovarico, il

glioblastoma multiforme. Il ri-arrangiamento porta alla fusione di una porzione del *ROS1* che include l'intero dominio tirosin-chinasico con uno di 12 geni di diverse proteine (Davies KD et al. *ClinCancer Res* 2013,19:4040-5). La proteina di fusione risultante è costitutivamente attiva e guida la trasformazione cellulare. Il ri-arrangiamento è presente in circa l'1% dei pazienti con NSCLC e in particolare, come per la proteina ALK, in pazienti con adenocarcinoma che non hanno mai fumato o hanno una storia di fumo a bassi livelli (Gainor JF and Shaw AT *Oncologist* 2013,18:865-75). Raramente i ri-arrangiamenti dei due geni si trovano nello stesso tumore, definendo così sottogruppi molecolari specifici di NSCLC. Numerose evidenze suggeriscono che ROS1 potrebbe rappresentare un altro target terapeutico del crizotinib, inibitore di ALK. I domini chinasici di ALK e ROS1 hanno in comune il 77% degli aminoacidi nel sito di legame dell'ATP, e questo potrebbe essere alla base dell'alta affinità con cui il crizotinib si lega ad entrambe le chinasi (Huber KV et al. *Nature* 2014,508:222-7). In linee cellulari che esprimono le proteine di fusione ROS1, il crizotinib inibisce la via di ROS1 e la vitalità cellulare ed in alcuni *case report* viene descritta una rapida risposta al crizotinib in pazienti con NSCLC e ri-arrangiamento di *ROS1* (Bergethon K et al. *J Clin Oncol* 2012,30:863-70; Davies KD et al. *Clin Cancer Res* 2012,18:4570-9). In questo studio è stata valutata l'efficacia e la sicurezza di crizotinib in pazienti con NSCLC avanzato e ri-arrangiamento di *ROS1*.

Sono stati arruolati pazienti di età superiore ai 18 anni con NSCLC avanzato e ri-arrangiamento di *ROS1*, *Eastern Cooperative Oncology Group performance status* tra 0 e 2, adeguate funzioni d'organo e malattia misurabile secondo i criteri *Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST)*, versione 1.0. Si tratta di una coorte di espansione di uno studio di fase I in cui è stata valutata una dose di crizotinib stabilita in una precedente fase di *dose-escalation* (250 mgx2/die per cicli di 28 giorni, fino a progressione o peggioramento clinico, tossicità inaccettabile o morte). L'*end-point* primario era il tasso di risposta. La valutazione della progressione della malattia è stata effettuata ogni 8 settimane e, dal ciclo 15 ogni, 16 settimane.

Dall'ottobre 2010 all'agosto 2013 sono stati arruolati 50 pazienti con NSCLC avanzato. La maggior parte dei pazienti non aveva mai fumato e non avevano un adenocarcinoma. L'86% dei pazienti aveva ricevuto almeno una precedente linea di terapia standard. Tra i 50 pazienti arruolati, 3 hanno avuto una risposta completa, 33 una risposta parziale e 9 una patologia stabile. Il tasso di risposta globale è stato del 72%, il tempo medio alla prima risposta era di 7,9 settimane. Al momento del *cut-off*, 23 delle 36 risposte erano in corso. La durata media della risposta era di 17,6 mesi. Tre dei 50 pazienti avevano un'evidenza di progressione alla prima ri-stadiazione, ed uno dei 3 pazienti presentava risultati atipici alla FISH ed al sequenziamento è risultato negativo per il ri-arrangiamento *ROS1*. Un altro dei 3 pazienti aveva interrotto il farmaco per 6 settimane prima della rivalutazione a causa di perforazione intestinale legata all'uso di glucocorticoidi e precedente malattia diverticolare. La durata media del trattamento è stata di 64,5 settimane e 30 pazienti hanno continuato il trattamento oltre la data di *cut-off*. La *progression free survival* media era di 19,2 mesi. Il tasso *overall survival* a 12 mesi era dell'85%. Il profilo di sicurezza di crizotinib era simile a quello riportato in precedenza. Eventi avversi sono stati registrati in almeno il 10% dei pazienti, tra cui i più comuni sono stati alterazioni visive (82%), diarrea (44%), nausea (40%), edema periferico (40%), costipazione (34%), vomito (34%), aumento delle AST (22%), fatica (20%), disgeusia (18%) e vertigini (16%). Nel 94% dei casi si trattava di reazioni di grado 1 o 2. L'evento di grado 3 più comune registrato è stato nel 10% ipofosfatemia, nel 10% neutropenia e nel 4% aumento delle AST. Non sono state registrate reazioni di grado 4, ed i 5 decessi sono stati correlati alla progressione della malattia.

Il più comune partner di fusione di ROS1 è stato il gene codificante il CD74, identificato nel 44% dei campioni; altri partner identificati sono stati l'*SDC4*, l'*EZR*, l'*SLC34A2* ed il *TPM3*, già riconosciuti in precedenza. Con il sequenziamento di nuova generazione sono stati trovati 2 nuovi partner, *LIMA1* e *MNS*. La risposta tumorale è stata ottenuta indipendentemente dalla presenza di un partner di fusione specifico. Tuttavia, a causa del numero di proteine di fusione di ROS1, la relazione con la risposta al crizotinib è di difficile valutazione in questo piccolo campione.

I risultati di questo studio confermano l'importanza di ROS1 come target terapeutico in pazienti con NSCLC avanzato. Clinicamente i pazienti con ri-arrangiamenti di *ALK* e di *ROS1* presentano caratteristiche simili e sono altamente sensibili al crizotinib. Da risultati preliminari la durata della risposta nei pazienti con ri-arrangiamento di *ROS1* sembra più prolungata rispetto alla durata della risposta nei pazienti con ri-arrangiamento di *ALK*. La differente risposta non sembra legata a variabilità nella esposizione al farmaco, poiché i livelli plasmatici di crizotinib erano simili nei pazienti con ri-arrangiamento di *ALK* e *ROS1*. Alla

base della migliore risposta potrebbe essere una inibizione più potente del ROS1 rispetto ad ALK da parte del crizotinib, come dimostrato dai valori della costante di dissociazione (Huber KV et al. *Nature* 2014,508:222-7) e dai test di vitalità cellulare (Shaw AT et al. *Presented at the Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology*, Chicago, June 1–5, 2012 abstract). Come nei pazienti con ri-arrangiamento di *ALK*, nei pazienti con ri-arrangiamento di *ROS1* si può sviluppare resistenza al crizotinib. Sono stati descritti due meccanismi di resistenza: una mutazione secondaria che impedisce il legame del farmaco al sito d'azione (Awad MM et al. *N Engl J Med* 2013,368:2395-401) e l'attivazione del recettore del fattore di crescita dell'epidermide, che consente alle cellule cancerose di superare l'inibizione del segnale di ROS1 mediata da crizotinib (Davies KD *PLoS One* 2013,8(12):e82236). Di recente, nuovi e più potenti inibitori di ALK hanno mostrato di essere efficaci in NSCLC resistenti al crizotinib ed alcune di queste molecole hanno come target anche ROS1 (Marsilje TH et al. *J Med Chem* 2013,56:5675-90). Se i pazienti con NSCLC e ri-arrangiamento di *ROS1* possano rispondere alla terapia sequenziale con questi potenti inibitori è ancora da determinare.

In conclusione, il ri-arrangiamento di *ROS1* definisce un secondo sottogruppo molecolare di NSCLC in cui il crizotinib risulta efficace. Nella maggior parte dei pazienti il farmaco ha indotto una risposta clinica duratura ed è stato associato con effetti avversi lievi. Questi risultati suggeriscono l'importanza dello *screening* di questa alterazione genetica nei pazienti con NSCLC.

Conflitti di interesse: lo studio è stato supportato dalla Pfizer, dal *National Cancer Institute*, dalla fondazione *Uniting against Lung Cancer* e *Be a Piece of the Solution*.

Parole chiave: NSCLC, crizotinib, *ROS1*

Riferimento bibliografico

[Shaw AT](#) et al. *N Engl J Med* 2014, 371(21):1963-71.

