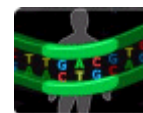


**SIF - FARMACOGENETICA****Newsletter Numero 78 – Novembre 2015**

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

Sommario**⇒ Oncologia**

- Difetti nei sistemi di riparazione del DNA e risposta ad olaparib nel carcinoma prostatico metastatico
- La terapia con carboplatino e decitabina nel cancro ovarico ricorrente platino-resistente altera le concentrazioni dei miRNA circolanti: uno studio pilota
- Varianti geniche nei geni del *pathway* di VEGF nei pazienti affetti da tumore al seno neo adiuvante in cura con bevacizumab: risultati dello studio randomizzato di fase III GeparQuinto
- I *long non-coding* RNA (lncRNAs) (lincRNA-p21, GAS5, HOTAIR) sono in grado di predire la risposta alla terapia nei pazienti affetti da tumore della testa e del collo trattati con chemioradioterapia?

⇒ Neurologia

- Studio di associazione *genome-wide* della risposta ad antidepressivi in una popolazione di soggetti coreani affetti da depressione maggiore
- Associazione di polimorfismi dei recettori per l'orexina con l'aumento di peso indotto da antipsicotici

⇒ Cardiovascolare

- Un nuovo algoritmo che incorpora la farmacogenetica del CYP2C19 e le interazioni farmacologiche per ottimizzare la risposta terapeutica al clopidogrel
- Resistenza al warfarin associata ad un polimorfismo genetico in VKORC1: collegamento tra la risposta clinica e il meccanismo molecolare utilizzando un modello computazionale

⇒ Metanalisi del mese

- Effetto positivo dei polimorfismi di ABCB1 sulla sopravvivenza generale e la remissione completa in pazienti con leucemia mieloide acuta: revisione sistematica e meta-analisi

ONCOLOGIA**DIFETTI NEI SISTEMI DI RIPARAZIONE DEL DNA E RISPOSTA AD OLAPARIB NEL CARCINOMA PROSTATICO METASTATICO**

A cura della Dott.ssa Lucia Gozzo

Il carcinoma prostatico, il tumore più comune e la sesta causa di morte per neoplasia nell'uomo, presenta una riconosciuta eterogeneità molecolare che tuttavia non viene utilizzata per indirizzare il trattamento (*Baca SC et al. Cell 2013;153:666-77. Grasso CS et al. Nature 2012;487:239-43*). L'identificazione di marker predittivi sarebbe utile per un trattamento più preciso della patologia.

Il carcinoma della prostata metastatico resistente alla castrazione può presentare alterazioni genomiche che interferiscono con la riparazione DNA, alcune delle quali sono state associate con la risposta al platino ed agli inibitori della poli-ADP ribosio polimerasi (PARP) (Beltran H et al. *Eur Urol* 2013,63:920-6; Farmer H et al. *Nature* 2005,434:917-21; Bryant HE et al. *Nature* 2005,434:913-7; Fong PCP et al. *N Engl J Med* 2009,361:123-34; Kaufman B et al. *J Clin Oncol* 2015,33:244-50). L'inibizione di PARP ha mostrato una duratura attività anti-tumorale in pazienti con tumore prostatico metastatico resistente alla castrazione e con mutazioni del *BRCA2* (Sandhu SK et al. *Ann Oncol* 2013,24:1416-8; Sandhu SK et al. *Lancet Oncol* 2013,14:882-92; Castro E et al. *J Clin Oncol* 2013,31:1748-57). È stato ipotizzato, pertanto, che l'inibitore di PARP olaparib possa risultare attivo in casi di tumore prostatico castrazione-resistente con difetti della riparazione del DNA.

Nello studio TOPARP-A (*Trial of PARP Inhibition in Prostate Cancer*), in aperto, a singolo gruppo, di fase 2, multicentrico, pazienti con carcinoma prostatico resistente alla castrazione sono stati trattati con olaparib ed è stata studiata la presenza su campioni biotici di mutazioni germinali e somatiche del DNA, in modo da valutare l'eventuale associazione tra sensibilità all'inibizione di PARP e la presenza di aberrazioni genomiche. Tutti i pazienti sono stati trattati con 400 mg x 2/die di olaparib fino a progressione radiologica, progressione clinica, effetti avversi inaccettabili, ritiro del consenso o morte. La risposta è stata definita secondo i criteri RECIST versione 1.1, da una riduzione dell'antigene prostatico-specifico (PSA) del 50% o più, o da una riduzione delle cellule tumorali circolanti a meno di 5 per 7,5 ml. La valutazione del paziente è stata eseguita al basale e ogni 12 settimane.

Lo studio ha arruolato pazienti con carcinoma della prostata metastatico resistente alla castrazione con progressione dopo uno o due cicli di chemioterapia, esclusi il trattamento con platino, ciclofosfamide, mitoxantrone ed inibitori di PARP, ECOG *performance status* da 0 a 2, adeguata funzione d'organo, 5 o più cellule tumorali per 7,5 ml.

Tra luglio 2012 e settembre 2014 sono stati arruolati 50 pazienti in 7 centri. Un paziente è stato perso al follow-up dopo la prima settimana e pertanto non è stato considerato valutabile. Al momento dell'analisi dei dati 35 dei 50 pazienti erano deceduti (70%). La sopravvivenza media era di 10,1 mesi, con un follow-up medio di 14,4 mesi. Dei 49 pazienti valutabili 16 hanno avuto una risposta all'olaparib (33%). La durata media del trattamento per i 16 pazienti che hanno risposto era di 40 settimane, con 12 pazienti che hanno ricevuto il trattamento per 6 mesi e 4 per più di 12 mesi. Il 22% (11/49 pazienti) ha avuto una riduzione dei livelli di PSA del 50% o più. Il numero medio di cellule tumorali circolanti al basale era di 37 cellule per 7,5 ml di sangue; 14 dei 49 pazienti (29%) ha avuto una riduzione delle cellule circolanti a meno di 5 cellule. Il 65% dei pazienti (32/49) aveva una malattia misurabile al basale secondo i criteri RECIST versione 1.1; 6 di questi pazienti hanno avuto una risposta parziale radiologica. Dei 49 pazienti per i quali poteva essere valutata la risposta, per 43 era disponibile materiale biotico sufficiente per il sequenziamento. Per gli altri 6 sono stati utilizzati campioni prelevati alla diagnosi. Il 33% (16 pazienti) presentava un'aberrazione dei geni di riparazione del DNA, di cui 7 erano aberrazioni del *BRCA2*, 5 aberrazioni dell'*ATM*, 3 delezioni somatiche omozigoti di *BRCA1* o *CHEK2* con delezione *FANCA*. In un paziente è stata poi individuata una mutazione *frameshift* in *PALB2*; inoltre aberrazioni somatiche bi-alleliche nella istone deacetilasi 2 (*HDAC2*) con ruolo nella funzione di ATM e nella risposta al danno del DNA sono state individuate in un altro

paziente. In generale i pazienti con aberrazione nei geni di riparazione del DNA hanno presentato un tasso significativamente più elevato di risposta ($p < 0,001$), con 14 su 16 pazienti con biomarker-positivi responsivi all'olaparib (88%). Solo 2 dei 33 pazienti con biomarker negativi (6%) hanno avuto una risposta. La sopravvivenza libera da progressione radiologica è risultata significativamente più lunga nel gruppo con biomarker positivi (9,8 versus 2,7; $p < 0,001$), come anche la sopravvivenza globale (13,8 versus 7,5; $p = 0,05$). Tutti i portatori della mutazione *BRCA2* hanno avuto una caduta dei livelli di PSA uguale o superiore al 50% del basale, ed i 5 pazienti con malattia misurabile hanno anche avuto una risposta radiologica parziale. Tra i 5 pazienti con mutazioni di ATM, 4 hanno avuto una risposta al farmaco, inclusi i 3 con mutazioni causanti perdita del dominio catalitico della chinasi ma senza difetti sul secondo allele.

I risultati di questo studio suggeriscono la possibilità di stratificare il carcinoma metastatico della prostata, in base alla presenza di deficit nei sistemi di riparazione del DNA. La risposta al trattamento con olaparib è durata per più di sei mesi ed è stata associata con una sopravvivenza libera da progressione radiologica e con una caduta del numero di cellule tumorali circolanti. Non è possibile al momento stabilire se olaparib migliori anche la sopravvivenza globale in questi pazienti.

