

**Newsletter Numero 93 – Marzo 2017**

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

**Sommario****⇒ Oncologia**

- Ruolo prognostico dei miRNA circolanti esosomiali nel mieloma multiplo
- Impatto dei polimorfismi dei geni di riparazione del DNA sul rischio di ricaduta dopo radioterapia e sulla sopravvivenza globale in pazienti con carcinoma prostatico

**⇒ Neurologia**

- La farmacogenetica dei farmaci antiepilettici in pazienti pediatriche affette da epilessia assenza infantile
- Farmacogenetica dell'ecstasy: polimorfismi di *CYP1A2*, *CYP2C19* e *CYP2B6* moderano la farmacocinetica dell'MDMA nei soggetti sani
- Farmacogenetica della risposta agli antidepressivi: un approccio poligenico
- Studio di associazione tra la farmacogenetica di *CYP2D6* la farmacocinetica dell'oxicodone in pazienti pediatriche sottoposti ad interventi chirurgici dolorosi

**⇒ Cardiovascolare**

- Interazioni gene-gene tra polimorfismi di *PRKCA*, *NOS3* e *BDKRB2* influenzano gli effetti antipertensivi di enalapril

**⇒ Immunomodulazione**

- L'espressione dei geni della risposta immunitaria di tipo 2 e tipo 17 nella mucosa distingue la rettocolite ulcerosa dal morbo di Crohn nel trattamento di pazienti pediatriche naïve

**ONCOLOGIA****RUOLO PROGNOSTICO DEI miRNA CIRCOLANTI ESOSOMIALI NEL MIELOMA MULTIPLO**

*A cura della Dott.ssa Giulia Sammarini*

Il mieloma multiplo (MM) è una patologia ematologica caratterizzata dalla proliferazione clonale delle cellule del plasma nel midollo osseo. L'eterogeneità clinica e biologica di questa malattia comporta una

notevole variabilità nella risposta alla terapia e negli esiti clinici. I fattori prognostici più utilizzati nel MM sono comunemente il Sistema Internazionale di Stadiazione (ISS) - basato sulla valutazione dei livelli di albumina e beta-2 microglobulina nel sangue periferico al momento della diagnosi - e la determinazione delle anomalie cromosomiche quali traslocazione t(4;14), una delezione di 17bp e un'amplificazione 1q21. Nonostante i progressi apportati da queste classificazioni, pazienti appartenenti a gruppi prognostici simili presentano esiti clinici differenti, ad indicare che i fattori prognostici comunemente utilizzati non sono in grado di differenziare i pazienti in sottogruppi con maggiore affinità. Gli esosomi sono nanovesicole di 50-140 nm che contengono proteine e acidi nucleici, come, ad esempio, i miRNA. Sono attivamente secreti da diversi tipi cellulari e possono essere isolati dal sangue periferico. Promuovono la tumorigenesi di diverse tipologie tumorali ed è stato osservato che esosomi derivati da tumori contengono il loro personale corredo di miRNA e mostrano una capacità cellula-indipendente di processare i precursori dei miRNA fino a giungere alle sequenze mature. Questo fenomeno media un silenziamento rapido ed efficiente degli mRNA delle cellule target, promuovendo l'oncogenesi.

I miRNA circolanti sono generati mediante due meccanismi: per morte cellulare, sia apoptotica che necrotica, portando al rilascio dei miRNA legati alle proteine AGO, sia mediante processo attivo che comporta la secrezione degli esosomi contenenti nucleotidi. Nonostante i miRNA esosomiali rappresentino quindi uno specifico biomarcatore molecolare migliore rispetto ai miRNA liberi, la loro rilevanza per la patogenesi del MM non è ancora stata analizzata. L'obiettivo di questo studio è quindi quello di caratterizzare i miRNA circolanti esosomiali nel MM e determinare il loro impatto sugli esiti clinici dei pazienti.

Sono stati analizzati 156 campioni sierici appartenenti all'Intergruppo Francofono del Mieloma, pazienti di nuova diagnosi trattati in combinazione con bortezomib e desametasone, seguito da un'alta dose di melfalan e trapianto di cellule staminali ematopoietiche. Gli esosomi sono stati isolati dai campioni di siero mediante centrifugazione e impiego di kit specifici; sono poi stati caratterizzati mediante microscopia elettronica usando anticorpi rivolti contro CD63 e CD81. Prima di procedere, la presenza di esosomi è stata confermata con microscopia a trasmissione elettronica e analisi NanoSight. Dall'RNA estratto sono state preparate *library* per il Bioanalizzatore Agilent ed è stato eseguito il sequenziamento di RNA su 10 pazienti affetti da MM e 5 individui sani. Gli esiti clinici di interesse sono stati la sopravvivenza priva di progressione (PFS) e la sopravvivenza globale (OS). Sono state comparate le espressioni dei miRNA fra i pazienti con MM e gli individui sani e, in seguito, sono stati analizzati gli effetti dell'espressione di ciascun miRNA rispetto alla risposta farmacologica, nei campioni sierici dei 156 pazienti con MM. Un miRNA è stato definito clinicamente rilevante quando risultava significativamente correlato sia con PFS che con OS nell'analisi multivariata.