ALTI LIVELLI SIERICI DI MICRORNA-335 PREDICONO UNA PROGRESSIONE TUMORALE AGGRESSIVA E UNA PROGNOSI SFAVOREVOLE NELLA LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA PEDIATRICA

A cura della Dott.ssa Gloria Ravegnini

La leucemia mieloide acuta (AML) è una malattia del sangue caratterizzata da una proliferazione incontrollata di granulociti, monociti, megacariociti o più raramente di cellule blastiche eritroidi. La AML può essere caratterizzata da diverse anomalie citogenetiche e molecolari che possono contribuire in modo significativo alla crescita incontrollata o alla differenziazione delle cellule maligne. Questo tipo di leucemia rappresenta circa il 15-20% delle leucemie pediatriche e conta il 30% delle morti da leucemia nei bambini. La AML pediatrica ha una diversa prognosi e risposta alla terapia quando comparata con quella degli adulti. È perciò di grande impatto clinico la possibilità di identificare nuovi markers molecolari che permettano di mettere a punto terapie post-remissione basate sul rischio.

I microRNA sono piccole molecole di RNA non codificanti, in grado di regolare post-trascrizionalmente l'espressione genica di mRNAs targets. Evidenze biologiche hanno dimostrato che i microRNA possono agire sia come oncosoppressori che oncogeni e diversi studi hanno dimostrato che in malattie come il cancro si assiste ad un'alterazione dei livelli di espressione di essi; questo fa sì che i microRNA siano dei candidati-markers ottimali per la diagnosi e la prognosi di pazienti affetti da tumore.

È stato dimostrato che il microRNA miR-335 può avere la funzione duale di oncogene o oncosoppressore in diverse tipologie di cancro; ciò implica che esso abbia un ruolo cruciale nello sviluppo, progressione, metastasi e prognosi del tumore. Zhang et al. [Zhang et al, *PLoS One*. 2009 Nov 13;4(11):e7826.] hanno mostrato che i pazienti pediatrici con AML erano caratterizzati da una più alta espressione di miR-335 nel midollo osseo rispetto ai controlli sani, tuttavia il significato clinico di questa espressione aberrante non è stato ancora chiarito.

Date le suddette premesse, lo scopo dello studio è stato quello di investigare l'associazione tra espressione di miR-335 con prognosi e progressione tumorale nell'AML pediatrica.

Nello studio sono stati coinvolti un totale di 106 pazienti pediatriche con AML; secondo la classificazione FAB (francese, americana e britannica), i soggetti sono stati suddivisi in AML M0, M1/M2, M3, M4/M5 ed M7 in base a criteri morfologici e immunofenotipici. Tutti i pazienti erano stati trattati con chemioterapia di induzione per 10 giorni, durante i quali il dosaggio di behenoyl 1-h-D-arabinofuranosilcitosina poteva essere modificato in base alla risposta del midollo osseo al giorno 7. Se la remissione completa (CR) non era stata raggiunta dopo il primo regime chemioterapico di induzione, veniva somministrato un ulteriore ciclo. Una volta raggiunta la CR, i pazienti con appropriato donatore di cellule staminali ricevevano la chemioterapia di consolidamento fino al trapianto. Come controllo, è stato utilizzato il midollo osseo di 20 pazienti con malattie diverse ma con normale morfologia del midollo, e il siero di 50 volontari sani.

I livelli di espressione di miR-355 sono stati analizzati in cellule di midollo e nel siero, mediante qRT-PCR. La quantificazione relativa è stata ottenuta tramite normalizzazione con il controllo endogeno RNU6B.

I risultati ottenuti hanno mostrato che l'espressione di miR-355 nel midollo osseo di pazienti con AML era significativamente più alta rispetto ai controlli (AML vs controlli: 4.40 ± 2.11 vs 2.20 ± 0.70 , $P < 0.001$). Inoltre i livelli di espressione nel midollo osseo dei pazienti erano correlate con quelli nel siero. A questo punto, il valore medio di espressione di miR-355 (3.59) nel siero è stato utilizzato come cut-off per suddividere i 106 pazienti in due gruppi: con espressione di miR-355 bassa ($n=50$) e con espressione elevata ($n=56$).

Livelli elevati di miR-355 si ritrovavano più spesso nei soggetti malati appartenenti al sottotipo M7 rispetto agli altri ($P=0.03$); inoltre i pazienti con cariotipo sfavorevole avevano livelli di espressione più alti rispetto a quelli a cariotipo favorevole ed intermedio ($P=0.008$).

Tutti i 106 pazienti sono stati monitorati durante un periodo di follow-up; il follow-up medio è stato di 35 mesi (range 10-86 mesi). Pazienti con livelli di espressione miR-335 elevati avevano una sopravvivenza libera da ricaduta (RFS, *relapse-free survival*) ed un'OS più corte, rispetto a quelli con bassa espressione di miR-335 (per entrambe $P < 0.001$). In un'analisi univariata, le RFS in pazienti con sottotipo FAB M7 ($p=0.01$), con anomalie citogenetiche sfavorevoli ($P < 0.001$), con elevata espressione di miR-335 ($P < 0.001$) erano tutte significativamente più brevi rispetto ai controlli. Analogamente il sottotipo FAB M7 ($p=0.08$), anomalie citogenetiche sfavorevoli ($P < 0.001$), ed elevata espressione di miR-335 ($P < 0.001$) erano associate con scarsa OS. L'analisi multivariata di Cox ha poi identificato il livello di espressione di MiR-335 come fattore prognostico indipendente per RFS e OS (per entrambe $P=0.01$).

Un'analisi univariata separata del gruppo citogenetico di rischio intermedio ha infine dimostrato che l'elevata espressione di miR-335 era significativamente associata con RFS ed OS sfavorevoli (per entrambe $P < 0.001$).

Di conseguenza i microRNAs sierici rappresentano degli ottimi candidati per test non invasivi per il cancro, vista anche la stabilità dei microRNA nel sangue e la loro espressione tessuto-specifica.

In conclusione questo studio offre per la prima volta la prova che i livelli sierici di miR-335 possono essere consistentemente elevati in pazienti pediatriche affetti da leucemia mieloide acuta. Questo microRNA potrebbe quindi essere impiegato come marker promettente per il monitoraggio della progressione e la predizione dell'*outcome* clinico in pazienti affetti dalla suddetta malattia.

Parole chiave: AML, chemioterapia di induzione e trapianto, MiR-335

Riferimento bibliografico

[Lin X](#) et al. *Clin Transl Oncol* 2014 Oct 10[Epub ahead of print].

ASSOCIAZIONE TRA I POLIMORFISMI DEL GENE EGFR, ERUZIONI CUTANEE E RISPOSTA ALLA TERAPIA ANTI-EGFR IN PAZIENTI CON CARCINOMA METASTATICO COLORETTALE

A cura della Dott.ssa Stefania Cheli

Gli agenti chemioterapici che inibiscono il recettore del fattore di crescita dell'epidermide (EGFR) sono usati nei tumori solidi in fase avanzata, in quanto mostrano una maggiore tolleranza rispetto alla chemioterapia convenzionale. Gli anticorpi monoclonali (mAb), inibitori dell'EGFR, cetuximab e panitumumab sono utilizzati per il trattamento del cancro del colon-retto metastatico (mCRC). Tuttavia, un'alta percentuale di

pazienti (80%) presenta eruzioni cutanee papulo-pustolose come effetto collaterale che, nei casi più gravi, richiede l'interruzione del trattamento. Gli anticorpi anti-EGFR, oltre a controllare gli stimoli di proliferazione e sopravvivenza, inducono infiltrazione leucocitaria, contribuendo così alla tossicità cutanea. L'unico fattore predittivo definito di risposta agli mAb anti-EGFR sono le mutazione KRAS per cui prima di iniziare la terapia è necessario accertare lo stato *wild-type* (wt) del gene. Tuttavia, alcuni pazienti wt per KRAS non rispondono al trattamento e pertanto, altri fattori potrebbero determinare la risposta a questi farmaci.

Polimorfismi nel gene EGFR potrebbero predire insorgenza e intensità del rash papulo-pustoloso e risposta al trattamento.

Per verificare quest'ipotesi, è stato condotto uno studio prospettico osservazionale su 51 pazienti trattati con mAb anti-EGFR per mCRC. Sono state valutate sia la tossicità cutanea che la risposta antitumorale. Sono stati genotipizzati i polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) -216 e SNP -191 localizzati nella regione del promotore, la ripetizione a sequenza singola (SSR) CA nell'introne 1 e il polimorfismo R521K nell'esone 13 del gene EGFR sul DNA estratto da sangue periferico.