In conclusione, in questo studio viene riportata l'attività anti-tumorale dell'inibitore di PARP olaparib in casi sporadici di carcinoma della prostata metastatico, resistente al trattamento standard, in particolare in presenza di difetti dei sistemi di riparazione del DNA.

Parole chiave: carcinoma prostatico metastatico, sistemi di riparazione del DNA, olaparib

Riferimento bibliografico

[Mateo J](#) et al. *N Engl J Med* 2015, 373(18): 1697-708.

LA TERAPIA CON CARBOPLATINO E DECITABINA NEL CANCRO OVARICO RICORRENTE PLATINO-RESISTENTE ALTERA LE CONCENTRAZIONI DEI MIRNA CIRCOLANTI: UNO STUDIO PILOTA

A cura della Dott.ssa Gloria Ravegnini

Ogni anno, sono diagnosticati più di 200.000 nuovi casi di cancro ovarico (OC) nel mondo, di cui tra i tipi più comuni compare quello epiteliale (EOC). Benché in terapia venga correntemente impiegato il CA-125, tuttavia questo non rappresenta un marker di rischio di recidiva o di risposta alla chemioterapia. Per questo la ricerca si sta sforzando di identificare nuovi biomarker ed i microRNA circolanti, già associati con l'*outcome* del OC, potrebbero rappresentare una nuova fonte di informazioni cliniche. I miRNA infatti sono rilasciati nel plasma dai tessuti e dai tumori e sono stabili sia nel plasma che nel sangue intero.

La prima linea di trattamento nel cancro ovarico epiteliale è rappresentata dalla chemioterapia basata sul platino; è stato dimostrato che queste alterano l'espressione dei miRNA nei tessuti.

Date le suddette premesse in questo studio sono state misurate le concentrazioni dei miRNA nel plasma di 14 pazienti con OC ricorrente e platino resistente; in particolare queste pazienti sono state arruolate nell'ambito di un trial clinico di fase II volto a valutare l'associazione terapeutica decitabina + carboplatino. Due sono stati gli obiettivi principali dello studio; il primo è stato quello di valutare le variazioni dei miRNA nel plasma in seguito alla chemioterapia, mentre il secondo quello di correlare tali variazioni con la risposta clinica, misurata come PFS. Nel dettaglio, ogni paziente è stata trattata con cicli di chemioterapia di 4 settimane composti da infusioni giornaliere di decitabina 10 mg/m² per 5 giorni, seguiti da carboplatino al giorno 8 per via endovenosa; tale chemioterapia è stata mantenuta fino alla comparsa di progressione o tossicità non tollerabile. I miRNA sono stati isolati dal plasma prelevato a due specifici *endpoints*, prima dell'inizio del primo ciclo di chemioterapia e al ventinovesimo giorno dopo l'inizio del trattamento. Pazienti con progressione della malattia prima del ciclo 6 (n=8) sono state considerate non responsive, mentre quelle con progressione dopo il sesto ciclo (n=6) sono state definite responsive. L'espressione dei miRNA così estratti è stata valutata mediante array specifici che hanno permesso di osservare una differenza significativa

tra i due *endpoints* per 93 miRNAs. Questi 93 miRNA sono stati successivamente analizzati mediante un array custom da cui è emerso che 78 avevano curve di qPCR accettabili. I 78 miRNA sono stati quindi confrontati prima e dopo la terapia e da ciò è emerso che 10 (miR-193a-5p, miR-375, miR-339-5p, miR-340-5p, miR532-3p, miR-133a-5p, miR-25-3p, miR-10a-5p, miR616-5p, miR-148b-5p) mostravano un *fold-change* tra -2.9 a 4 ($p < 0.05$) ed erano associati con la risposta a decitabina+carboplatino.

Per valutare la potenziale associazione tra la sopravvivenza e le alterazioni nell'espressione dei miRNA plasmatici è stata utilizzata l'analisi Kaplan-Meier; questa ha evidenziato che concentrazioni ridotte di miR-148b-5p al giorno 29 erano associate con progressione della malattia ($p=0.015$). Inoltre nel gruppo dei pazienti non responsivi i livelli di tale miRNA erano più bassi se comparate alla baseline.

Lo studio certamente pone l'attenzione su 3 punti importanti: i) la chemioterapia decitabina+carboplatino induce cambiamenti nell'espressione dei miRNA circolanti in pazienti affette da OC ricorrente; ii) tali miRNA variano in modo diverso tra responsivi e non; iii) miR-148b-5p è associato con PFS.

Di recente la letteratura che riguarda il cancro ovarico e i miRNA circolanti si è fortemente ampliata, e questo testimonia che la ricerca è fortemente spinta verso l'identificazione di potenziali nuovi biomarker alternativi al CA-125 per la clinica. Tuttavia, fino ad oggi, nessun lavoro aveva specificatamente focalizzato l'attenzione su questo regime terapeutico e con *endpoints* così ben definiti. Infatti, come sottolineato dagli autori stessi, questo studio ha tra i punti di forza il fatto che le variazioni dei microRNA sono state analizzate dopo il primo ciclo di chemioterapia; studi precedenti avevano invece monitorato le differenze dopo ben 4 cicli, con il conseguente rischio di non osservare o perdere importanti cambiamenti precoci a livello sierico.

Dall'altro lato, l'analisi presenta almeno 2 limitazioni principali. Infatti essa è stata condotta su un numero limitato di casi; certamente 14 soggetti per un tumore così comune come il cancro ovarico sono davvero pochi e ciò comporta un bassissimo potere statistico e una dubbia ripetibilità del dato in una coorte più estesa. Inoltre, a tal proposito, il lavoro non presenta una fase di validazione dei dati in un gruppo indipendente di soggetti. La seconda limitazione è rappresentata dal fatto che gli autori hanno incluso un singolo *time point*; l'analisi quindi non prende in considerazione variazioni successive al primo ciclo di trattamento e gli autori suggeriscono proprio di indirizzare futuri studi su questo punto.

Malgrado siano necessari ulteriori ricerche per confermare il ruolo predittivo dei miRNA qui identificati, questo studio pone le basi per l'identificazione di possibili nuovi biomarkers per l'*outcome* clinico nel trattamento del cancro ovarico

In conclusione, lo studio in donne con cancro ovarico ricorrente, platino resistente indica che il regime chemioterapico decitabina+carboplatino induce variazioni nelle concentrazioni dei microRNA plasmatici che potrebbero potenzialmente essere impiegate nella predizione della risposta clinica a tale regime terapeutico. Inoltre il miR-148b-5p è risultato correlato con la PFS.

Parole chiave: cancro ovarico, chemioterapia decitabina+carboplatino, miRNA circolanti

Riferimento bibliografico

[Benson E](#) et al. *Plos one* 2015, 10 (10): e0141279

VARIANTI GENICHE NEI GENI DEL PATHWAY DI VEGF NEI PAZIENTI AFFETTI DA TUMORE AL SENO NEOADIUVANTE IN CURA CON BEVACIZUMAB: RISULTATI DELLO STUDIO RANDOMIZZATO DI FASE III GEPARQUINTO

A cura della Dott.ssa Giulia Sammarini

Bevacizumab (bev) è un anticorpo monoclonale che blocca la crescita dei tumori ai vasi sanguigni inibendo VEGF-A. Nonostante l'effetto terapeutico di bev appaia modesto nel panorama del tumore al seno (BC) metastatico, recenti studi neoadiuvanti hanno mostrato un minimo ma significativo incremento nella risposta completa al trattamento (pCR) nelle pazienti con BC HER2-negativo. Il trial GeparQuinto ha evidenziato che le pazienti affette da BC triplo negativo (TN) hanno un maggior beneficio dal trattamento con bev rispetto alle non-TNBC. L'ipotesi di questo studio è stata che la variabilità genetica germinale sia alla base degli effetti anti-angiogenetici del bevacizumab. L'angiogenesi è un processo che influenza il microambiente

tumorale, la regressione dei vasi e la loro permeabilità, che sono indirettamente collegati alla regressione del tumore stesso. Il principale obiettivo di questo studio è stato di determinare come gli SNPs nel *pathway* di VEGF fossero associati con l'efficacia di bev nelle pazienti partecipanti al trial di BC neoadiuvante.