Le analisi eseguite hanno permesso di confermare la presenza degli esosomi mediante microscopia a trasmissione elettronica ed è stato osservato che la maggior parte degli RNA esosomiali sono miRNA (88.0% nei MM e 86.7% nei donatori sani), senza differenze nella distribuzione fra pazienti e controlli. In questo studio sono stati analizzati 22 miRNA, selezionati in base alla loro rilevanza biologica in studi precedenti, ed è emerso che il loro livello di espressione è significativamente più basso nei pazienti con MM rispetto agli individui sani. Nell'analisi univariata, i miRNA let-7b, let-7e, miR-106a, miR-106b, miR-155, miR-17, miR-18a e miR-20a sono risultati associati nei pazienti con MM agli esiti clinici, dopo correzione per Benjamini-Hochberg. Tra questi, let-7b e il miR-18a sono risultati associati a OS e PFS anche nell'analisi multivariata, che comprendeva il Sistema Internazionale di Stadiazione (ISS) e la citogenetica. Più specificatamente, una bassa espressione di let-7b e di miR-18a erano predittivi di scarsa prognosi. Dall'analisi dell'area AUC è emerso che l'inclusione nel modello di let-7b e di miR-18a migliorava la capacità discriminante tra pazienti MM con scarsa e buona prognosi.

In conclusione, i risultati di questo studio evidenziano un'associazione tra i miRNA esosomiali let-7b e miR-18a con la sopravvivenza dei pazienti affetti da MM e suggeriscono la possibilità di utilizzare tali biomarcatori per l'identificazione dei pazienti a rischio maggiore di scarsa prognosi.

**Parole chiave:** mieloma multiplo, miRNA esosomiali, PFS, let-7b, miR-18°

#### Riferimento bibliografico

[Manier S](#) et al. *Blood* 2017 Feb 17 [Epub ahead of print].

## IMPATTO DEI POLIMORFISMI DEI GENI DI RIPARAZIONE DEL DNA SUL RISCHIO DI RICADUTA DOPO RADIOTERAPIA E SULLA SOPRAVVIVENZA GLOBALE IN PAZIENTI CON CARCINOMA PROSTATICO

A cura della Dott.ssa Lucia Gozzo

Nonostante il miglioramento della gestione dei pazienti affetti da carcinoma prostatico con l'introduzione della radioterapia primaria radicale, da sola o con la terapia ormonale (Center MM et al. *Eur Urol* 2012, 61:1079–92), una percentuale di pazienti non trascurabile (15–46%) avrà una ricaduta biochimica (BCR). Esiste una stretta associazione tra la BCR, il rischio di sviluppo di metastasi e l'*overall survival* (OS) (Punnen S et al. *Eur Urol* 2013, 64:905–15; Freedland SJ et al. *JAMA* 2005, 294:433–9). L'identificazione precoce di questi pazienti è fondamentale per poter condurre un *follow-up* più stringente ed una terapia di mantenimento adeguata. Alcuni parametri clinici, come i livelli di PSA, lo *score* di Gleason e lo stadio TNM, sono ad oggi utilizzati per predire l'*outcome* in pazienti trattati con radioterapia (RT) per carcinoma della prostata localizzato. Tuttavia, è necessario individuare *biomarker* più specifici ed accurati (Huang SP et al. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009, 18:3068–74). L'efficacia e la sicurezza della RT potrebbero essere influenzati da polimorfismi localizzati in geni codificanti gli enzimi di riparazione del DNA (Jorgensen TJ. *Cancer Biol Ther* 2009, 8:665–70; Borchiellini D et al. *Cancer Treat Rev* 2012, 38:737–59). Diversi studi sono stati condotti per determinare il ruolo dei polimorfismi dei geni di riparazione del DNA (*DNA repair genes*, DRG) in pazienti sottoposti a RT (Gao R et al. *Cancer Biol Ther* 2010, 10:13–8; Burri RJ et al. *Radiat Res* 2008, 170:49–59; Langsenlehner T et al. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol* 2011, 98:387–93; Cesaretti JA et al. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005, 61:196–202; Popanda O et al. *Mutat Res* 2009, 667:58–69; Rosenstein BS. *Pharmacogenomics* 2011, 12:267–75; Huang SP et al. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2007, 13:6632–8), ma non sono disponibili dati conclusivi in termini di BCR e OS.

In questo studio è stata valutata l'associazione tra 22 polimorfismi di 14 DRG e la BCR (definita, secondo linee guida dell'*European Urology Association*, come un aumento dei livelli di PSA superiore a 2 ng/mL rispetto al livello più basso ottenuto dopo la fine della RT) e la OS di un ampio gruppo di pazienti affetti da carcinoma prostatico.

Tra il 2003 ed il 2008 sono stati arruolati 542 pazienti caucasici affetti da carcinoma della prostata localizzato, sottoposti a RT in prima linea (con o senza terapia ormonale). Il 67% dei pazienti (n=366) presentava una malattia localmente avanzata (T=1 o 2), e nel 55,7% (n=302) lo *score* di Gleason era tra 2 e 6. Per valutare il rischio di BCR, sono stati esclusi 12 pazienti per mancanza di dati relativi ai livelli di PSA dopo la fine della RT. Il *follow-up* mediano di questi 530 pazienti era di 45 mesi. Il 21,3% (n=113) ha avuto una ricaduta in media a 29 mesi. La stima della BCR a 5 e 10 anni era pari al 76,5% e 54,2% rispettivamente. I pazienti portatori di almeno un allele A del polimorfismo *ERCC2-rs1799793* avevano una probabilità dell'83,6% e del 54,2% di non avere una BCR a 5 e 10 anni, rispettivamente, mentre queste percentuali erano pari a 69,1% a 5 anni e 46,5% a 10 anni per i portatori del genotipo GG del polimorfismo *ERCC2-rs1799793* (p=0.0061). Questo polimorfismo ha mostrato un effetto protettivo aumentando la probabilità di *PSA-free survival* (HR=0.57; p=0.0051). La *BCR-free survival* mediana a 5 e 10 anni per i pazienti portatori del genotipo CT+TT del polimorfismo *EXO1-rs4149963* era del 71,6% e 21,1% rispettivamente, mentre per il genotipo CC era del 77,3% e del 59,9% (p=0.0182). Pertanto, i pazienti portatori di almeno una variante T del polimorfismo *EXO1-rs4149963* mostravano un aumento del rischio di BCR dopo RT (HR=1.91; p=0.005). Il *follow-up* mediano di tutti i pazienti era di 67 mesi. Il 21,6% (n=117) è deceduto con un *follow-up* mediano di 71 mesi. L'OS stimata era dell'89,9% a 5 anni e del 59,7% a 10 anni. Dopo aggiustamento per *score* di Gleason e PSA alla diagnosi, solo il polimorfismo *MSH6-rs3136228* è stato associato significativamente con l'OS. In particolare, l'OS a 5 anni era dell'89,5% e del 49,9% a 10 anni per i portatori del genotipo GG, mentre per i portatori di almeno un allele T l'OS a 5 anni era del 90,3% e del 67,3% a 10 anni (p=0.0315). Pertanto, i portatori di almeno un allele T del polimorfismo *MSH6-rs3136228* avevano una OS più lunga rispetto ai portatori del genotipo GG (HR=0,63; p=0,0405).