Evidenze preliminari a sostegno dell'ipotesi. 1. I risultati dello studio hanno mostrato che il 92,3% dei pazienti responsivi alla terapia ha sviluppato rash papulo-pustoloso, di questi il 69,2% con gravità di grado ≥ 2 ($P=0,015$). Tutti i pazienti che hanno ottenuto una risposta completa ($n=5$) hanno sviluppato rash di grado ≥ 2 . Inoltre, sebbene il 75,0% dei pazienti che ha manifestato una progressione del tumore abbia sviluppato rash, essi presentavano eruzioni meno gravi ($p=0,006$), e le lesioni sono comparse prima nei pazienti responsivi al trattamento (ORR, $P = 0,031$). Questi risultati supportano la tesi di un'associazione tra il rash cutaneo e la risposta tumorale e rafforzano l'idea che questi abbiano un meccanismo d'azione comune. **2.** I risultati ottenuti non hanno mostrato alcuna correlazione statisticamente significativa tra i polimorfismi indagati, o la loro combinazione come aplotipi, e il grado di rash cutaneo. I rash di grado 3 sono stati osservati per lo più nei pazienti con genotipo TT dello SNP -216 (4 pazienti, 30,8%) o GG (6 pazienti, 30,0%) sebbene non siano statisticamente significativi ($P=0,906$) e il 92,3% dei pazienti (12 su 13) che presentavano genotipo TT ha sviluppato rash. Inoltre, è stata osservata un'associazione significativa tra lo SNP -216 e la risposta alla terapia antitumorale. La progressione del tumore è stata osservata rispettivamente nello 0%, 15% e nel 50% dei pazienti con genotipo TT, GG e GT ($P = 0,003$) e 3 dei 5 pazienti che hanno risposto completamente alla terapia hanno presentato genotipo TT. Al contrario, tra i pazienti che hanno manifestato progressione tumorale, 9 (75%) hanno presentato genotipo GT e 3 (25%) genotipo GG ($P=0,016$). Pertanto, contrariamente ai precedenti risultati, questo studio mostra che il genotipo TT dello SNP -216 è associato ad una migliore risposta. Il genotipo TT dello SNP -216 è stato associato ad un aumento del 40% dell'espressione dell'mRNA di EGFR rispetto all'allele G. Inoltre, in accordo con un precedente studio di *Parmar et al.*, questi risultati mostrano che i pazienti con genotipo TT dello SNP -216 hanno una tendenza a sviluppare eruzioni cutanee gravi. **3.** Questo studio conferma che lo SNP -191, nonostante sia localizzato vicino a regioni di trascrizione e sia correlato ad un aumento dell'espressione delle proteine, non ha alcuna influenza sulla risposta tumorale, così come il genotipo CA-SSR1.

Inoltre, i risultati presentano una tendenza ad una migliore risposta tumorale negli individui con genotipo AA e GA del R521K: tutti i pazienti che presentano la variante A sviluppano eruzioni cutanee ed i pazienti con genotipo AA non presentano progressione del tumore (anche se il dato non risulta significativo), il che conferma la relazione di *Hsieh et al.*, *Cancer Sci* 2012.

I dati contrastanti dei diversi studi richiedono un'ulteriore validazione con un maggior numero di pazienti. Nonostante il sottodimensionamento di questo e di altri studi sia il principale punto debole, gli autori hanno tentato di speculare sull'utilità del polimorfismo -216 del gene EGFR come possibile fattore di predizione della risposta ai trattamenti anti-EGFR. In particolare, sull'ipotesi che i pazienti con genotipo TT possano presentare una migliore risposta ai trattamenti mAb. Inoltre, la presenza e l'intensità del rash cutaneo sembrano essere dei buoni indicatori della risposta tumorale. Pertanto, i parametri clinici e genetici possono risultare utili per prendere decisioni personalizzate per pazienti suscettibili alle terapie mirate anti-EGFR.

I dati preliminari mostrati in questo report, anche se sottodimensionati, suggeriscono che il polimorfismo -216 presente nel promotore del gene EGFR potrebbe essere utile nel predire la risposta tumorale e potrebbe anche essere associato alla comparsa di rash cutaneo grave.

Parole chiave:EGFR; polimorfismi EGFR, anti-EGFR (cetuximab, panitumumab), cancro del colon-retto,

rash cutaneo.

Riferimento bibliografico

[Jaka A](#) et al. *Exp Dermatol* 2014, 23(10):751-3.

MTORC1 COME FATTORE PREDITTIVO PER L'EFFICACIA DI EVEROLIMUS NEL TUMORE AVANZATO DELLA MAMMELLA: STUDIO TRASLAZIONALE ALL'INTERNO DEL TRIAL TAMRAD

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

Circa il 25% delle pazienti affette da tumore avanzato della mammella di tipo estrogeno positivo (ER+) non rispondono alla terapia endocrina a causa di una resistenza originaria o acquisita ascrivibile in molti casi alla via di trasduzione PI3K/Akt/mTOR. Everolimus, derivato della rapamicina e inibitore di mTOR, è stato recentemente studiato in combinazione con la terapia endocrina nel trial "TAMRAD" e nel "Breast Cancer Trials of Oral Everolimus-2" (BOLERO-2). La combinazione dei due farmaci riduce significativamente il rischio di progressione rispetto alla sola terapia endocrina in pazienti affetti da cancro della mammella ER+ che erano andati incontro a progressione durante trattamento con inibitori di aromatasi. Questi risultati mostrano che l'inibizione di mTOR è una strategia efficace per contrastare l'inefficiacia della terapia endocrina nel tumore metastatico della mammella. mTOR è composto da due complessi, mTORC1 ed mTORC2, ma solamente il primo è inibito da analoghi della rapamicina. Il *pathway* di mTOR è controllato dalla via trasduzionale che coinvolge PI3K e Akt; PTEN, invece, regola negativamente questa via in quanto defosforila PIP3. Studi in vitro in modelli di ormono-resistenza dimostrano che mTOR è iperattivo sia a causa di una maggiore stimolazione dei recettori di tipo tirosin-chinasici sia dalla presenza di mutazioni attivanti di PI3K. Tuttavia l'attivazione di mTOR coinvolge anche meccanismi Akt-indipendenti: mutazioni attivanti di KRas portano all'attivazione della via PI3K/Akt indipendentemente dai segnali extracellulari.

Poiché everolimus è un farmaco innovativo che inibisce mTOR, lo studio in oggetto si propone di identificare potenziali biomarkers predittivi analizzando campioni di tumore primario di pazienti inclusi nel trial TAMRAD, studio randomizzato di fase II di cui fanno parte pazienti precedentemente trattati con inibitori di aromatasi. Poiché mTOR è il target di everolimus sono stati fatti studi di immunoistochimica per valutare l'espressione delle proteine coinvolte nel pathway PI3K/Akt/mTOR come PTEN, LKB1, pAkt, eIF4E, 4EBP1, p4EBP1, S6RP e pS6RP; inoltre sono state analizzate le mutazioni dei geni PIK3CA (esone 9 e 20) e KRas (esone 2). La popolazione analizzata per questo studio traslazionale comprende 55 pazienti di cui 25 trattati con tamoxifene 20 mg/die (età mediana 66 anni e TTP (*time to progression*) 5 mesi) e 30 trattati con la combinazione tamoxifene 20 mg/die + everolimus 10 mg/die (età mediana 64 e TPP 10 mesi). Per quanto riguarda il primo gruppo, il 48% dei pazienti presenta resistenza primaria mentre il 52% resistenza secondaria; per quanto riguarda il secondo gruppo il 50% presenta resistenza primaria mentre l'altro 50% resistenza secondaria.

Solo in un campione è stata identificata una mutazione di KRas (c.35G>A); in due campioni è stata identificata la mutazione dell'esone 9 di PIK3CA (E542K); in sette campioni è stata identificata la mutazione dell'esone 20 di PIK3CA (H1047R). In tutti i casi non c'è correlazione né tra lo stato mutazione e i livelli di espressione delle proteine, né tra lo stato mutazionale e la TTP.

Per quanto riguarda la valutazione dell'espressione delle proteine al basale, i risultati più significativi riguardano due proteine, 4EBP1 e LKB1: la prima è una proteina ad attività chinasi direttamente attivata da mTOR e regola la trascrizione e la proliferazione cellulare. La seconda fa parte del *pathway* LKB1-AMPK che attiva indirettamente mTOR. Pazienti con bassi livelli di 4EBP1 (n=21) o alti livelli di p4EBP1 (stato attivo della proteina) (n=28) presentano una riduzione del 60% in termini di rischio di progressione se trattati con tamoxifene/everolimus, mentre pazienti con alti livelli di 4EBP1 (n=20) o bassi livelli di p4EBP1 (n=19) sembrano trarre beneficio anche se trattati solamente con tamoxifene. In pazienti che presentano bassi livelli citoplasmatici di LKB1 (n=22), viene ridotto il rischio di progressione del 67% se trattati con la combinazione tamoxifene/everolimus, mentre pazienti che presentano alti livelli citoplasmatici di LKB1 (n=29) non traggono benefici dalla combinazione dei due farmaci. Pazienti con bassi livelli di pAkt (n=29) o

bassi livelli di PI3K (n=16) beneficiano maggiormente della combinazione tamoxifene/everolimus rispetto ai pazienti che invece presentano alti livelli di pAkt (n=23) o alti livelli di PI3K.