In totale sono state arruolate 1984 pazienti con HER2-negativo, trattate con antraciclina e taxani come terapia base. Queste pazienti sono poi state suddivise in due gruppi random ai quali è stato assegnato bevacizumab o placebo. Dall'eliminazione dalla coorte delle pazienti per cui non erano disponibili i campioni di DNA germinale o alcuni dei dati di *genotyping*, si è giunti al numero finale di 729 donne trattate con bev e 724 che hanno rappresentato il gruppo di controllo. Le pazienti hanno ricevuto epirubicina e ciclofosfamide, seguiti da docetaxel, un giorno alla settimana per 3 settimane, per un totale di 4 cicli.

Sono stati selezionati SNPs nei 15 geni appartenenti al *pathway* di VEGF-A: omologhi di VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C e VEGF-D; VEGFR1, VEGFR2 e VEGFR3; il corecettore della neuropilina (NRP1); i regolatori dell'ipossia HIF1A, HIF-2 α (EPAS1), i fattori inibenti HIF (HIF1AN) per un totale di 170 snps più 16 per i quali è già stata dimostrata associazione con l'efficacia di bev o con i livelli di VEGF circolante. Sono stati poi esclusi gli SNPs aventi call rate <95% e quelli con MAF < 0.1. Nell'analisi sono stati analizzati un totale 125 polimorfismi.

Le pazienti con stadio del tumore più avanzato presentano una minore probabilità di giungere a pCR, mentre quelle negative al recettore per l'ormone, o con la classificazione maggiore, hanno una probabilità maggiore di avere una risposta completa. Cinque SNPs risultano associati ad una miglior risposta al trattamento, ma nessuno di questi rimane significativo dopo correzione per test multipli. In particolare, i due snps maggiormente associate con l'efficacia terapeutica, rs833058 and rs699947, sono localizzati a monte del promotore di VEGF-A. Gli OR per l'allele wt, etero e mutato di rs833058 sono, rispettivamente, 2.36 (95% CI, 1.49-3.75), 1.20 (95% CI, 0.88-1.64) and 0.61 (95% CI, 0.34-1.12); mentre quelli di rs699947 sono, rispettivamente, 2.24 (95% CI, 1.31-3.84) 1.40 (95% CI, 1.04-1.88) 0.87 (95% CI, 0.53-1.45).

Da un recente studio di meta-analisi su 6 studi di fase III in cui si testavano gli effetti di bev su pazienti affetti da tumore al colon-retto, al pancreas, al polmone, al seno, al rene e al fegato, è emerso che le varianti genetiche in VEGF-C, EPAS1, IL8RA e VEGF-A sono predittori di risposta in seguito al trattamento con bev (de Haas S et al. *Angiogenesis* 2014,17(4):909-20). Lo studio GeparQuinto può essere considerato equiparabile per quanto riguarda il numero di pazienti, con il vantaggio di essere composto di pazienti aventi solo il tumore al seno. Confrontando i risultati di questo studio con quelli ricavati dalla meta-analisi, si può notare come gli SNPs evidenziati nello studio GeparQuinto risultino significativi nella meta-analisi; in particolare, i portatori dell'allele mutato in rs833058 (AA) sono associati, nello studio di *de Haas*, ad una aumentata PFS, mentre rs3025030 e rs3025039 mostrano un differente effetto nelle pazienti con TNBC rispetto alle pazienti con BC. È inoltre interessante notare che i portatori del genotipo AA di rs833058 e rs699947 (VEGF-A), in *linkage* di loro, sono associati con una inserzione, a monte, di 18 nucleotidi, che, da precedenti analisi eseguite *in vitro* e *in vivo* (Shahbazi M et al. *J Am Soc Nephrol* 2002,13(1):260-4; Lambrechts D et al. *Nat Genet* 2003,34(4):383-94) è risultata essere correlata a bassi livelli di espressione di VEGF.

Sono attualmente in corso alcuni studi che associano l'impiego di sunitinib o sorafenib in monoterapia dopo un ciclo di bev in combinazione con la chemioterapia standard. Purtroppo questi studi sono stati interrotti prematuramente a causa del profilo tossicologico sfavorevole presentato dall'associazione con gli inibitori multi-tirosinchinasici. Studi precedenti hanno evidenziato che EPAS1 regola la produzione di VEGFR1 solubile da parte dei macrofagi, che contribuisce all'inibizione di VEGF-A durante l'angiogenesi in modelli murini. Questo meccanismo potrebbe spiegare quanto osservato in questo studio, ovvero che soggetti wild-type per tre SNPs di EPAS1 sono associati ad una migliore risposta dopo trattamento con bev.

In conclusione, i risultati di questo studio suggeriscono una possibile associazione tra alcuni polimorfismi del gene VEGF-A e la risposta al trattamento con bevacizumab.

Parole chiave: cancro al seno, VEGF, bevacizumab

Riferimento bibliografico

[Hein A](#) et al. *Int J Cancer* 2015, 137(12): 2981-8.

I LONG NON-CODING RNA (lncRNAs) (lincRNA-p21, GAS5, HOTAIR) SONO IN GRADO DI PREDIRRE LA RISPOSTA ALLA TERAPIA NEI PAZIENTI AFFETTI DA TUMORE DELLA TESTA E DEL COLLO TRATTATI CON CHEMIORADIOTERAPIA?

A cura delle Dott.sse Alessia Di Silvestre e Marianna Lucafò

Il tumore della testa e del collo (HNC) comprende un gruppo di tumori che originano dal tratto aerodigestivo superiore. I pazienti possono essere trattati secondo un approccio multidisciplinare che comprende chirurgia, chemioterapia (CT) e radioterapia (RT): i tumori al primo stadio vengono trattati con chirurgia e/o RT, mentre i pazienti in uno stadio avanzato del tumore (III e IV) sono sottoposti a chemio-radioterapia concomitante (CRT); nei pazienti non operabili invece il trattamento con CT di induzione, precedente alla CRT definitiva viene ritenuto un'opzione terapeutica promettente. Nonostante i progressi nel trattamento del HNC siano notevoli, si registra un alto tasso di recidive e metastasi distali anche dopo trattamento, per questo motivo è necessaria una valutazione pre- e post-trattamento tramite l'utilizzo di marker in grado di predire la risposta alla terapia.

Negli ultimi anni è di grande interesse lo studio di acidi nucleici circolanti (DNA, *non-coding* RNA) nel plasma o nel siero come potenziali biomarker per la diagnosi, prognosi o trattamento dei tumori. In particolare i *long non-coding* RNA (lncRNA) risultano essere molto interessanti in ambito oncologico.

Lo scopo di questo lavoro è di studiare la relazione tra lncRNA circolanti candidati (lincRNA-p21, GAS5 e HOTAIR) e la risposta al trattamento in una coorte di pazienti affetti da HNC.

Sono stati arruolati, dal 2011 al 2014, 41 pazienti con HNC dell'istituto oncologico dell'Università di Istanbul, e 39 controlli sani. Il 65,9% dei pazienti era affetto da carcinoma nasofaringeo; tutti i pazienti sono stati seguiti ogni 3 mesi per 2 anni e ogni 6 mesi per i 3 anni successivi e poi annualmente. I campioni di sangue sono stati ottenuti al baseline (pre-trattamento) e 4,5 mesi dopo il completamento del trattamento (post-trattamento). I pazienti sono stati trattati con CRT o CT di induzione seguita da CRT. La terapia consiste in 3 cicli di CT di induzione prima della CRT in cui vengono somministrati docetaxel (75 mg/m², ogni 3 settimane) e cisplatino (75mg/m², ogni 3 settimane). La CRT inizia 3 settimane dopo il completamento della CT di induzione e consiste in 2-3 cicli di cisplatino 100 mg/m² somministrati per via endovenosa ogni 3 settimane.

Sono state condotte sui pazienti dettagliate valutazioni cliniche, oltre ad una serie di test biochimici e la conta completa delle cellule del sangue. Inoltre nello studio sono stati eseguiti test di imaging a risonanza magnetica (MRI) della regione tumorale e tomografia a emissione di positroni computerizzata (PET/CT) al fine di valutare l'estensione del tumore pre- e post-trattamento. I pazienti sono stati classificati in diversi gruppi di risposta sulla base dei parametri clinici, MRI o PET/CT in cui si osserva: una completa risposta (CR), con riduzione dei linfonodi <10 mm ed una completa scomparsa della lesione; una risposta parziale (PR), con una diminuzione del 30% della lesione; un peggioramento della malattia (PD), con un aumento di circa il 20% delle dimensioni del tumore.