L'identificazione di *biomarker* prognostici in pazienti con carcinoma prostatico può avere un ruolo clinico importante, ottimizzando il trattamento e la gestione della patologia. Questo studio ha mostrato

un'associazione tra i polimorfismi *ERCC2-rs1799793* ed *EXO1-rs4149963* e la BCR, e tra il polimorfismo *MSH6-rs3136228* e l'OS. L'*ERCC2* appartiene alla via del *nucleotide excision repair* (NER). Sono già riportati in letteratura dati sulla potenziale associazione tra le varianti genetiche dei geni della via NER e la risposta alla RT in diverse patologie tumorali (Wyss AB et al. *Cancer Causes Control CCC*. 2014; 25:437–50). Inoltre, il ruolo protettivo dell'allele A del polimorfismo *ERCC2-rs1799793*, che comporta una ridotta attività della via NER, è stato riportato in alcuni studi. La proteina codificata da *EXO1-rs4149963* è coinvolta nella via *mismatch repair* (MMR), attivata dalla RT. In letteratura sono presenti pochi dati sul ruolo di questo polimorfismo, ed è possibile solo ipotizzare che questo SNP causi un'alterata interazione di EXO1 con altri fattori, con conseguente ridotta efficienza della via MMR ed altre. Anche MSH6 ha un ruolo nella via MMR, ed il polimorfismo *MSH6-rs3136228* è stato associato con l'insorgenza di alcune patologie tumorali e con il rischio di neutropenia nel carcinoma colo-rettale trattato con fluoropirimidine ed oxaliplatino (Campbell PT et al. *Gut*. 2009; 58:661–7. Cecchin E et al. *Pharmacogenomics J*. 2013; 13:403–9). Non sono disponibili evidenze sull'eventuale ruolo prognostico di questo polimorfismo. L'analisi per sottogruppi, ha mostrato un'influenza del tipo di trattamento somministrato (dosi più alte di RT e associazione con terapia ormonale) sul ruolo dei polimorfismi *EXO1-rs4149963* e *MSH6-rs3136228*.

In conclusione, i risultati di questo studio suggeriscono il ruolo di specifiche varianti dei geni di riparazione del DNA nel predire la ricaduta biochimica dopo radioterapia e la sopravvivenza globale dei pazienti affetti da carcinoma prostatico.

**Parole chiave:** carcinoma prostatico, *DNA repair genes*, radioterapia

#### Riferimento bibliografico

Zanusso C et al. *Oncotarget* 2017 Feb 11 [Epub ahead of print].

## NEUROLOGIA

### LA FARMACOGENETICA DEI FARMACI ANTIEPILETTICI IN PAZIENTI PEDIATRICI AFFETTI DA EPILESSIA ASSENZA INFANTILE

A cura della Dott.ssa Sarah Carginin

L' "epilessia assenza infantile", nota anche con il nome di "piccolo male", è la sindrome epilettica più frequente in età pediatrica ed è caratterizzata dall'insorgenza di repentine perdite di coscienza ("assenze") e dalla rilevazione di scariche generalizzate a punte-onda a 3 Hz sull'elettroencefalogramma (EEG). Si tratta di una forma di epilessia ad oggi considerata benigna, in quanto destinata in due terzi dei pazienti a risolversi spontaneamente in età puberale. Tuttavia, l'elevata frequenza quotidiana delle assenze, risultante in una riduzione significativa della qualità della vita del bambino, rende necessario un intervento farmacologico a base di antiepilettici. Un recente studio clinico randomizzato in doppio cieco condotto su pazienti pediatriche affette da piccolo male ha mostrato una forte variabilità individuale in termini di risposta al trattamento con etosuccimide, lamotrigina e acido valproico, i farmaci antiepilettici più comunemente utilizzati per il trattamento delle assenze. Gli Autori hanno ipotizzato come polimorfismi a carico di geni implicati nella patofisiologia delle assenze e nella farmacodinamica degli antiepilettici possano spiegare, almeno in parte, tale variabilità nella risposta farmacologica. Nello specifico, le crisi d'assenza sono note per essere criticamente dipendenti dall'attivazione dei canali del calcio di tipo T ("transienti") localizzati nei neuroni talamo-corticali. I geni *CACNA1G*, *CACNA1H* e *CACNA1I*, codificano per tali proteine canale e farmaci antiepilettici come etosuccimide, lamotrigina e acido valproico, agiscono bloccandone la funzionalità. Essendo, inoltre, lamotrigina e acido valproico substrati del trasportatore intestinale P-glicoproteina, varianti a carico del gene codificante per tale trasportatore (*ABCB1*) sono state ipotizzate poter modulare la risposta farmacologica a tali molecole. Alla luce di tali evidenze, l'obiettivo dello studio è stato quello di valutare la correlazione tra polimorfismi comuni localizzati nei geni *CACNA1G*, *CACNA1H*, *CACNA1I* ed *ABCB1* e

la risposta a breve termine ai farmaci antiepilettici in pazienti di età pediatrica affetti da assenze. Delle varianti missenso identificate come potenziali fattori genetici predittivi della risposta ne è stato, inoltre, investigato il ruolo fisiologico *in vitro*.