Poiché l'attivazione di mTOR aumenta i livelli di espressione di pS6K e p4EBP1, può essere ipotizzato che l'uso di inibitori di mTOR come everolimus possa essere più efficace in pazienti che presentano livelli basali alti di queste proteine: infatti la combinazione tamoxifene/everolimus migliora in maniera significativa la TTP in quelle pazienti che hanno al basale alti livelli di p4EBP1 e bassi livelli di 4EBP1 rispetto alle pazienti che invece presentano bassi livelli di p4EBP1 e alti livelli di 4EBP1.

Oltre all'attivazione Akt-dipendente, mTOR è stato dimostrato che può essere attivato anche attraverso meccanismi Akt-indipendenti. Infatti in questo studio è stato dimostrato che pazienti con bassi livelli di pAkt e di PI3K al *baseline*, incide di una minima attivazione del *pathway*, beneficiano comunque della combinazione tamoxifene/everolimus. Questo viene confermato dai risultati ottenuti per la proteina LKB1 che regola in maniera indiretta l'attivazione di mTOR: in pazienti che presentano un'elevata espressione di questa proteina, non si ha alcun beneficio dall'uso della combinazione tamoxifene/everolimus.

In conclusione, i risultati di questo studio indicano una correlazione positiva sia tra l'espressione delle proteine coinvolte nel *pathway* di mTOR e l'efficacia di everolimus, sia tra l'attivazione Akt-indipendente di mTOR e l'efficacia del farmaco.

Inoltre i livelli di 4EBP1 e p4EBP1 se validati in trial più ampi, possono essere considerati potenziali biomarker che identifichino pazienti che possono beneficiare del trattamento con everolimus.

Parole chiave: tumore della mammella, biomarker, everolimus, tamoxifene, mTOR

Riferimento bibliografico

[Treilleux I](#) et al. *Ann Oncol* 2015, 26(1):120-5.

NEUROLOGIA

ASSOCIAZIONE SINERGISTICA DEI POLIMORFISMI DI PI4KA E GRM3 CON MANCATA RISPOSTA AGLI ANTIPSICOTICI IN PAZIENTI SCHIZOFRENICI DELL'INDIA DEL SUD CON BASSA SEVERITÀ DI MALATTIA

A cura della Dott.ssa Claudia Pisanu e del Dott. Alessio Squassina

Diverse evidenze suggeriscono un possibile ruolo del sistema glutamatergico nella patogenesi della schizofrenia. In particolare, la fenciclidina, antagonista dei recettori ionotropici per il glutammato, è in grado di indurre psicosi *schizofrenia-like* e numerosi polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) di geni che codificano per recettori e trasportatori del glutammato sono stati associati con la schizofrenia. Pur non avendo come target i recettori per il glutammato, gli antipsicotici sembrano essere in grado di agire sul sistema glutamatergico. Inoltre, è stato osservato che gli agonisti dei recettori metabotropici per il glutammato GRM2 e GRM3 sono dotati di attività antipsicotica in un modello animale di schizofrenia. Sulla base di queste evidenze, gli autori hanno condotto uno studio caso-controllo su un campione di pazienti schizofrenici indiani per valutare il ruolo del sistema glutamatergico nella patogenesi della schizofrenia e nella risposta agli antipsicotici.

Lo studio ha incluso 423 pazienti schizofrenici originari del sud dell'India, reclutati tra il 2007 e il 2010 presso il National Institute of Mental Health and Neuro Sciences (NIMHANS) di Bengaluru, India. La risposta al trattamento con antipsicotici tipici o atipici è stata valutata a tre mesi tramite la scala *Clinical Global Impression-Improvement* (CGI-I). 355 pazienti (83.92%) erano in monoterapia con un antipsicotico atipico, principalmente risperidone (n = 260). I pazienti che dopo tre mesi di trattamento hanno mostrato un punteggio CGI-I ≤ 2 o una diminuzione di due punti rispetto al punteggio baseline sono stati classificati come *complete responders*, mentre i pazienti con CGI-I ≥ 3 sono stati classificati come *incomplete*

responders. I pazienti sono stati suddivisi tramite la scala CGI-Severity (CGI-S) in un gruppo a bassa severità di malattia (CGI-S *baseline* ≤ 3) o alta severità di malattia (CGI-S *baseline* ≥ 4). Lo studio ha inoltre incluso 230 controlli sani. Gli autori hanno genotipizzato 69 SNPs localizzati nel gene GRM3, codificante per il recettore glutamatergico metabotropico 3, e nei geni SLC1A1, SLC1A2, SLC1A3, SLC1A4, codificanti per trasportatori del glutammato. Gli SNPs sono stati selezionati sulla base del loro presunto ruolo funzionale suggerito dai database RegulomeDB, HaploReg e da dati di letteratura. Inoltre, sono state valutate le interazioni gene-gene tra 48 SNPs genotipizzati nel presente studio e 53 SNPs dei geni BDNF, SLC6A3, RGS4, PIP4K2A e PI4KA, precedentemente genotipizzati nella stessa popolazione. Le interazioni epistatiche sono state valutate tramite il metodo della *multifactor dimensionality reduction* (MDR).

Quattro SNPs - rs1529461 (SLC1A3), rs10211524 (SLC1A4), rs2299214 e rs6465084 (GRM3) e l'aplotipo C-G (rs2299214-rs6465084: GRM3) - hanno mostrato associazione nominale con la risposta agli antipsicotici, ma la significatività non si è mantenuta dopo la correzione per test multipli. L'analisi tramite MDR ha individuato come migliore modello per predire la risposta agli antipsicotici l'interazione tra PI4KA_rs165854 e GRM3_rs1468412 nei pazienti con bassa severità di malattia. Il modello ha mostrato un'accuratezza del 64% e una *cross-validation* di 9/10 ($P = \leq 0.001$). Ulteriori analisi hanno mostrato un'interazione sinergistica tra i due SNPs in pazienti con risposta incompleta agli antipsicotici, i quali avevano una maggiore probabilità di essere carrier dei genotipi GG e AG di rs165854 in combinazione con i genotipi AA e AT di rs1468412 (OR = 12.4; $P \leq 0.0001$). Questa interazione è stata osservata anche nei sottogruppi di pazienti trattati in monoterapia con antipsicotici atipici ($n = 355$, OR = 11.21, $P \leq 0.0001$) o trattati solo con risperidone ($n = 260$; OR = 13.5; $P \leq 0.0001$).

Lo studio ha valutato per la prima volta l'effetto dell'interazione di varianti dei geni PI4KA e GRM3 sulla risposta agli antipsicotici nei pazienti con schizofrenia. Entrambe le varianti si trovano in un sito di legame per fattori di trascrizione. PI4KA è coinvolto nella sintesi di fosfatidilinositolo 4,5-bifosfato (PIP2), che regola la fusione esocitica di vescicole sinaptiche (glutamato, dopamina) con la membrana plasmatica, mentre GRM3 regola la trasmissione dopaminergica e glutamatergica. Tra i limiti dello studio vi sono la mancanza di una coorte di replicazione e la dimensione del campione insufficiente per lo studio di varianti rare.

In conclusione, i risultati dello studio supportano un effetto sinergistico di PI4KA_rs165854 e GRM3_rs1468412 nel rendere un paziente con schizofrenia suscettibile a una risposta incompleta agli antipsicotici.