I lncRNA plasmatici sono stati valutati tramite PCR semiquantitativa, e sono stati inizialmente comparati i livelli al baseline dei pazienti rispetto ai controlli sani. I risultati mostrano che i livelli di lincRNA-p21 e GAS5 sono significativamente più bassi nel plasma dei pazienti rispetto ai donatori sani (lincRNA-p21 0,008 vs 0,571; GAS5 0,126 vs 0,910; p<0,0001 per entrambi) mentre non si osservano differenze nei livelli del lncRNA HOTAIR (0,0123 vs 0,0128). In seguito è stato fatto un confronto dei livelli dei lncRNA prima e dopo trattamento nei pazienti affetti da HNC, i risultati non mostrano però cambiamenti significativi nell'espressione dei tre lncRNA. Contrariamente, analizzando i livelli dei lncRNA prima e dopo trattamento tra il gruppo CR e PR/PD, ottenuti dalla suddivisione dei pazienti in base alla risposta clinica, si osservano delle differenze nei livelli di GAS5: in particolare è stato osservato che i livelli di GAS5 dopo trattamento sono significativamente più alti nei pazienti PD/PR rispetto ai CR (2,43 vs 0,46, rispettivamente, p=0,01). Dalla classificazione dei pazienti in base ai dati di MRI è stato osservato invece livelli superiori di GAS5 prima del trattamento nei pazienti con PR/PD rispetto ai CR (0,98 vs 0,24 rispettivamente, p=0,042). Considerando la suddivisione secondo i parametri PET/CT non si osservano differenze tra i due gruppi.

Questi risultati evidenziano che GAS5 è un promettente candidato nella predizione della risposta al trattamento in pazienti con HNC. Per questo motivo è stata effettuata una curva di receiver operating characteristic (ROC) per valutare il ruolo di GAS5 nella diversa risposta al trattamento. Tale analisi ha permesso di stabilire un cutoff di 0.3 per GAS5, valore soglia in grado di determinare la risposta alla terapia (sensibilità e specificità 82% e 77%, rispettivamente).

I livelli di GAS5 sono stati già associati ad una scarsa risposta in diversi tipi di tumori, compreso l'HNC. Alti livelli di GAS5 circolante potrebbero indicare un aumentato turnover e morte cellulare nei pazienti PD legati ad un maggior rilascio di GAS5 nel flusso sanguigno.

In conclusione questo lavoro ha dimostrato che i livelli di GAS5 circolanti nel plasma potrebbero essere utilizzati come marker predittivi della risposta al trattamento in pazienti affetti da HNC.

Parole chiave: long non-coding circolanti (lncRNA), GAS5, LincRNA-p21, HOTAIR, testa e collo, valore predittivo della risposta al trattamento

Riferimento bibliografico

[Fayda M](#) et al. *Tumour Biol* 2015 Oct 19 [Epub ahead of print].

NEUROLOGIA

STUDIO DI ASSOCIAZIONE *GENOME-WIDE* DELLA RISPOSTA AD ANTIDEPRESSIVI IN UNA POPOLAZIONE DI SOGGETTI COREANI AFFETTI DA DEPRESSIONE MAGGIORE

A cura della Dott.ssa Sarah Cargnin

Il disturbo depressivo maggiore è una patologia psichiatrica invalidante caratterizzata da persistenti episodi di umore depresso fortemente impattanti sulla qualità della vita del soggetto. I farmaci più comunemente utilizzati per la terapia della depressione maggiore includono gli inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina (SSRI), gli inibitori della ricaptazione della serotonina e della noradrenalina (SNRI), gli antidepressivi triciclici e gli inibitori delle MAO (IMAO). Dalla pratica clinica emerge, tuttavia, come un terzo dei soggetti affetti da tale patologia non risponda adeguatamente alla terapia con farmaci antidepressivi fin dalle prime fasi del trattamento. Nonostante siano stati condotti numerosi studi di associazione *genome-wide* finalizzati ad individuare potenziali fattori genetici predittivi della risposta al trattamento con tali farmaci, nessuna delle varianti analizzate è risultata essere associata con una significatività statistica *genome-wide* alla risposta alla terapia. In tale contesto è stato ipotizzato che la natura multicentrica di tali studi contribuisse ad aumentare l'eterogeneità dei pazienti arruolati in termini di etnia, fenotipo e criteri di inclusione, e potesse spiegare, almeno in parte, il fallimento nell'identificazione di associazioni genetiche statisticamente significative. Sulla base di questa osservazione, l'obiettivo di questo studio di associazione *genome-wide* è stato quello di identificare potenziali fattori genetici predittivi della risposta a SSRI in due ampie coorti di pazienti (esplorativa e di validazione) arruolati presso un solo centro di reclutamento ed omogenei in termini di etnia. Inoltre, la replicabilità delle associazioni ivi riscontrate è stata successivamente testata in una coorte di soggetti etnicamente omogenei ed in trattamento con farmaci antidepressivi diversi dagli SSRI.

Lo studio è stato condotto su una coorte esplorativa costituita da 461 pazienti affetti da depressione maggiore ed in trattamento con SSRI. La coorte di replicazione era formata da 230 soggetti in terapia con SSRI mentre i soggetti in terapia con antidepressivi diversi da SSRI (mirtazapina) che costituivano la seconda coorte di replicazione erano 159. Tutti i soggetti arruolati nelle tre coorti erano di etnia coreana, di età ≥ 18 anni e con una diagnosi di episodio di depressione maggiore diagnosticato secondo i criteri *DSM-IV-Text revision*. Sono stati esclusi dallo studio soggetti con comorbidità gravi, gravidanza, profilo psichiatrico instabile (ad esempio, tendenza al suicidio), storia passata di dipendenza da alcool o droghe e disturbi neurologici. Tutti i soggetti in studio risultavano essere in monoterapia con un farmaco SSRI (coorte esplorativa e di validazione) oppure con mirtazapina (seconda coorte di replicazione). La risposta al trattamento con farmaci antidepressivi è stata definita come la riduzione di almeno il 50% del punteggio della scala HAM-D (scala di Hamilton per la depressione a 17 punti) valutato a 6 settimane dall'inizio del trattamento. Sono stati genotipizzati 905,431 SNPs tramite *Affymetrix Genome-wide Human SNP array chip*

6.0. Le varianti emerse come associate alla risposta con antidepressivi con una significatività statistica di $P < 1.00 \times 10^{-5}$ nella coorte esploratoria sono state successivamente genotipizzate nelle due coorti di replicazione tramite *MassARRAY system*. La significatività statistica *genome-wide* è stata settata ad un P_{value} di 5.52×10^{-8} .

I soggetti arruolati nello studio sono risultati essere perlopiù di età avanzata (età media > 60 anni) e affetti da depressione maggiore di moderata-severa gravità. Il 50% circa dei soggetti manifestava una buona risposta agli SSRIs sia nella coorte esploratoria (54.7%) che in quella di validazione (51.3%) mentre oltre il 70% dei soggetti in trattamento con mirtazapina risultava rispondere al farmaco. Tali tassi di risposta farmacologica sono in linea con quelli riportati nella pratica clinica ed escludono l'esistenza di un rating-bias. Nella coorte esploratoria, nessuna delle varianti incluse nell'analisi di associazione è risultata essere associata alla risposta con SSRIs ad un livello di significatività statistica *genome-wide* ($P > 5.52 \times 10^{-8}$). Tuttavia, 4 varianti genetiche (rs10924309, rs7785360, rs12698828, rs8017553) sono emerse essere associate alla risposta con SSRIs con un *P-value* di significatività statistica $< 1.00 \times 10^{-5}$. I soggetti in trattamento con SSRIs appartenenti alla coorte di replicazione sono stati quindi genotipizzati per tali varianti e, nello specifico, unicamente gli SNPs rs7785360 e rs12698828 del gene AUTS2 (in perfetto *linkage disequilibrium* tra loro) sono risultati essere significativamente associati alla risposta agli SSRIs ($P = 1.48 \times 10^{-3}$) in tale coorte. Combinando i risultati ottenuti nella coorte esploratoria con quelli riportati nella coorte di validazione, le due varianti rs7785360 e rs12698828 sono risultate essere associate alla risposta con antidepressivi ad un livello di significatività statistica *genome-wide* ($P = 1.60 \times 10^{-8}$). Per ciascuno dei due SNPs, la frequenza dell'allele minore risultava essere inferiore nei *responders* al farmaco rispetto ai *non-responders* (MAF *responders*: 0.04 vs MAF *non-responders*: 0.11). Inoltre, tali SNPs sono risultati associati anche alla risposta a mirtazapina nella seconda coorte di replicazione ($P = 0.02$; MAF *responders*: 0.04 vs MAF *non-responders*: 0.12). Infine, combinando i risultati ottenuti nelle 3 coorti in studio, i due SNPs risultavano associati alla risposta a farmaci antidepressivi ($P = 6.60 \times 10^{-10}$).