Lo studio farmacogenetico è stato condotto su una coorte di pazienti affetti da epilessia assenza infantile (età compresa tra i 2,5 e i 13 anni) arruolati presso 32 centri di reclutamento ed inclusi in uno studio comparativo di efficacia per lamotrigina, etosuccimide ed acido valproico, randomizzato ed in doppio cieco (NCT00088452). Sono stati esclusi dallo studio i pazienti i) a cui siano stati somministrati antiepilettici per più di 7 giorni prima della randomizzazione al trattamento o ii) affetti da disturbi psichiatrici maggiori/autismo. La risposta a breve termine alla terapia antiepilettica è stata definita come i) libero da crisi (*responders*), nel caso in cui non si siano evidenziati segni di crisi di assenza sia tramite EEG che in storia clinica alla 16-20esima settimana; ii) non libero da crisi (*non-responders*), se sono state rilevate crisi di assenza tramite EEG e storia clinica. Il DNA è stato estratto da campioni di sangue intero periferico raccolti dopo l'inizio del trattamento farmacologico. La genotipizzazione è avvenuta tramite sequenziamento dei geni CACNA1G, CACNA1H, CACNA1I ed ABCB1. Sono state incluse nelle analisi di associazione le varianti aventi una frequenza dell'allele minore superiore al 15%. Saggi cellulari ed elettrofisiologici sono stati effettuati al fine di valutare il ruolo fisiologico di una variante missenso emersa come potenzialmente predittiva della risposta ad etosuccimide (CACNA1H rs61734410).

Sono 357 (età media:  $7.61 \pm 2.21$ , 43% di sesso maschile) i pazienti pediatrici arruolati nel presente studio farmacogenetico, di cui 118 in trattamento con etosuccimide, 117 con lamotrigina e 122 con acido valproico. Di questi 357 pazienti totali, 242 sono risultati essere responsivi al trattamento farmacologico con antiepilettici mentre i rimanenti 115 sono risultati essere non-responsivi. Dal sequenziamento dei 4 geni candidati (CACNA1G, CACNA1H, CACNA1I ed ABCB1) sono emerse 472 varianti, di cui 22 aventi una frequenza dell'allele minore superiore al 15% (CACNA1G n=3, CACNA1H n=10, CACNA1I n=5 e ABCB1 n=4). Di queste 22 varianti, 14 erano sinonime (tra cui rs2753326, rs2753325, rs3747178) e 6 missenso, delle quali 3 localizzate nel gene CACNA1H (rs1054645, rs4984636, rs61734410), 2 nel gene CACNA1I (rs136853, rs2294369) e una nel gene ABCB1 (rs2032582). Nel sottogruppo di pazienti in trattamento con etosuccimide (N=118), gli alleli minori delle varianti CACNA1H rs61734410 e CACNA1I rs3747178 sono emersi essere correlati ad un maggior rischio di non rispondere alla terapia (rispettivamente: 73,9% vs 42,5%, OR 2,63, 95% IC 1,25-5,56, P=0,011; 60,9% vs 47,4%, or 2,38, 95% IC 1,11-5,00, P=0,026). Nei pazienti pediatrici in terapia con lamotrigina, la variante ABCB1 rs2032582 è emersa essere più frequente nei *non-responders* rispetto ai *responders* (76,4% vs 46,7%, OR 2,22, 95% IC 1,16-4,17; P=0,015) mentre i polimorfismi CACNA1H rs2753326 e CACNA1H rs2753325 sono risultati essere associati ad una migliore probabilità di risposta al trattamento (rispettivamente: 56,9% vs 66,7%, OR 0,52, 95% IC 0,28-0,96, P=0,038; 56,9% vs 66,7%, OR 0,52, 95% IC 0,28-0,96, P=0,038). Nella coorte di pazienti trattati con acido valproico non sono emerse correlazioni statisticamente significative tra le varianti selezionate e la risposta farmacologica. È stato, infine, testato il ruolo fisiologico dell'unica variante *missense* localizzata sul gene CACNA1H (rs61734410) emersa come correlata alla risposta a etosuccimide. Dai saggi elettrofisiologici non sono emerse differenze biofisiche significative tra i canali al calcio T *wild-type* e quelli mutati per tale variante. Tuttavia, sono state rilevate differenti proprietà biofarmacologiche tra i canali *wild-type* e quelli mutati in quanto l'etosuccimide è risultata aumentare il tasso di inattivazione dei canali *wild-type* ma non di quelli mutati per la variante rs61734410.