Parole chiave: antipsicotici, schizofrenia, PI4KA, GRM3

Riferimento bibliografico

[Kaur H](#) et al. *Am J Med Genet Part B* 2014, 165B:635-646

POLIMORFISMO DEL GENE *MULTIDRUG RESISTANCE 1* *MDR1/ABCB1* C3435T E RISPOSTA AI FARMACI ANTIEPILETTICI NELL'EPILESSIA DEL LOBO TEMPORALE

A cura della Dott.ssa Donatella Carretta

L'epilessia è una delle più frequenti patologie neurologiche croniche; colpisce l'1-2 % della popolazione. Circa un terzo dei pazienti con epilessia ha uno scarso controllo delle crisi epilettiche e continua ad avere crisi ricorrenti nonostante l'appropriata terapia con farmaci antiepilettici. Si ritiene che alcune varianti genetiche giochino un ruolo importante nello sviluppo della farmaco-resistenza dei pazienti con epilessia. Crescenti evidenze indicano che un aumento dell'espressione funzionale dei *multidrug transporters* può determinare alterazioni farmacocinetiche che modificano l'accesso dei farmaci antiepilettici ai siti-bersaglio nel sistema nervoso centrale. Polimorfismi genetici di questi trasportatori potrebbero spiegare la loro aumentata espressione e/o attività funzionale. La glicoproteina-P (P-gp) è la proteina più studiata tra i trasportatori *ATP-binding cassette* (ABC). Il gene *Subfamily B member 1* (*ABCB1*), anche noto come gene *multi-drug resistance 1* (*MDR1*) codifica per questo trasportatore transmembrana. Sono stati identificati più di 50 SNPs che possono alterare l'espressione o la fisiologica funzione protettiva della P-gp. Una mutazione

silente del gene *MDR1*, c.3435C>T (rs1045642) nell'esone 26, è in grado di diminuire i livelli di mRNA e proteina o di alterare la struttura della proteina e l'affinità del substrato. Sono stati condotti molti studi su questo SNP allo scopo di esplorare la sua associazione con lo sviluppo della malattia e la risposta ai farmaci nell'epilessia, ma nessuno è stato conclusivo.

Alla luce di questi risultati controversi, lo scopo del presente studio è investigare se il polimorfismo c.3435C>T è più frequente nei pazienti con epilessia rispetto ai soggetti di controllo e se questo gene possa servire come biomarker per identificare la farmaco-resistenza nell'epilessia del lobo temporale (*temporal lobe epilepsy*, TLE).

Nel presente studio sono stati reclutati 175 pazienti (98 donne e 76 uomini; età media \pm SD: 47.90 \pm 17.64) con TLE. Tutti i pazienti avevano ricevuto una diagnosi di TLE non-lesionale basata su valutazioni cliniche, neuropsicologiche, elettroencefalografiche e di risonanza magnetica (RM) cerebrale. Sulla base dello studio di RM, la TLE è stata classificata come non-lesionale in assenza di lesioni focali quali tumori cerebrali, disgenesi corticale, lesioni o malformazioni vascolari, oppure cicatrici post-traumatiche. Sono stati inclusi anche i pazienti con TLE che mostravano alle neuroimmagini reperti di sclerosi mesiale temporale. La RM cerebrale ha rilevato sclerosi ippocampale in 32/175 (18%) dei pazienti. Nei pazienti i farmaci antiepilettici più utilizzati erano carbamazepina, oxcarbazepina, lamotrigina o topiramato, in monoterapia o in associazione. In accordo con l'"International League against Epilepsy", la resistenza farmacologica è stata definita come il fallimento di appropriati protocolli terapeutici di due farmaci antiepilettici ben tollerati, somministrati in monoterapia o in associazione. I pazienti sono stati quindi classificati come responsivi alla terapia (n = 134) o farmaco-resistenti (n = 41). Sono stati inoltre reclutati 175 controlli sani (93 donne e 82 uomini; età media \pm SD: 72.5 \pm 6.8). Sia i pazienti che i controlli erano soggetti Caucasiche nati in Italia. Il DNA genomico è stato estratto dal sangue periferico dei pazienti e dei controlli ed i campioni sono stati genotipizzati per il polimorfismo c.3435C>T (rs1045642) utilizzando la "TaqMan based allelic discrimination assay" (Applied Biosystems).

Non sono state osservate differenze significative delle frequenze genotipiche e alleliche del polimorfismo del gene *MDR1* tra il gruppo responsivo e quello resistente alla terapia ($p > 0.05$).

I meccanismi della farmaco-resistenza nell'epilessia non sono stati ancora chiariti. Diversi polimorfismi genici nel gene *MDR1* potrebbero essere legati ad un'alterata attività di trasporto *in vivo* della P-gp, che favorirebbe l'epilessia farmaco-resistente. È stato ipotizzato che lo SNP c.3435C>T nel gene *MDR1*, in particolare il genotipo 3435CC, possa essere associato alla resistenza farmacologica agli antiepilettici. I risultati del presente studio dimostrano che le frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo c.3435C>T del gene *MDR1* non differiscono tra i pazienti epilettici responsivi e quelli resistenti ai farmaci. In accordo con il presente studio, molti studi non hanno trovato associazioni significative tra l'epilessia farmaco-resistente e il polimorfismo c.3435C>T del gene *MDR1*.

In conclusione, il presente studio non è riuscito a mostrare un'associazione tra il polimorfismo c.3435C>T e il rischio di epilessia farmaco-resistente nella popolazione studiata. La limitazione di questo studio è la ridotta dimensione del campione di pazienti preso in esame; pertanto questi risultati, sebbene derivanti da un campione piccolo ma etnicamente omogeneo, non possono escludere in maniera definitiva un ruolo di questo gene nella farmaco-resistenza. Tuttavia, il presente studio fornisce un'ulteriore evidenza che, sebbene il gene *MDR1* sia stato altamente investigato e giochi molti importanti ruoli, è improbabile che il polimorfismo c.3435C>T abbia un ruolo importante nella farmaco-resistenza agli antiepilettici. Infine, dovrebbe anche essere tenuto in considerazione il limitato contributo di questo SNP: poiché infatti la componente ereditaria della risposta ai farmaci è tipicamente poligenica, l'impatto di un singolo gene può essere influenzato da altri geni e da fattori ambientali.

In conclusione, il polimorfismo c.3435C>T del gene *MDR1* non è associato al rischio di farmaco-resistenza nell'epilessia del lobo temporale.

Parole chiave: farmacogenetica, farmaci antiepilettici, studi di associazione, polimorfismo a singolo nucleotide, epilessia del lobo temporale.

Riferimento bibliografico

[Manna I](#) et al. *Seizure* 2014 Oct 2 [Epub ahead of print].

IMMUNOMODULAZIONE**IL POLIMORFISMO A SINGOLO NUCLEOTIDE CYP3A4*22 C>T È ASSOCIATO A RIDOTTA CLEARANCE DI MIDAZOLAM E TACROLIMUS IN PAZIENTI SOTTOPOSTI A TRAPIANTO ALLOGENICO DI RENE E STABILIZZATI**