Gli SNPs rs7785360 e rs12698828 sono due varianti introniche del gene AUTS2 localizzato sul cromosoma 7q11.22. Nello specifico, il gene AUTS2 codifica per una proteina nucleare espressa nel sistema nervoso centrale, specificatamente a livello del piatto corticale, zona ventricolare, giro dentato e area 1 e 3 del corno di Ammone dell'ippocampo. In letteratura emerge come tale gene risulti essere fortemente implicato nel disturbo schizoaffettivo o nel disturbo affettivo bipolare nonché in disordini dello sviluppo neurologico, tra cui autismo, disabilità intellettuale e ritardo nello sviluppo. Il fatto che le varianti rs7785360 e rs12698828 risultino essere correlate sia alla risposta con SSRIs che con mirtazapina suggerisce come tali SNPs possano modulare la risposta agli antidepressivi, indipendentemente dal loro specifico meccanismo d'azione. Nel dettaglio, gli SSRIs risultano in un aumento dei livelli di serotonina nello spazio sinaptico mentre la mirtazapina agisce aumentando i livelli sinaptici sia della serotonina che della noradrenalina. Gli Autori dello studio ipotizzano quindi che la neurotrasmissione serotoninergica, implicata in entrambi i meccanismi d'azione, possa essere modulata da un *pathway*, ad ora non noto, a cui gli SNPs di interesse appartengono. A supporto di questa ipotesi gli Autori suggeriscono come, ad esempio, il sistema glutammatergico possa fungere da potenziale link di connessione tra il gene AUTS2 e la risposta ai farmaci antidepressivi. Infatti, alla luce dei risultati ottenuti in questo studio di associazione *genome-wide*, l'evidenza dell'espressione del gene AUTS2 a livello dei neuroni glutammatergici nella zona frontocorticale sembra essere razionalmente correlata alle ormai note alterazioni di tale via di neurotrasmissione nei pazienti depressi nonché alla modulazione da parte degli antidepressivi della neurotrasmissione glutammatergica. Allo stesso modo, il *pathway* del BDNF è stato ipotizzato essere un ulteriore potenziale link tra il gene AUTS2 e la risposta ad antidepressivi. In tale contesto, oltre al fatto che gli antidepressivi sembrano aumentare i livelli di BDNF a livello cerebrale, è stata riportata in letteratura un'associazione tra il BDNF ed il gene AUTS2 in soggetti affetti da autismo. Ulteriori studi si rendono quindi necessari al fine di descrivere uno o più potenziali *pathways* di connessione tra il gene AUTS2 e la risposta a farmaci antidepressivi in pazienti affetti da depressione maggiore.

Questo studio di associazione *genome-wide* identifica una potenziale correlazione delle varianti rs7785360 e rs12698828 del gene AUTS2 con la risposta a farmaci antidepressivi in pazienti di etnia coreana affetti da depressione maggiore.

Parole chiave: depressione maggiore, antidepressivi, AUTS2

Riferimento bibliografico

[Myung W](#) et al. *Transl Psychiatry* 2015, 5:e672

ASSOCIAZIONE DI POLIMORFISMI DEI RECETTORI PER L'OREXINA CON L'AUMENTO DI PESO INDOTTO DA ANTIPSICOTICI

A cura della Dott.ssa Claudia Pisanu

Lo sviluppo di un importante aumento di peso e della sindrome metabolica rappresenta uno dei fattori che più limitano l'utilizzo degli antipsicotici di seconda generazione come clozapina e olanzapina. Studi effettuati su gemelli suggeriscono che l'aumento ponderale indotto da antipsicotici (AIWG) possa essere spiegato, almeno in parte, da fattori genetici. In particolare, è stato suggerito il coinvolgimento di varianti di geni implicati nella regolazione dell'omeostasi energetica. Gli autori di questo studio hanno valutato il ruolo dei geni del sistema orexina/ipocretina nell'aumento di peso indotto da antipsicotici. Il sistema dell'orexina include il gene che codifica per la pre-pro-orexina, che viene clivata in due polipeptidi, orexina A (OXA, ipocretina 1, 33 amminoacidi) e orexina B (OXB, ipocretina 2, 28 amminoacidi). L'azione biologica dei peptidi è mediata da due recettori accoppiati a proteina G: recettore 1 per l'orexina (OX1R o HCRTR1) e recettore 2 per l'orexina (OX2R o HCRTR2), espressi in diverse aree del cervello. Uno studio condotto su topi ha suggerito un ruolo di OX2R nel prevenire obesità e insulino-resistenza indotte da dieta ad alto contenuto di grassi. L'infusione continua di un agonista selettivo del recettore OX2R nei ventricoli laterali dei topi wild-type sottoposti a dieta ad alto contenuto di grassi è stata associata a una riduzione significativa della massa grassa e ad un maggiore consumo di energia. Nello stesso studio, i topi con delezione dell'*OX1R* hanno mostrato una migliore tolleranza glucidica e sensibilità all'insulina, suggerendo che *OX1R* possa avere un ruolo nel mediare gli effetti di una dieta ad alto contenuto di grassi sul metabolismo glucidico. Il sistema dell'orexina è modulato dalla leptina e interagisce con i neuroni che producono neuropeptide Y (NPY) e con il sistema degli endocannabinoidi. Due varianti dei geni che codificano, rispettivamente, per il recettore dei cannabinoidi *CNR1* (rs806378) e per il neuropeptide Y (rs16147) sono state associate con l'AIWG e interagiscono nell'aumentarne il rischio. Inoltre, è stato osservato che gli antipsicotici associati con l'aumento di peso inducono un aumento dell'attività neuronale nei neuroni orexinergerici. Sulla base delle evidenze che suggeriscono un ruolo del sistema dell'orexina nell'omeostasi energetica e nell'AIWG, gli autori hanno genotipizzato i tag single nucleotide polymorphism (SNP) dei geni *HCRTR1* e *HCRTR2* in un campione di pazienti trattati con antipsicotici per individuare varianti associate all'AIWG.

Il campione di *discovery* era costituito da 218 pazienti con schizofrenia o disturbo schizoaffettivo diagnosticati secondo i criteri del DSM-III-R o DSM-IV. I pazienti inclusi nello studio avevano un range di età da 18 a 60 anni e sono stati reclutati presso i centri Charité University Medicine, Berlino, Germania (Campione A, n=88), Case Western Reserve University, Cleveland, USA (Campione B, n=74) e Hillside Hospital di Glen Oaks, NY, USA (Campione C, n=56). I pazienti del campione A assumevano vari antipsicotici e avevano un *follow-up* di sei settimane. I pazienti del campione B erano resistenti o intolleranti al trattamento con antipsicotici tipici, non esposti in precedenza ad antipsicotici atipici, e trattati con clozapina per sei settimane dopo un periodo di *washout* di 7-14 giorni. Il campione C comprendeva pazienti con risposta subottimale ad antipsicotici tipici, randomizzati al trattamento con clozapina (500 mg/die), olanzapina (20 mg/die), risperidone (8 mg/die) o aloperidolo in uno studio in doppio cieco della durata di 14 settimane. I criteri di esclusione comprendevano gravidanza in atto, patologia neurologica organica, trauma cranico severo, condizioni mediche richiedenti trattamenti e non stabilizzate (epatite C, HIV, disturbi tiroidei o diabete mellito), dipendenza da sostanze, disabilità intellettuale clinicamente rilevante e gravi disturbi della personalità. I tagSNP sono stati selezionati includendo la regione 10 kb *upstream* e 2 kb *downstream* dei geni *HCRTR1* e *HCRTR2*. In totale, sono stati genotipizzati su DNA genomico 5 tagSNP per il gene *HCRTR1* e 28 tagSNP per il gene *HCRTR2*. Come campione di replicazione è stato utilizzato un *subset* (n = 122) dei pazienti reclutati tramite il *Clinical Antipsychotic Trials of Intervention Effectiveness* (CATIE). All'interno del *subset* sono stati inseriti pazienti di origine europea che, prima della valutazione *baseline*, non fossero stati esposti per più di 14 giorni al trattamento con antipsicotici associati ad alto rischio di aumento di peso, che avessero *body mass index* (BMI) < 40, che fossero stati randomizzati al trattamento con risperidone o

olanzapina e con più di una misurazione del peso disponibile durante il *follow-up*. L'analisi della covarianza (ANCOVA) è stata utilizzata per valutare l'associazione tra il genotipo e la variazione di peso dal *baseline* al termine dello studio.