Nel complesso, 4 varianti (di cui una missenso e 3 sinonime) localizzate nei geni codificanti per i canali T del calcio e una variante missenso del trasportatore ABCB1 sono risultate essere potenzialmente correlate alla risposta a diverse molecole appartenenti alla classe degli antiepilettici. Nello specifico, la variante missenso CACNA1H rs61734410 è risultata essere associata all'efficacia di etosuccimide. In tale contesto, le evidenze tratte da saggi di elettrofisiologia hanno confermato come la capacità di etosuccimide di aumentare il tasso di inattivazione dei canali T del calcio *wild-type* ma non di quelli mutati per tale variante può rappresentare il possibile meccanismo biologico alla base della scarsa risposta a tale farmaco nei portatori dell'allele minore di CACNA1H rs61734410. *Punti di forza dello studio*: le analisi di associazione genetica ivi descritte sono state effettuate su un campione omogeneo per patologia, trattamento farmacologico e definizione clinica della risposta alla terapia. *Limiti dello studio*: nonostante siano state effettuate analisi di correlazione tra più varianti genetiche e la risposta farmacologica agli antiepilettici, non è stata applicata una correzione per test multipli. Si rendono pertanto necessari studi di replicazione mirati a escludere l'ipotesi

che tali risultati genetici siano falsi positivi e a validare, quindi, il ruolo di tali varianti genetiche come fattori predittivi della risposta ad antiepilettici.

Le varianti CACNA1H rs61734410, CACNA1I rs3747178, ABCB1 rs2032582 e CACNA1H rs2753326 sono risultate essere potenzialmente correlate alla risposta a farmaci antiepilettici in maniera farmacologica-specifica in una coorte di pazienti pediatriche con epilessia assenza infantile.

**Parole chiave:** antiepilettici, epilessia tipo assenza infantile, CACNA1H, CACNA1I, ABCB1

#### Riferimento bibliografico

[Glauser TA](#) et al. *Ann Neurol* 2017 Feb 6 [Epub ahead of print].

## FARMACOGENETICA DELL'ECSTASY: POLIMORFISMI DI CYP1A2, CYP2C19 E CYP2B6 MODERANO LA FARMACOCINETICA DELL'MDMA NEI SOGGETTI SANI

A cura della Dott.ssa Donatella Carretta

La 3,4-metilenediossimetamfetamina (MDMA, ecstasy) produce una sensazione di benessere, aumenta l'empatia emozionale e la socialità, viene usata a scopi ricreativi e può essere affiancata alla psicoterapia. L'uso ricreativo dell'ecstasy è stato associato ad una potenziale grave tossicità, caratterizzata da agitazione, ipertensione e ipertermia. Un'aumentata vulnerabilità agli effetti clinici tossici dell'MDMA può essere dovuta ad alterazioni di enzimi, quali le citocromo P450 monossigenasi (CYPs), che sono coinvolti nel metabolismo dell'MDMA. In particolare, l'MDMA viene O-demetilata primariamente da CYP2D6 a 3,4-diidrossimetamfetamina (HHMA), che è poi O-metilata a 4-idrossi-3-metossimetamfetamina (HMMA), il maggior metabolita inattivo dell'MDMA nell'uomo, dalla catecol-O-metiltransferasi. Inoltre, l'MDMA viene N-demetilata da CYP1A2, CYP2B6, CYP3A4 e CYP2C19 a 3,4-metilenediossiamfetamina (MDA), il minore metabolita attivo. In letteratura, esistono solo pochi dati sulla farmacogenetica/tossicogenetica dell'MDMA. La farmacocinetica (PK) di una sostanza è in parte determinata dalle varianti genetiche degli enzimi coinvolti nel metabolismo della stessa. È stato dimostrato che polimorfismi genetici di CYP2D6 influenzano il metabolismo dell'MDMA nell'uomo, ma il ruolo di altri CYPs è sconosciuto. Studi *in vitro* indicano che CYP2D6 è il maggior responsabile della clearance dell'MDMA, ma anche CYP1A2, CYP2B6 e CYP2C19 contribuiscono alla N-demetilazione dell'MDMA a MDA; il loro ruolo può diventare più importante in caso di *overdose* o negli scarsi metabolizzatori CYP2D6 (*poor metabolizers*, PMs). Tuttavia, gli effetti di tali polimorfismi sul metabolismo dell'MDMA nell'uomo non sono stati ancora studiati. Pertanto, lo scopo del presente studio è investigare se le varianti genetiche di CYP2C19, CYP2B6 e CYP1A2 siano in grado di alterare la conversione dell'MDMA in MDA nell'uomo.

CYP1A2 è inducibile dal fumo di sigaretta nei soggetti con il genotipo SNP rs762551 A/A rispetto ai genotipi C/A e C/C; il presente studio ha testato se la formazione di MDA sia maggiore nei fumatori di sigarette portatori del genotipo AA, per valutare, per la prima volta nell'uomo, il contributo di CYP1A2 nel metabolismo dell'MDMA. Infine, lo studio ha valutato se i genotipi di CYP2C19, CYP2B6 o CYP1A2 influenzino la farmacodinamica dell'MDMA.

Questo studio è un'analisi prospettica di 8 studi in doppio-cieco, *placebo-controlled* in soggetti sani; i dati sono stati analizzati globalmente. L'*endpoint* primario è la valutazione degli effetti dei polimorfismi di CYP sulla PK dell'MDMA. In 7 studi, 112 persone hanno ricevuto MDMA alla dose di 125 mg o placebo; in uno studio pretrattamento più MDMA o pretrattamento da solo. In uno studio, 30 soggetti hanno ricevuto MDMA alla dose di 75 mg, placebo o metilfenidato. I periodi di *washout* tra i trattamenti sono stati di almeno 7 giorni. Sono stati inclusi nell'analisi solo i dati ottenuti dopo somministrazione di MDMA da sola, senza altri trattamenti. Sono stati reclutati 142 soggetti Europei/Caucasici, età 18-45 anni, ed inclusi nello studio 139 (69 maschi, 70 femmine, età media  $\pm$ SD: 24,9 $\pm$ 4,1 anni; *range* 18-44 anni). Un totale di 110 soggetti (54 maschi e 56 femmine) hanno ricevuto 125 mg di MDMA (media  $\pm$ SD: 1,9 $\pm$ 0,3 mg/kg) e 29 soggetti (15 maschi e 14 femmine) hanno ricevuto 75 mg di MDMA (1,1 $\pm$ 0,1 mg/kg).