A cura della Dott.ssa Giusy Russomanno

Il tacrolimus è un inibitore della calcineurina utilizzato nella terapia immunosoppressiva nel trapianto di organi solidi caratterizzato da un ristretto indice terapeutico. Inoltre, vista l'elevata variabilità inter-paziente nella sua biodisponibilità orale, la dose di farmaco richiesta può variare notevolmente tra i pazienti. Il tacrolimus è doppio substrato degli isoenzimi del citocromo P450 CYP3A4 e -3A5 e della glicoproteina P (ATP-binding cassette B1 (ABCB1)), proteina di membrana della superfamiglia dei trasportatori, espressa sia nella mucosa intestinale che nel fegato. Di conseguenza, il metabolismo di primo passaggio e la clearance sistemica del tacrolimus sono fortemente dipendenti dall'attività del CYP3A4 e del CYP3A5, le cui espressione e attività possono variare da 10- a 100 volte tra gli individui (Lin YS et al. *Mol Pharmacol* 2002,62:162–72). Un polimorfismo a singolo nucleotide (SNP) del gene che codifica per queste proteine è stato correlato ad una significativa variazione dell'espressione e dell'attività di CYP3A5 e CYP3A4. Lo stato di portatore del polimorfismo potrebbe spiegare, almeno in parte, la notevole variabilità tra i pazienti in trattamento con tacrolimus. Il più significativo determinante genetico noto dell'esposizione a tacrolimus è la presenza dell'allele A in posizione 6986 del gene *CYP3A5* (*rs776746*) (*carriers* dell'allele *CYP3A5*1*). La presenza di uno degli alleli (*CYP3A5*1/*3*) comporta una riduzione del 36% della dose di tacrolimus (C_0), mentre, quando entrambi gli alleli sono presenti (*CYP3A5*1/*1*), tale riduzione è del 59% (Hesslink DA et al. *Clin Pharmacokinet* 201,53:123–39). Un altro SNP nell'introne 6 (*rs35599367*) *CYP3A4* C>T è stato recentemente associato alla variabilità nella dose di tacrolimus, indipendentemente dal genotipo *CYP3A5*. In 49 pazienti sottoposti a trapianto allogenico di rene e stabilizzati, la presenza di almeno un allele T era in grado di giustificare un ulteriore 7% della variabilità nella dose di tacrolimus (Elens L et al. *Pharmacogenomics* 2011,12:1383–96). In una seconda coorte di 185 trapiantati, la dose richiesta era del 25% più bassa nei non portatori del polimorfismo di *CYP3A5* con almeno un allele *CYP3A4*22* rispetto agli omozigoti *CYP3A4*1/*1* (Elens L et al. *Clin Chem* 2011,57:1574–83). Nonostante simili risultati siano stati ottenuti in altre coorti di pazienti trapiantati, il significativo contributo del *CYP3A4*22* nel determinare la dose di tacrolimus richiesta non è stato confermato in diversi studi (Tavira B et al. *Pharmacogenet Genomics* 2013,23:445–8; Santoro AB et al. *Clin Pharmacol Ther* 2013,94:201–2). La variante *CYP3A4*22* ha una frequenza allelica dell'8% nei caucasici, mentre non sono stati ancora riportati dati nella popolazione asiatica o africana. Studi *in vitro* hanno dimostrato che tale polimorfismo è associato a ridotta espressione del mRNA del CYP3A4 epatico e, di conseguenza, a ridotta attività del CYP3A4 (Okubo M et al. *J Toxicol Sci* 2013,38:349–54). Inoltre, in uno studio in cui il midazolam (MDZ) per via endovenosa è stato utilizzato per valutare *in vivo* l'attività del CYP3A in 86 pazienti oncologici sottoposti a diversi protocolli chemioterapici, è stato riportato che i rapporti metabolici di MDZ (1'-OH-MDZ/MDZ) erano in media il 20.7% più bassi nei *CYP3A4*22* carriers (n=12) rispetto ai pazienti *CYP3A4*1/*1*, indicando una attività del CYP3A4 inferiore nei portatori di tale variante allelica (Elens L et al. *Pharmacogenomics* 2013,14:37–49). Il presente studio trasversale è stato condotto per valutare gli effetti del polimorfismo *CYP3A4*22* C>T nell'introne 6 (*rs35599367*, 15389C>T) sull'attività *in vivo* del CYP3A4, valutata come clearance orale e sistemica apparente di MDZ, e sulla farmacocinetica del tacrolimus in pazienti trapiantati.

Due coorti di pazienti sottoposti a trapianto allogenico di rene, stabilizzati e trattati con tacrolimus, sono state seguite per 3 mesi (3.13±0.21 mesi, n=59) o per 1-5 anni (25.0±16.1 mesi, n=80) dopo il trapianto. La concomitante assunzione di farmaci e/o sostanze induttori o inibitori degli isoenzimi del CYP3A o che potessero interferire con l'assorbimento, la distribuzione, il metabolismo e l'eliminazione del tacrolimus, fatta eccezione per i corticosteroidi, costituiva motivo di esclusione dallo studio. Tutti i pazienti erano in trattamento con tacrolimus in associazione con acido micofenolico somministrato come profarmaco

(micofenolato mofetile), con o senza metilprednisolone a basse dosi. La dose da carico di tacrolimus era 0.2 mg kg⁻¹ pro die, somministrata il giorno stesso del trapianto. La dose del farmaco veniva successivamente adattata sul singolo paziente per mantenere una concentrazione plasmatica di 10-15 ng ml⁻¹ i primi 3 mesi dopo il trapianto, 8-12 ng ml⁻¹ nei mesi seguenti fino ad 1 anno e 5-10 ng ml⁻¹ negli anni successivi. L'aggiustamento della dose veniva effettuato in cieco.

I pazienti sono stati genotipati per *CYP3A5**3 (rs776746, 6986A>G), *CYP3A4**1B (rs2740574, -290A>T), *ABCB1* -129T>C (rs3213619), *ABCB1* 1236C>T (rs1128503), *ABCB1* 2677G>T/A (rs2032582) e *ABCB1* 3435C>T (rs1045642). Altre potenziali determinanti cliniche (sesso, età, peso, altezza, indice di massa corporea, diabete, creatinina/velocità di filtrazione glomerulare stimata, albumina, emoglobina/ematocrito) e genetiche (*CYP3A4*, *CYP3A5* e *ABCB1* SNPs) sono state incluse nell'analisi. Tutti i pazienti reclutati erano caucasici. Non vi erano differenze significative in termini di caratteristiche demografiche, funzione renale, ematocrito e albumina tra portatori della variante allelica *CYP3A4**22 e omozigoti *wild-type* (*CYP3A4**1/*1) in entrambe le coorti e non sono state riscontrate differenze significative nei test di funzionalità epatica, nel profilo lipidico, nell'impiego e nel dosaggio di corticosteroidi, acido micofenolico e altri farmaci assunti concomitantemente.

Nella coorte di pazienti a tre mesi dal trapianto (n=59), tutti gli SNP erano all'equilibrio di Hardy-Weinberg. Come atteso, *CYP3A5**1/*3 e *CYP3A4**1/*1B ($r^2=0.47$, $D'=1.00$), *ABCB1* 2677 e *ABCB1* 3435 ($r^2=0.52$, $D'=0.85$), *ABCB1* 1236 e *ABCB1* 3435 ($r^2=0.33$, $D'=0.73$), e *ABCB1* 1236 e *ABCB1* 2677 ($r^2=0.81$, $D'=0.92$) erano in forte *linkage disequilibrium*. In tutta la popolazione studiata, solo un individuo con il polimorfismo a carico di *CYP3A5* nella coorte dei pazienti a 3 mesi dal trapianto era anche portatore della variante allelica *CYP3A4**22T. Nessuna differenza significativa è stata riscontrata confrontando i genotipi *CYP3A4**1B e *ABCB1* tra i carriers dell'allele T in *CYP3A4**22 e gli omozigoti CC-*wild type* in entrambe le coorti.

La *clearance* orale apparente media del MDZ era del 33.6% (P=0.05) e del 31.7% (P=0.04) più bassa nei portatori dell'allele *CYP3A4**22T rispetto ai pazienti *CYP3A4* *wild-type*, a 3 e ~12 mesi dopo il trapianto, rispettivamente. La farmacocinetica del MDZ non era influenzata dai polimorfismi a carico di *ABCB1*, né dal genotipo *CYP3A4**1/*1B.

Nella coorte a ~12 mesi dal trapianto, ma non in quella a 3 mesi, nei non portatori del polimorfismo a carico del *CYP3A5* (omozigoti *CYP3A5**3/*3), la dose di tacrolimus normalizzata era significativamente più alta nei portatori dell'allele *CYP3A4**22T rispetto agli omozigoti CC; in tali pazienti, la *clearance* orale media del tacrolimus allo stato stazionario era ridotta del 36.2%. Di conseguenza, la dose media di tacrolimus nei *CYP3A4**22T-carriers era del 50% più bassa rispetto agli omozigoti *wild-type* (2.7±0.9 mg day⁻¹ vs 5.4±2.2 mg day⁻¹; P=0.0007).

In un modello di analisi multivariata, la presenza di entrambi i polimorfismi a carico di *CYP3A5**1 e *CYP3A4**22 era in grado di spiegare il 29.3-38.8% della variabilità nella farmacocinetica del tacrolimus. In tale modello, tuttavia, il genotipo *CYP3A5**1 era responsabile della maggior parte della variabilità nella farmacocinetica del tacrolimus (26.5-35.2%) rispetto al genotipo *CYP3A4**22 (2.4-4.4%).

Nonostante la bassa frequenza allelica del polimorfismo *CYP3A4**22 nei caucasici e il basso potere predittivo sulla farmacocinetica del tacrolimus all'analisi multivariata, tale polimorfismo potrebbe avere importanti implicazioni cliniche, specialmente nei pazienti appena trapiantati non portatori del polimorfismo di *CYP3A5* a cui viene somministrata la dose da carico di tacrolimus di 0.2 mg kg⁻¹. Considerando che nei portatori della variante allelica la dose di tacrolimus dovrebbe essere ridotta del 25-50%, una dose da carico standard potrebbe comportare una over-esposizione al farmaco, con conseguente tossicità (nefrotossicità, nefrotossicità e diabete mellito).