L'analisi esplorativa nell'intero campione non ha mostrato per nessuno SNP un'associazione significativa con l'AIWG. Nel sottocampione di pazienti di origine europea (n = 151), gli SNP rs4467775 (P=0.015), rs3134701 (P=0.026) e rs4142972 (P=0.007) del gene *HCRTR2* hanno mostrato associazione nominale con la variazione di peso. Gli autori si sono poi focalizzati sul sottocampione di pazienti di origine europea trattati con clozapina o olanzapina (n = 86). In questo campione, l'aplotipo del gene *HCRTR2* (rs12111375, rs4142972 e rs6922310) è rimasto associato con l'AIWG dopo correzione per *multiple testing*. Nello specifico, l'aplotipo T-G-G è stato associato ad un minore aumento di peso (P=9.1 x E-04) e l'aplotipo T-A-A ad un maggiore rischio di aumento di peso (P=0.0064). Nel campione di validazione le varianti rs3134701 (P=0.043) e rs12662510 (P=0.012) sono state associate nominalmente con la variazione percentuale del BMI dopo trattamento con olanzapina o risperidone. Gli autori hanno inoltre osservato una significatività nominale (*Permutation P value*=0.05) per l'analisi di *gene-gene interaction* tra lo SNP rs4142972 del gene *HCRTR2* e le varianti rs16147 (*NPY*) e rs806378 (*CNR1*) precedentemente genotipizzate e associate con l'AIWG in un altro studio condotto dagli stessi autori.

Questo studio ha valutato per la prima volta il ruolo di varianti dei geni *HCRTR1* e *HCRTR2* nell'aumento di peso indotto da antipsicotici. Nel campione di *discovery*, gli autori hanno evidenziato un'associazione nominale di diversi SNP del gene *HCRTR2*, in particolare rs4142972 e rs6922310, con l'AIWG. Nel campione di replicazione, gli SNP rs3134701 e rs12662510 sono stati associati con l'AIWG. Per gli SNP associati nel campione di *discovery*, si sono osservati trend di associazione per gli stessi genotipi. Gli autori sottolineano che mentre il campione di *discovery* era costituito prevalentemente da pazienti esposti per la prima volta agli antipsicotici atipici, il campione di replicazione era costituito da pazienti precedentemente esposti agli stessi farmaci. I limiti dello studio comprendono anche una sample size ridotta e un potere statistico limitato per l'identificazione di varianti in grado di conferire un rischio modesto di aumento di peso.

In conclusione, lo studio suggerisce che varianti del gene *HCRTR2* possano essere associate all'aumento di peso indotto da antipsicotici.

Parole chiave: antipsicotici, schizofrenia, *HCRTR2*

Riferimento bibliografico

[Tiwari AK](#) et al. *World J Biol Psychiatry* 2015 Oct 8:1-9.

CARDIOVASCOLARE

UN NUOVO ALGORITMO CHE INCORPORA LA FARMACOGENETICA DEL CYP2C19 E LE INTERAZIONI FARMACOLOGICHE PER OTTIMIZZARE LA RISPOSTA TERAPEUTICA AL CLOPIDOGREL

A cura della Dott.ssa Valeria Conti

Il clopidogrel è un antiaggregante piastrinico ampiamente utilizzato per prevenire gli eventi tromboembolici nei pazienti con sindrome coronarica acuta, nei soggetti sottoposti a chirurgia per l'impianto di stent e per la prevenzione secondaria nei pazienti ad alto rischio intolleranti all'aspirina o con fibrillazione atriale che non possono assumere warfarin. La risposta terapeutica è però molto variabile e ciò dipende soprattutto dal fatto che il clopidogrel è un pro-farmaco che deve essere metabolizzato per esercitare la sua azione farmacologica.

L'isoforma CYP2C19 che metabolizzando il pro-farmaco lo rende attivo è estremamente polimorfica. Infatti, sulla base delle varianti identificate nel gene CYP2C19 è possibile distinguere diversi fenotipi. Al genotipo wild type (*1 *1) corrisponde il fenotipo di metabolizzatore estensivo; alla presenza delle varianti a singolo nucleotide (*2,*3 e*17) corrispondono i fenotipi di metabolizzatore povero, intermedio e ultrarapido. Le varianti (*2,*3 e*17) non rappresentano il solo fattore influenzante la risposta terapeutica, ma un ruolo fondamentale è svolto da altri farmaci (spesso necessari nei pazienti eleggibili alla terapia con clopidogrel) che inducono o reprimono l'attività dell'isoforma CYP2C19. Lo scopo di questo studio è stato quello di costruire un algoritmo clinico per ottimizzare il regime terapeutico del clopidogrel che comprendesse sia le varianti genetiche del CYP2C19 sia le eventuali interazioni farmacologiche.

I parametri considerati per la costruzione dell'algoritmo erano quindi la farmacogenetica del CYP2C19 e la co-somministrazione di farmaci induttori o inibitori di tale isoforma enzimatica. La dose "aggiustata" è stata determinata dall'area sotto la curva corrispondente ai differenti genotipi ogni qual volta un farmaco interferente con il CYP2C19 veniva aggiunto al trattamento antiaggregante. Sono stati distinti sei genotipi classificati in quattro gruppi: *17*17 e *17*1, identificati come metabolizzatori ultraestensivi; *1*1, come estensivi; *2-3*17 e *1 *2-3, come intermedi e *2-3 *2-3 come poveri. La maggior parte dei pazienti con genotipo differente dal wild type (*1 1*) che assumevano farmaci (induttori o inibitori del CYP2C19) oltre al clopidogrel richiedevano un aggiustamento della dose di 75 mg. In particolare, se i farmaci co-somministrati erano claritromicina, fluconazolo, fluoxetina, fluvoxamina, omeoprazolo e voriconazolo l'aggiustamento di dose era necessario anche negli individui wild type. Tuttavia, i pazienti *17 *17 che assumevano inibitori del metabolismo del clopidogrel e quelli con genotipo *1 *2-3 o *2 -3 *2-3 che assumevano induttori del CYP2C19 non richiedevano aggiustamenti di dose.

Comprendere e tenere in debita considerazione i diversi effetti dei polimorfismi dell'isoforma CYP2C19 insieme alle interazioni con induttori o inibitori di tale enzima è fondamentale per ridurre l'evenienza di effetti avversi, anche molto gravi, nei pazienti in trattamento antiaggregante con il clopidogrel. A oggi, per aggiustare il dosaggio nei pazienti che non posseggono alleli funzionanti del CYP2C19 i clinici raddoppiano la dose sia di carico sia di mantenimento, oppure cambiano il farmaco con un altro agente antiaggregante come il prasugrel o il ticagrelor. Tuttavia, a oggi, non esistono studi conclusivi circa l'adeguatezza del raddoppio della dose di clopidogrel e, nel caso del cambiamento di terapia, bisogna tenere conto che altri farmaci oltre al clopidogrel possono esporre il paziente a rischio emorragico maggiore.

L'algoritmo proposto in questo studio è il primo che incorpora insieme l'analisi farmacogenetica del CYP2C19 e la co-somministrazione di farmaci induttori o inibitori di tale enzima. Tale algoritmo potrebbe rivelarsi utile per ottimizzare il dosaggio del clopidogrel prevenendo eventi avversi gravi nei pazienti trattati con questo antiaggregante piastrinico.