Criteri di esclusione: storia di malattie psichiatriche, patologie fisiche, uso di stupefacenti per più di 5 volte (con l'eccezione dell'uso, in passato, di cannabis), uso di stupefacenti negli ultimi due mesi o durante lo

studio (determinato dal test sulle urine) e uso di farmaci che interagiscono con la funzione di CYP. Il fumo di tabacco (>10 sigarette/die) era un criterio di esclusione, ma un uso moderato (6-10 sigarette/die) o leggero (1-5 sigarette/die) era consentito. L'MDMA cloridrato è stato somministrato *per os* in dose singola di 125 o 75 mg. Campioni ematici sono stati prelevati 0, 0,33, 0,67, 1, 1,5, 2, 3, 4 e 6 h dopo la somministrazione di MDMA o di placebo per determinare la concentrazione plasmatica di MDMA, MDA e HMMA. Sono stati valutati i seguenti parametri prima ed agli stessi tempi dopo somministrazione di MDMA o di placebo: pressione arteriosa, frequenza cardiaca e temperatura corporea. La *rate pressure product* (RPP), una misura degli effetti cardiostimolanti, è stata calcolata come pressione sistolica x frequenza cardiaca. Gli effetti soggettivi sono stati misurati tramite *Visual Analog Scales* (VAS).

E' stata effettuata la genotipizzazione, tramite *Taq-Man SNP genotyping assays*, dei seguenti SNPs: rs4244285 (CYP2C19\*2, c.681G>A, assay: C\_25986767\_70), rs28399504 (CYP2C19\*4, c.1A>G, assay: C\_30634136\_10) e rs12248560 (CYP2C19\*17, c.806C>T, assay: C\_469857\_10). Le varianti che predicavano CYP2C19PMs includevano CYP2C19\*2/\*2, i metabolizzatori intermedi (IMs) includevano CYP2C19\*1/\*2 e CYP2C19\*2/\*17, i metabolizzatori estensivi (EMs) includevano CYP2C19\*1/\*1 e i metabolizzatori ultra-rapidi (UMs) includevano sia CYP2C19\*17/\*17 che CYP2C19\*1/\*17. Per *CYP1A2*, è stato usato la *CYP1A2 TaqMan drug metabolism genotyping assay* (C\_8881221\_40) per determinare lo SNP rs762551, l'unica variante dell'aplotipo CYP1A2\*1F. Per *CYP2B6*, è stato analizzato lo SNP che determina una ridotta attività, rs3745274 (516G>T, CYP2B6\*6 o CYP2B6\*9, assay: C\_7817765\_60).

La concentrazione plasmatica di picco ( $C_{max}$ ) è stata ottenuta direttamente dai dati; è stata calcolata l'area sotto la curva concentrazione-tempo (AUC) da 0 a 6 h dopo la dose (AUC<sub>6</sub>).

Per quanto riguarda gli effetti del genotipo *CYP2C19*, i livelli plasmatici di MDMA sono aumentati più rapidamente nei due soggetti *CYP2C19*PMs, ma questo effetto non era significativo. Il genotipo di *CYP2C19* influenzava in misura significativa l'AUC<sub>6</sub> di MDA ( $F_{3,135}=3,54$ ,  $P<0,05$ ) e il rapporto dell'AUC<sub>6</sub> MDMA/MDA ( $F_{3,135}=5,55$ ,  $P<0,01$ ), ma non le concentrazioni di HMMA. Il genotipo di *CYP2C19* alterava la  $E_{max}$  di RPP ( $F_{3,134}=2,92$ ,  $P<0,05$ ) con valori di RPP più alti nei *CYP2C19*PMs rispetto agli IMs e agli UMs (entrambi  $P<0,05$ ). Il genotipo di *CYP2C19* non aveva effetti sulla temperatura corporea nè sugli effetti soggettivi dell'MDMA.

Lo SNP *CYP2B6* rs3745274 (G/G vs G/T vs T/T) alterava in misura significativa la  $C_{max}$  dell'MDMA ( $F_{2,136}=3,72$ ,  $P<0,05$ ), con una maggiore concentrazione nei soggetti con il genotipo T/T rispetto al genotipo G/G ( $P<0,05$ ). Il genotipo di *CYP2B6* influenzava significativamente il rapporto AUC<sub>6</sub> MDMA/MDA ( $F_{2,136}=3,67$ ,  $P<0,05$ ) con un rapporto più alto nel gruppo T/T vs G/T o G/G (entrambi  $P<0,05$ ), ma non aveva effetti significativi sui livelli plasmatici di MDA o HMMA, né sugli effetti autonomici e soggettivi dell'MDMA.

Lo stato di fumatore interagiva con il genotipo di *CYP1A2* (inducibile rs762551 A/A vs non-inducibile A/C e C/C) nell'influencare i valori di  $C_{max}$  e AUC<sub>6</sub> ( $F_{5,133}=5,56$ ,  $P<0,001$  e  $4,04$ ,  $P<0,01$ , rispettivamente). Lo stato di fumatore alterava la formazione di MDA solo nei soggetti con il genotipo inducibile rs762551 A/A, con una maggiore formazione di MDA nei fumatori leggeri (6-10 sigarette/die) rispetto ai non fumatori e ai fumatori molto leggeri (1-5 sigarette/die), entrambi con  $P<0,001$ . Non è stato osservato alcun effetto dello stato di fumatore nei soggetti con genotipi rs762551 A/C e C/C.