Nei pazienti sottoposti a trapianto allogenico di rene non portatori del polimorfismo a carico del *CYP3A5*, la presenza di un allele *CYP3A4**22T era associato ad riduzione della *clearance* apparente del MDZ del 31.7-33.6%. Inoltre, a ~12 mesi dopo il trapianto, la *clearance* del tacrolimus era ridotta del 36.8% nei portatori dell'allele *CYP3A4**22T rispetto agli omozigoti *CYP3A4**22CC-*wild type*, comportando una riduzione del 50% della dose del farmaco. Entrambe queste osservazioni nei pazienti trapiantati sono coerenti con una riduzione dell'attività del *CYP3A4* *in vivo* nei portatori dell'allele *CYP3A4**22T.

Parole chiave: tacrolimus, trapianto allogenico di rene, *CYP3A4**22

Riferimento bibliografico

[de Jonge H](#) et al. *Pharmacogenomics J* 2014 Oct 7 [Epub ahead of print].

ALTERAZIONI GENETICHE NELLA SINDROME NEFROSICA SPORADICA CORRELATE CON LA RESISTENZA ALL'IMMUNSOPPRESSIONE

A cura della Dott.ssa Eva Cuzzoni

La sindrome nefrotica rappresenta una delle più comuni diagnosi in nefrologia pediatrica, con una prevalenza di 16 casi per 100.000 bambini nei paesi occidentali. Nella maggior parte dei casi, la patogenesi della sindrome nefrosica resta ancora sconosciuta, e il fenotipo clinico dei pazienti non consente di discriminare tra le diverse cause della patologia. I bambini con sindrome nefrosica vengono normalmente trattati con corticosteroidi prima di qualsiasi procedura diagnostica, e circa l'80% di essi risponde a questi farmaci. Secondo la risposta clinica, i pazienti vengono suddivisi in due categorie: pazienti con sindrome nefrosica sensibili agli steroidi [SNSS] e pazienti con sindrome nefrosica resistente agli steroidi [SNRS]. Normalmente i bambini affetti da SNSS presentano una buona prognosi a lungo termine, ma la maggior parte dei pazienti con SNRS progredisce a stati finali di malattie renali entro 2-10 anni dalla diagnosi. Ad oggi le cause proposte per la resistenza ai corticosteroidi sono molteplici, come ad esempio mutazioni nei geni che regolano l'integrità funzionale dei podociti così come i fattori di permeabilità o altri agenti ambientali che alterano le membrane dei podociti. In letteratura almeno 19 geni sono stati identificati come cause di SNRS, conferendo una notevole eterogeneità genetica alla sindrome nefrosica. Studi su singoli geni hanno evidenziato che solo una piccola percentuale di tutti i casi di sindrome nefrosica è dovuta a difetti di un singolo gene, mentre studi più recenti hanno suggerito che la frequenza di sindrome nefrosica con causa genetica può essere aumentata se vengono analizzati diversi geni contemporaneamente.

In questo studio, gli autori hanno analizzato specificamente la prevalenza di difetti genetici nei bambini con forme sporadiche di sindrome nefrosica, e hanno ipotizzato che la presenza di alterazioni genetiche per i geni dei podociti potrebbero essere associate in modo significativo con la resistenza agli steroidi e a trattamenti immunosoppressivi in questi pazienti.

Nello studio sono stati inclusi un totale di 69 pazienti affetti da sindrome nefrosica sporadica, non sindromica, e non congenita arruolati presso l'ospedale pediatrico Meyer di Firenze dal 2000 al 2013.

La resistenza agli steroidi è stata definita come la non remissione dopo 8 settimane di prednisone (60 mg/m² al giorno o 2 mg/kg al giorno per 4 settimane seguito da 40 mg/m² o 1,5 mg/kg a giorni alterni per 4 settimane) seguendo le linee base KDIGO. Nessuno dei pazienti arruolati ha presentato un fenotipo di risposta lenta al trattamento con steroidi. La remissione completa, la remissione parziale, e l'assenza della remissione sono state definite secondo le linee guida dell'associazione KDIGO (*kidney disease improving global outcome*). Sulla base di questi criteri, sono stati selezionati 31 pazienti con SNRS e 38 pazienti con lo stesso fenotipo clinico sensibili al trattamento steroideo. Tutte le informazioni cliniche e la risposta al trattamento sono state raccolte retrospettivamente. Il DNA dei pazienti è stato estratto da sangue periferico utilizzando il Kit QIAamp DNA Mini Kit, e le librerie di DNA sono state costruite utilizzando il protocollo di preparazione del campione Roche. Nell'array sono stati inclusi 19 geni correlati alla comparsa di sindrome nefrosica; inoltre per poter identificare nuovi geni che potrebbero essere coinvolti nella patologia, sono stati inclusi altri 27 geni candidati associati con proteinuria in modelli animali e espressi nella barriera di filtrazione glomerulare. Per il sequenziamento è stata utilizzata la piattaforma Roche 454 Sequencing FLX Platform seguendo il protocollo del produttore.

Sulla base dei risultati, le varianti sono state classificate come: varianti potenzialmente patogeniche, varianti con significato clinico sconosciuto, o varianti benigne in conformità con le linee guida dell'American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). Fra i 69 pazienti, 10 presentavano 17 alleli mutati che soddisfavano i criteri per la diagnosi molecolare. Nello specifico gli autori hanno rilevato in cinque pazienti diverse varianti nel gene *NPHS2* (due omozigoti e tre eterozigoti) già descritte in letteratura come varianti potenzialmente patogeniche. Inoltre, in due pazienti, hanno evidenziato due varianti nel gene *PLCE1* non ancora note in letteratura (entrambe in eterozigosi). Infine, in altri tre pazienti hanno mostrato varianti in eterozigosi nei geni *ACTN4* e *LMX1B* anche queste non ancora identificate in letteratura. Raccogliendo

retrospettivamente le informazioni cliniche e patologiche dei pazienti per valutare le possibili associazioni con i risultati del sequenziamento genetico, gli autori hanno osservato che tutti i 10 pazienti con le varianti evidenziate erano resistenti agli steroidi, portando ad una prevalenza del 32,3% delle forme genetiche tra i pazienti con SNRS sporadica. Al contrario, nessuna alterazione genetica è stata trovata nel gruppo di pazienti con SNSS (chi-quadrato = 11.85; $p = 0.001$).

L'età alla insorgenza della sindrome nefrosica non ha presentato differenze significative tra il gruppo con varianti e quelli senza, anche se gli autori sottolineano che le differenze nella distribuzione dell'età potrebbero diventare significative se il numero dei pazienti analizzati venisse ampliato. Valutando le 28 biopsie renali disponibili dei pazienti SNRS per la diagnosi patologica, gli autori dello studio non hanno evidenziato nessuna differenza significativa tra i pazienti con varianti e non nella frequenza di glomerulosclerosi segmentaria e focale (66,7% vs 63,2%), malattia a lesioni minime (22,1% contro il 21%) e diffusa sclerosi mesangiale (11,1% rispetto al 15,8%), mostrando che né le caratteristiche cliniche né il fenotipo patologico sembrano essere in grado di distinguere tra questi due gruppi.

Infine, gli autori hanno valutato la risposta ai trattamenti immunosoppressivi evidenziando una significativa differenza tra i pazienti SNRS mutati e non mutati. Infatti, sei dei 10 bambini con SNRS mutati arruolati nello studio sono stati trattati con farmaci immunosoppressori, ma nessuno di loro ha risposto al trattamento con questi farmaci; è stata invece osservata una risposta agli immunosoppressori in 57,9% dei bambini affetti da SNRS senza mutazioni (chi-quadrato = 4.08; $p = 0,05$). Inoltre tutti i pazienti con SNSS arruolati nello studio hanno risposto ai farmaci immunosoppressivi. Infine, 26 pazienti con SNRS sono stati trattati con inibitori del sistema renina angiotensina (RAS-IS). Gli autori evidenziano che anche se questo gruppo di pazienti è troppo piccolo per trarre conclusioni efficaci, il numero di pazienti che hanno risposto per RAS-IS non è significativamente differente tra i pazienti SNRS mutata e non mutata (33,3% vs 47,1%). Questi risultati suggeriscono che almeno un sottoinsieme di bambini mutati potrebbero trarre beneficio dal trattamento con RAS-IS.

Lo screening attraverso NGS dei geni coinvolti nella sindrome nefrosica resistente agli steroidi ha identificato varianti potenzialmente patogeniche solo in pazienti resistenti e non in quelli sensibili. In pazienti con sindrome nefrosica potrebbe quindi essere utile la consulenza genetica mediante sequenziamento per personalizzare la terapia in un modo veloce e conveniente.