Parole chiave: clopidogrel, CYP2C19, farmacogenetica, induttori, inibitori, dosaggio

Riferimento bibliografico

Saab YB et al. *Ther Clin Risk Manag* 2015, 11:1421-7.

RESISTENZA AL WARFARIN ASSOCIATA AD UN POLIMORFISMO GENETICO IN VKORC1: COLLEGAMENTO TRA LA RISPOSTA CLINICA E IL MECCANISMO MOLECOLARE UTILIZZANDO UN MODELLO COMPUTAZIONALE

A cura della Dott.ssa Stefania Cheli

Per più di 50 anni la terapia anticoagulante con warfarin è stata il pilastro per il trattamento e la prevenzione del tromboembolismo in pazienti con tromboembolismo venoso, fibrillazione atriale e protesi valvolare cardiaca. L'effetto antitrombotico del warfarin è dovuto all'inibizione della riduzione NADH-dipendente della vitamina K (a vitamina K ridotta) da parte della vitamina K epossido reductasi, che è codificata dal gene VKORC1. Questo provoca, a sua volta, l'inibizione della carbossilazione vitamina K-dipendente dei fattori della coagulazione II, VII, IX e X. S-warfarin, l'enantiomero più attivo, è metabolizzato principalmente dal

citocromo P450 2C9 (CYP2C9), mentre diversi enzimi del P450 e non-P450 contribuiscono al metabolismo del R-warfarin. Warfarin ha un basso indice terapeutico ed è soggetto ad interazioni farmacocinetiche, dovute a induzione o inibizione degli enzimi P450, e ad interazioni farmacodinamiche con agenti che alterano l'omeostasi o la fibrinolisi. Polimorfismi genetici in CYP2C9 e VKORC1 sono i principali responsabili della variabilità del dosaggio e della risposta al warfarin. Diverse varianti nelle regioni codificanti del gene CYP2C9, soprattutto CYP2C9*2 e CYP2C9*3, sono associate ad una diminuzione della clearance metabolica di S-warfarin e pazienti che presentano questi polimorfismi richiedono quindi una dose inferiore di warfarin. Anche i polimorfismi nel gene VKORC1 sono associati con la sensibilità o la resistenza al warfarin. Tuttavia, il meccanismo molecolare responsabile dell'attività alterata di VKORC1 resta in gran parte sconosciuto. Questo studio è iniziato a seguito di un caso clinico di resistenza al warfarin associato ad un polimorfismo genetico nel residuo 66 (Val66Met) di VKORC1. Successivamente è stato costruito un modello, *homology modelling*, della proteina VKORC1 umana al fine di chiarire le modalità di legame della vitamina K 2,3-epossido (KO), R-warfarin e S-warfarin sia con gli enzimi wild-type che mutati di VKORC1. Per ogni modello è stata eseguita un'analisi strutturale in combinazione con un'indagine di *docking in silico* automatizzato, al fine di fornire un meccanismo che potesse spiegare la resistenza al warfarin associata alla variante Val66Met e alle diverse altre varianti polimorfiche di VKORC1.

Raccolta dei campioni e analisi delle concentrazioni plasmatiche di warfarin. Per la determinazione delle concentrazioni plasmatiche di warfarin miscela racemica (*rac*-warfarin) sono stati raccolti campioni multipli di sangue dal paziente in trattamento con warfarin (21 mg/giorno) nell'arco di 24 ore. Per la genotipizzazione di CYP2C9 e VKORC1 sono stati raccolti campioni di sangue intero (10 ml). Le concentrazioni di *rac*-warfarin sono state misurate utilizzando la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC). Sono state calcolate: la concentrazione plasmatica media di warfarin (C_p), come area sotto la curva (AUC) su intervallo di dosaggio (h), e infine la clearance plasmatica media ($CL_{p/F}$). **Homology modelling di VKORC1.** Questo modello per omologia della proteina VKORC1 umana è stato costruito usando i programmi FUGUE e ORCHESTRAR (SYBYL-X 2.1.1, Certara, St Louis, Missouri, USA). La rifinitura degli omologhi cristallizzati identificati da FUGUE è stata eseguita utilizzando gli *Hidden Markov Models* costruiti usando la sequenza *full-length* codificante di VKORC1 umano come query. I modelli *in silico* contenenti le mutazioni sono stati costruiti utilizzando *homology model* a partire dalla proteina wild-type di VKORC1. I residui target sono stati mutati *in silico* per incorporazione dell'amminoacido desiderato. **Preparazione del ligando e docking in silico automatizzato.** I ligandi (KO, R-warfarin e S-warfarin) sono stati costruiti utilizzando SYBYL-X 2.1.1. Gli esperimenti di *docking* sono stati condotti utilizzando il software Surflex-Dock Geom (SFXC). I legami risultanti sono stati classificati utilizzando il *consensus score* di energia (CScore; SYBYL-X 2.1.1) e la costante di dissociazione (K_d) per ciascun ligando è stata stimata secondo Pham e colleghi (Pham TA et al. *J Med Chem* 2006, 49(20):5856-68). I ligandi sono stati poi analizzati per le loro interazioni con il motivo catalitico CxxC della proteina VKORC1 umana. **Paziente e genotipizzazione.** Un uomo di 28 anni della Tanzania ha presentato un esordio improvviso di fiato corto e dolore toracico pleurico. In precedenza quest'uomo era in buona salute e non aveva alcuna storia familiare di malattia tromboembolica. L'uomo non era un fumatore e non presentava fattori di rischio per il tromboembolismo venoso. L'angiografia tomografica computerizzata polmonare ha mostrato una vasta embolia polmonare bilaterale. Il paziente ha quindi iniziato la terapia con enoxaparina, 80 mg due volte al giorno, e warfarin. La dose di warfarin è stata aumentata gradualmente fino a 21 mg al giorno, ma dopo 4 settimane il rapporto internazionale normalizzato (INR) è risultato subterapeutico con un valore di 1,8. La resistenza al warfarin è relativamente rara. Le cause includono non aderenza alla terapia; interazioni farmacologiche; polimorfismi genetici dei geni VKORC1 e CYP2C9; e il consumo di cibi ricchi di vitamina K. Nel caso attuale, l'AUC di *rac*-warfarin nel corso dell'intervallo di dose di 21 mg è risultata pari a 175 mg h/l e la clearance orale apparente di 0,12 l/h. Questi risultati erano paragonabili alla media di $CL_{p/F}$ (0,16 l/h) ottenuta nei pazienti di un precedente studio che avevano ricevuto lo stesso dosaggio, mentre la media della C_p risultava circa cinque volte maggiore a quella osservata per una dose di warfarin di 5 mg/al giorno. Il paziente era quindi compatibile con il trattamento con warfarin e mostrava una clearance di warfarin "normale". Le analisi di sequenza hanno poi confermato che il paziente era omozigote per il gene CYP2C9*1 (wild-type). L'eccessiva ingestione di vitamina K è stata esclusa da una storia alimentare dettagliata. È stata trovata, invece, una mutazione (G→A) nel gene VKORC1 al nucleotide 196 dell'esone 2, con conseguente sostituzione di valina (Val) con metionina (Met) al residuo 66 (Val66Met). I dati di sequenza hanno dimostrato che il paziente era eterozigote per questa variante allelica. L'analisi di