Come prevedibile, le concentrazioni plasmatiche di picco dell'MDMA erano maggiori dopo la dose di 125 mg rispetto a 75 mg ( $P<0,001$ ). La dose di 125 mg produceva maggiori effetti soggettivi di picco e risposte di stimolazione cardiovascolare di picco (per entrambi,  $P<0,001$ ).

Il presente studio descrive la farmacogenetica di *CYP1A2*, *CYP2C19* e *CYP2B6* negli effetti dell'MDMA in soggetti umani sani. Lo studio ha rivelato un ruolo di *CYP2C19* e *CYP2B6* nella conversione dell'MDMA in MDA (il rapporto MDMA/MDA AUC<sub>6</sub> era maggiore nei soggetti con una bassa funzionalità di *CYP2C19* o *CYP2B6*), confermando precedenti studi *in vitro*. Inoltre, soggetti con bassa funzionalità di *CYP2C19* mostravano una risposta cardiovascolare all'MDMA più rapida e più marcata, anche se solo due soggetti con *CYP2C19*PMs sono stati inclusi nello studio. A differenza del genotipo di *CYP2C19*, il genotipo di *CYP2B6* alterava le concentrazioni di MDMA più avanti nel tempo, 3-4 ore dopo la somministrazione della sostanza. Questi dati suggeriscono che *CYP2B6* diventi più importante quando la funzione di *CYP2D6* diminuisce col tempo a causa dell'auto-inibizione da parte dell'MDMA.

In maniera simile a *CYP2C19* o *CYP2B6*, *CYP1A2* contribuisce alla N-demetilazione dell'MDMA a MDA *in vitro* e può essere indotto dal fumo di sigaretta. Nel presente studio si sono osservati livelli più alti di

MDA nei fumatori con genotipo inducibile vs quello non-inducibile e vs i non fumatori. Questi dati indicano che CYP1A2 contribuisce alla N-demetilazione dell'MDMA a MDA nell'uomo. Tuttavia, la genetica di CYP1A2 non altera la risposta all'MDMA.

In conclusione, i polimorfismi di CYP2C19, CYP2B6 e CYP1A2 influenzano il metabolismo dell'MDMA, ma nessuno di questi polimorfismi altera la risposta soggettiva all'MDMA.

Questo studio ha diverse limitazioni. Sebbene sia uno studio relativamente ampio, include solo due soggetti con il genotipo CYP2C19PMs. Inoltre, vi sono solo 4 fumatori leggeri con il genotipo CYP1A2 inducibile, pertanto l'interazione di CYP1A2 e fumo nel metabolismo dell'MDMA necessita di essere confermata in studi più ampi. Nello studio sono stati reclutati solo fumatori moderati; è probabile che i forti fumatori determinino una maggiore induzione di CYP1A2.

In conclusione, il presente studio indica che CYP1A2, CYP2C19 e CYP2B6 contribuiscono alla conversione di MDMA a MDA nell'uomo. Gli scarsi metabolizzatori di CYP2C19 mostrano risposte cardiovascolari all'MDMA più marcate rispetto agli altri genotipi di CYP2C19. Inoltre, la concentrazione massima di MDA è maggiore nei fumatori portatori del genotipo CYP1A2 rs762551 A/A inducibile rispetto al non-inducibile allele C.

**Parole chiave:** 3,4-metilenediossimetamfetamina, 3,4-metilenediossiamfetamina, farmacocinetica, CYP1A2, CYP2C19, CYP2B6

#### Riferimento bibliografico

[Vizeli P et al. Eur. Neuropsychopharmacol. 2017, 27: 232-38.](#)

## FARMACOGENETICA DELLA RISPOSTA AGLI ANTIDEPRESSIVI: UN APPROCCIO POLIGENICO

A cura della Dott.ssa Claudia Pisanu

Il disturbo depressivo maggiore (DDM) ha una prevalenza nella popolazione generale stimata intorno al 10-15% e rappresenta una delle cause principali di anni vissuti con disabilità. Gli antidepressivi rappresentano il trattamento di prima linea nel DDM. Tuttavia, la risposta presenta una notevole variabilità interindividuale: un terzo dei pazienti mostra una remissione completa dopo il primo trattamento con antidepressivi, un terzo richiede la sostituzione del farmaco utilizzato con un altro antidepressivo o una strategia di *augmentation*, mentre il restante terzo non mostra risposta dopo un trattamento con due diversi farmaci antidepressivi. La possibilità di avere a disposizione strumenti che aiutino nella scelta del farmaco più efficace per il singolo paziente, o che aiutino a predire la resistenza al trattamento, sarebbe di grande utilità per l'implemento di una prescrizione personalizzata. Tuttavia, al momento non sono disponibili marker biologici di risposta affidabili. Gli studi di *genome-wide association* (GWA) hanno permesso di identificare alcuni polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) associati con la risposta agli antidepressivi. Tuttavia, la maggior parte di questi marker non è stata replicata da studi successivi. Il *polygenic risk score* (PRS) cattura in un'unica variabile l'effetto additivo di multipli SNP. I PRS vengono costruiti sommando l'effetto di multipli SNP, ciascuno dei quali mostra un'associazione debole con la variabile oggetto di studio, secondo l'assunzione che i marker genetici che non arrivano a mostrare una significatività a livello *genome-wide* possono raggiungere un buon potere predittivo qualora vengano considerati complessivamente.