Parole chiave: sindrome nefrosica, steroidi, varianti genetiche

Riferimento bibliografico

[Giglio S](#) et al. *J Am Soc Nephrol* 2014Jul 24[Epub ahead of print].

DIABETOLOGIA

ASSOCIAZIONE FARMACOGENETICA TRA UNA VARIANTE NEL GENE CALPAINA 10 (CAPN10) E LA RISPOSTA ALLA TERAPIA CON METFORMINA IN PAZIENTI AFFETTI DA DIABETE DI TIPO 2

A cura della Dott.ssa Sarah Cargnin

La metformina è un farmaco di prima scelta per il trattamento monoterapico del diabete di tipo 2. Una recente meta-analisi condotta su 35 *trials* clinici ha dimostrato che la metformina in monoterapia riduce i livelli di emoglobina glicata (HbA1c) dell'1.12% in media, con un intervallo di confidenza al 95% di 0,92-1,32. L'ampiezza di tale intervallo di confidenza suggerisce una forte variabilità interindividuale nella risposta ipoglicemizzante al trattamento con metformina ed evidenzia come una consistente proporzione di soggetti non risponda adeguatamente alla terapia. Fattori genetici, fisiologici (attività epatica o renale) e psicologici (ad es. l'aderenza al trattamento) sembrano impattare fortemente sulla risposta alla terapia con metformina. Tale farmaco agisce primariamente inibendo la gluconeogenesi epatica tramite l'attivazione

dell'adenosina monofosfato protein-chinasi (AMPK). La serina-treonina chinasi 11 (STK11) è un importante attivatore di AMPK in quanto ne fosforila il *loop* di attivazione della subunità catalitica α . La forma attivata di AMPK induce un'inibizione dell'attività di alcuni dei principali fattori che regolano il metabolismo glucidico, tra i quali il coattivatore-1 α dei recettori gamma attivati dai proliferatori dei perossisomi (PGC-1 α) e il fattore nucleare-4 α degli epatociti (HNF-4 α). L'inibizione di queste molecole risulta nella soppressione della gluconeogenesi epatica tramite la down-regolazione dell'espressione di alcuni enzimi epatici chiave nella gluconeogenesi, quali la fosfoenolpiruvato carbossichinasi (PEPCK) e la glucosio-6-fosfatasi. Inoltre, è stato recentemente scoperto come la metformina, oltre ad attivare AMPK, agisca inibendo il complesso I della catena respiratoria mitocondriale. Tale complesso risulta essere ulteriormente bloccato dalla calpaina 10 (codificato dal gene CAPN10), una molecola implicata nella patogenesi del diabete di tipo 2 in quanto capace di alterare l'insulino-resistenza e la secrezione di insulina. Obiettivo dello studio è stato quello di analizzare la potenziale associazione tra alcune varianti in geni coinvolti nella farmacodinamica della metformina e la risposta ipoglicemizzante alla terapia con essa in un gruppo di pazienti affetti da diabete mellito di tipo 2 e naïve al trattamento con metformina. Nello specifico, sono state studiate varianti dei geni STK11, PRKAA1 (codificante per la subunità catalitica α di AMPK), PPARGCA1A (codificante per PGC-1 α), HNF-4 α , PCK1 (codificante per PEPCK) e CAPN10 (codificante per la calpaina 10).

Lo studio è stato condotto su una coorte di pazienti caucasici affetti da diabete mellito di tipo 2 e naïve al trattamento con metformina. La diagnosi di diabete mellito di tipo 2 è stata effettuata sulla base dei criteri diagnostici stabiliti dall'*American Diabetes Association*. Sono stati esclusi dallo studio i soggetti affetti da neoplasie, malattie endocrine, malattia renale cronica allo stadio 3-5, patologie epatiche severe e malattie infiammatorie sistemiche. Sono stati inclusi nello studio i pazienti con livelli di HbA1c compresi tra 6,5% e 11%. I livelli di HbA1c al *baseline* sono stati misurati entro una settimana dall'inizio del trattamento con metformina mentre la seconda misurazione dei livelli di emoglobina glicata è stata effettuata a 6 mesi dall'inizio della monoterapia con metformina. La risposta ipoglicemizzante al trattamento con metformina è stata definita come abbassamento del tasso di HbA1c al di sotto del 7%. La genotipizzazione delle varianti in analisi (STK11 rs741765, PPARGCA1A rs10213440, HNF4A rs11086926, CAPN10 rs3792269, PRKAA1 rs249429 e PCK1 rs4810083) è avvenuta tramite analisi ad alta risoluzione delle curve di melting (HRMA) in RealTime-PCR.

Sono stati inclusi nello studio 148 pazienti (di cui 72 maschi) di età media di $57,5 \pm 0,4$ anni, con un BMI medio di $31,5 \pm 0,4$ kg/m² ed esposti ad una dose media di metformina di $1,40 \pm 0,04$ g/die. I livelli medi di HbA1c al *baseline* erano di $7,64 \pm 0,09\%$; dopo 6 mesi di trattamento monoterapico con metformina, il tasso di HbA1c si è ridotto nell'intero gruppo in studio in media dello $0,66 \pm 0,08\%$ mentre il target terapeutico di riduzione dell'emoglobina glicata a livelli inferiori del 7% è stato raggiunto nel 65% (N=96) dei pazienti in studio.

Tra le varianti genetiche analizzate, solo lo SNP rs741765 del gene STK11 non rispettava l'equilibrio di Hardy-Weinberg ed è pertanto stata esclusa dall'analisi di associazione. Dall'analisi logistica multivariata è emerso come CAPN10 rs3792269 fosse l'unica variante genetica associata in maniera statisticamente significativa alla riduzione dei livelli di HbA1c al di sotto della soglia del 7% (OR 0.27, 95% CI: 0.12-0.62, P=0.002, P=0.012 dopo correzione di Bonferroni). Nello specifico, nel modello dominante, i portatori dell'allele minore G risultavano avere una minore probabilità di raggiungere l'obiettivo terapeutico (riduzione dei tassi di HbA1c al di sotto del 7%) rispetto ai pazienti omozigoti per l'allele A (OR 0.24, 95% CI: 0.10-0.59, P=0.002).

Le calpaine sono delle proteasi intracellulari calcio-dipendenti che svolgono un ruolo chiave nel *signalling* del calcio. Alcune evidenze in letteratura supportano un potenziale ruolo della calpaina 10 nel modulare sia l'insulino-resistenza che la secrezione di insulina stessa. L'inibizione del complesso I mitocondriale sembra svolgere un ruolo chiave nel meccanismo d'azione della metformina. A tale proposito, Arrington e colleghi (Arrington et al. 2006) hanno evidenziato come la calpaina 10 funga da mediatore nella disfunzione mitocondriale favorendo il clivaggio di due subunità critiche del complesso I mitocondriale e l'alterazione della permeabilità della membrana mitocondriale interna.

La variante rs3792269 del gene CAPN10, codificante per la calpaina 10, è correlata alla risposta al trattamento ipoglicemizzante con metformina in pazienti affetti da diabete di tipo 2.

Nello specifico i portatori dell'allele minore G per tale variante, presentano il 76% di probabilità in meno rispetto ai pazienti omozigoti *wild-type* di raggiungere l'obiettivo terapeutico della terapia con metformina, che consiste nella riduzione dei livelli di HbA1c al di sotto della soglia del 7%. Ulteriori studi, preferibilmente prospettici e multicentrici, sono necessari per confermare tale associazione e per determinare l'utilità clinica dello screening per rs3792269 nei pazienti diabetici in trattamento con metformina.

Parole chiave: metformina, risposta ipoglicemizzante, CAPN10

Riferimento bibliografico

[Tkáč I](#) et al. *Eur J Clin Pharmacol* 2014 Oct 21 [Epub ahead of print].

La redazione augura a tutti Buone Feste



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; 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

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 Eva Cuzzoni (Università di Trieste) Dott.ssa Marzia Del Re (Università di Pisa) Dott.ssa Lucia Gozzo (Università di Catania) Dott.ssa Claudia Pisanu (Università di Cagliari) Dott.ssa Gloria Ravagnini (Università di Bologna) Dott.ssa Giusy Russomanno (Università di Salerno) Dott. Alessio Squassina (Università di Cagliari)

Archivio SIF-Farmacogenetica Edicola Virtuale SIF

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

Contatti: webmaster@sifweb.org

DISCLAIMER – Leggere attentamente

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

RICEZIONE NEWSLETTER

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

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