sequenziamento è stata ripetuta utilizzando tre distinti prodotti di amplificazione e non sono state osservate altre variazioni nella sequenza. Diversi report hanno collegato questa variante polimorfica con la resistenza al warfarin in diverse popolazioni ed in particolare negli individui di origine africana. **Homology modelling di VKORC1.** Non avendo a disposizione la struttura cristallina a raggi X della proteina VKORC1 umana, è stato impiegato il metodo di *homology modelling* utilizzando la struttura tridimensionale dell'omologo *Synechococcus spp.* come modello per indagare la struttura e la funzione di questa proteina. In particolare, la più alta identità di sequenza tra la sequenza umana e l'omologo batterico si trova nel sito attivo (33% d'identità). L'*Homology model* generato in questo lavoro era composto da quattro eliche transmembrana (TM) e da metà elica del *lid domain*. Come notato poi, i residui presenti nel *lid domain* contribuiscono significativamente al legame tra KO e warfarin. È stato quindi studiato il potenziale impatto della sostituzione Val66Met sull'attività enzimatica della proteina VKORC1. La generazione della mutazione V66M *in silico* ha mostrato un riposizionamento della catena laterale di istidina (His) in posizione 68, facendola sporgere più in profondità nel sito attivo di VKORC1 rispetto alla proteina wild-type. Effetti elettrostatici 'knock-on' di His68 alterano marcatamente l'orientamento di arginina (Arg) in posizione 37, spostando la catena laterale del suo gruppo amminico più in profondità nel sito attivo. Di conseguenza, il volume della tasca del sito attivo adiacente al motivo catalitico CxxC della proteina risulta ridotta. Tuttavia non sono stati previsti cambiamenti della struttura secondaria sulla base della sostituzione relativamente conservata di Val con Met. **Docking in silico.** Lo studio del docking *in silico* automatizzato è stato effettuato per determinare l'importanza delle alterazioni nell'architettura del sito attivo sul legame del substrato. Il docking di KO con l'enzima wild-type ha mostrato un orientamento produttivo che favorisce l'allineamento dell'ossigeno dell'eossido con i residui di cisteina del motivo catalitico CxxC della proteina. Anche il docking di R-warfarin e di S-warfarin ha identificato dei siti di legame. Il sito 1, sito "catalitico", è associato al legame con la frazione naftochinonica di KO e mostra selettività per l'S-enantiomero. Il sito 2, posizionato nel dominio occupato dalla coda idrofobica di KO, ha affinità simile per entrambi gli enantiomeri. Nel mutante Val66Met, gli esperimenti di docking hanno mostrato che entrambi gli enantiomeri (ma non KO) non riescono a legarsi al sito 1 a causa dello spostamento di Arg37. In effetti, molte delle mutazioni che conferiscono resistenza al warfarin hanno un impatto sull'orientamento produttivo (inibitorio) di S-warfarin dovuto all'alterazione dell'architettura del legame al sito attivo di VKORC1.

La resistenza al warfarin associata al polimorfismo Val66Met nel gene VKORC1 sembra essere dovuta al dislocamento di Arg37 che blocca l'accesso del warfarin al sito catalitico dell'enzima.

Parole chiave: CYP2C9, citocromo P450 2C9, polimorfismo genetico, vitamina K eossido reductasi subunità 1, VKORC1, resistenza al warfarin

Riferimento bibliografico

[Lewis BC](#) et al. *Pharmacogenet Genomics* 2015 Oct 28 [Epub ahead of print]

LA METANALISI DEL MESE

EFFETTO POSITIVO DEI POLIMORFISMI DI ABCB1 SULLA SOPRAVVIVENZA GENERALE E LA REMISSIONE COMPLETA IN PAZIENTI CON LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA: REVISIONE SISTEMATICA E META-ANALISI

A cura del Dott. Vittorio Simeon

È stata recentemente condotta una revisione sistematica con meta-analisi su sette coorti in studio (1241 pazienti) per valutare l'associazione tra i polimorfismi 1236C>T, 2677G>T/A e 3435C>T del gene ABCB1 e la variabilità di efficacia nel trattamento dei pazienti con leucemia mieloide acuta (LAM) (Megías-Vericat JE et al. *Pharmacogenomics J* 2015, 15(2):109-18). Questo articolo è stato precedentemente valutato e discusso

nel numero [73](#) della newsletter mensile a cura del Gruppo Farmacogenetica della SIF (<http://edicola.sifweb.org/edicola/farmacogenetica/numero/73/articolo/4388>).

Negli ultimi mesi, sono stati pubblicati due lavori su ampie coorti in cui è stato valutato il ruolo dei polimorfismi di ABCB1 in pazienti con LAM (Jakobsen Falk I et al. *Br J Haematol* 2014,167(5):671-80; He H et al. *Eur J Clin Pharmacol* 2015,71(3):293-302). Uno di questi è in realtà un ampliamento di uno studio precedente (Gréen H et al. *Pharmacogenomics J* 2012,12(2):111-8), già incluso nella meta-analisi pubblicata da Megías-Vericat JE e colleghi, e che ha aumentato il numero dei pazienti in studio a 201 con un'analisi di sottogruppo basata sullo stato delle mutazioni di FLT3 e NPM1. L'altro studio ha invece valutato i genotipi e gli aplotipi di ABCB1 in 236 pazienti de novo con LAM appartenenti al gruppo etnico cinese Han. Entrambi gli studi rispecchiano i criteri di inclusione utilizzati durante la meta-analisi e sarebbero stati inclusi nel caso in cui la ricerca sistematica fosse stata condotta oggi. A tal proposito Megías-Vericat JE e colleghi hanno rianalizzato i dati includendo questi due nuovi studi ottenendo risultati simili per quanto riguarda la sopravvivenza generale (OS), ovvero che tutte le varianti alleliche in studio erano associate significativamente ad un incremento della OS nei pazienti. Il cambiamento più significativo osservato nelle analisi era sulla remissione completa (CR). Nelle precedenti analisi pubblicate non era stata raggiunta alcuna associazione significativa tra i genotipi di ABCB1 e CR. Tuttavia in questa nuova analisi, in cui il numero dei pazienti è stato praticamente raddoppiato, le varianti alleliche 1236C>T e 2677G>T/A hanno una percentuale più alta di CR. Questi risultati rafforzano sicuramente l'impatto delle varianti di ABCB1 nella terapia di induzione delle LAM e confermano, grazie all'aumento della numerosità campionaria, il trend osservato precedentemente. Le differenze riscontrate in precedenza tra esito della terapia e sottogruppi etnici sono state ridotte in seguito all'inclusione di questi nuovi studi. Nell'analisi di sottogruppo sono stati osservati andamenti simili con OS migliore nelle popolazioni caucasiche e asiatiche, con valori statisticamente significativi in seguito all'utilizzo del modello dominante (3 anni 3435C>T OR: 1.65, 95% CI: 1.02–2.65, I^2 : 0%, P : 0.04 nella popolazione asiatica; 3–4 anni 2667G>T/A OR: 1.40, 95% CI: 1.04–1.88, I^2 : 32%, P : 0.03 nella popolazione caucasica e OR: 2.40, 95% CI: 1.42–4.07, I^2 : 59%, P : 0.001 nella popolazione asiatica; 4 anni 1236C>T OR: 1.50, 95% CI: 1.11–2.03, I^2 : 0%, P : 0.009 nella popolazione caucasica). Rispetto alla CR, che precedentemente sembrava essere differente tra i gruppi etnici, adesso mostra un miglioramento simile e costante tra i portatori delle varianti alleliche, significativo però solo nel sottogruppo asiatico (2667G>T/A OR: 1.83, 95% CI: 1.09–3.08, I^2 : 0%, P : 0.02).

I risultati di questa meta-analisi confermano quindi che i polimorfismi di ABCB1 hanno un effetto significativo sulla OS di pazienti con LAM trattati con chemioterapia standard, nelle popolazioni caucasiche ed asiatiche. Inoltre, i polimorfismi 1236C>T e 2677G>T/A hanno un impatto anche sulla CR, con miglioramenti più significativi nella sottopopolazione asiatica.

È stato confermato che i pazienti con AML portatori dell'allele T dei polimorfismi di ABCB1 (1236C>T, 3435C>T, o 2677G>T/A) presentano una maggiore sopravvivenza dopo chemioterapia standard. Inoltre i portatori dell'allele T dei polimorfismi 1236C>T e 2677G>T/A hanno una percentuale più alta di remissione completa dalla malattia.

Parole chiave: leucemia mieloide acuta, ABCB1, glicoproteina-p, MDR1, chemioterapia standard

Riferimento bibliografico

[Megías-Vericat JE](#) et al. *Pharmacogenomics J* 2015 Oct 27 [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; 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 Cargin (Università del Piemonte Orientale) Dott.ssa Stefania Cheli (AO Polo Universitario "L. Sacco" di Milano) Dott.ssa Valeria Conti (Università di Salerno) Dott.ssa Alessia Di Silvestre (Università di Trieste) Dott.ssa Lucia Gozzo (Università di Catania) Dott.ssa Marianna Lucafò (Università di Trieste) Dott.ssa Claudia Pisanu (Università di Cagliari) Dott.ssa Gloria Ravegnini (Università di Bologna) Dott.ssa Giulia Sammarini (università di Bologna) Dott. Vittorio Simeon (IRCCS – CROB)

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.