Gli autori dello studio hanno valutato l'associazione tra risposta agli antidepressivi e due tipi di PRS: 1) PRS che includevano varianti associate con la risposta agli antidepressivi, e 2) PRS che includevano varianti associate con una maggiore suscettibilità allo sviluppo di DDM e schizofrenia. I primi sono stati costruiti utilizzando come studi di *discovery* i due *trial* clinici STAR\*D e GENDEP (SNP associati alla risposta agli antidepressivi), mentre i secondi utilizzando le meta-analisi degli studi dello Psychiatric Genomics Consortium (PGC) PGC-SCZ e PGC-MDD (SNP che conferiscono una maggiore suscettibilità allo sviluppo di DDM e schizofrenia).

Il campione ha incluso i partecipanti di sette studi sulla farmacogenetica della risposta agli antidepressivi che avevano in comune i seguenti criteri di inclusione: 1) diagnosi di DDM in accordo con i criteri del DSM-IV/ICD-10, 2) assenza di altre patologie psichiatriche (disturbi dello spettro della schizofrenia, disturbo bipolare, dipendenza da sostanze d'abuso). Per ogni partecipante era disponibile una valutazione al *baseline* e almeno una valutazione della risposta agli antidepressivi al *follow-up*. Gli studi STAR\*D e GENDEP sono stati utilizzati come studi di *discovery* per la costruzione dei PRS e per testare l'ipotesi che i PRS fossero associati con la risposta agli antidepressivi. Ulteriori quattro trial del consorzio NEWMEDS (GENPOD, GODS, GSK, Pfizer) e uno studio di *genotyping* dell'Università di Muenster sono stati utilizzati per testare l'ipotesi che i PRS che includevano variabili che conferiscono una maggiore suscettibilità allo sviluppo di DDM e schizofrenia fossero associati con la risposta agli antidepressivi.

La risposta agli antidepressivi è stata valutata sia come tratto continuo (calcolato come la variazione percentuale dello *score* che valutava la severità della sintomatologia) sia come tratto dicotomico (remissione). La severità della sintomatologia è stata valutata utilizzando il *Beck Depression Inventory* (BDI) nello studio GENPOD, la *Montgomery-Asberg Depression Rating Scale* (MADRS) nello studio GODS e la *Hamilton Rating Scale for Depression* (HAM-D-17) in tutti gli altri studi. La remissione è stata definita come uno *score* inferiore al *cut-off* che corrisponde all'assenza di depressione per ciascuna scala.

I PRS sono stati costruiti utilizzando il software PRSice (v. 1.25), effettuando la somma degli alleli associati, pesati per i loro *effect size*, per gli SNP con p-value al di sotto di soglie pre-definite  $P_T$ . L'associazione tra i PRS e la risposta, definita come tratto quantitativo o dicotomico, è stata valutata mediante la costruzione di un modello di regressione lineare o logistica, rispettivamente. Il modello è stato corretto utilizzando le stesse covariate dei singoli studi di GWA e confrontato con un modello che includeva le sole covariate. La percentuale di varianza fenotipica spiegata dal PRS è stata valutata tramite l' $R^2$  (per il modello di regressione lineare) o l' $R^2$  di Nagelkerke (per il modello di regressione logistica). Inoltre, è stata effettuata una sottoanalisi relativa agli studi nei quali i partecipanti sono stati trattati con escitalopram o citalopram: STAR\*D, GSK, GENDEP (417 partecipanti), GENPOD (242 partecipanti) e Muenster (121 partecipanti). La correzione per test multipli è stata effettuata secondo Bonferroni, considerando significativo un p-value < 0.0025.

I PRS costruiti includendo gli SNP associati alla risposta con antidepressivi sono risultati associati con la remissione soltanto in modo nominale (il p-value più basso ottenuto è stato di 0.023 e non ha pertanto raggiunto la soglia di significatività impostata dagli autori dello studio).

I PRS costruiti includendo SNP associati ad una maggiore suscettibilità allo sviluppo di DDM o schizofrenia non sono risultati associati al miglioramento dei sintomi depressivi.

Lo studio è quello che ad oggi ha valutato l'associazione tra un PRS e la risposta agli antidepressivi nel DDM includendo il maggior numero di partecipanti. Nonostante questo, il potere di identificare un'associazione significativa includendo nel PRS SNP associati alla risposta agli antidepressivi è risultato basso, per via delle dimensioni del campione relativamente modeste negli studi di farmacogenetica inclusi. Gli autori dello studio hanno calcolato che per ottenere un potere di predire la risposta agli antidepressivi tramite un PRS pari all'80% sarebbe stato necessario un campione 10 volte superiore. Per realizzare studi di questa portata potrebbero rivelarsi preziosi i registri nazionali, nonostante questo richiederebbe ingenti risorse per la selezione dei partecipanti, la fenotipizzazione, il collezionamento del DNA, la genotipizzazione e l'analisi. Altri limiti dello studio comprendono le differenze tra gli studi di farmacogenetica inclusi per quanto riguarda l'etnia dei partecipanti, la severità al *baseline*, il trattamento, la valutazione dell'*outcome* e la lunghezza del *follow-up*.

In conclusione, lo studio non ha identificato un'associazione significativa tra *polygenic risk score* e risposta agli antidepressivi nel disturbo depressivo maggiore.

**Parole chiave:** antidepressivi, disturbo depressivo maggiore, *polygenic risk score*

#### Riferimento bibliografico

[García-González J](#) et al *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2017, 75: 128–34

## STUDIO DI ASSOCIAZIONE TRA LA FARMACOGENETICA DI CYP2D6 LA FARMACOCINETICA DELL'OXICODONE IN PAZIENTI PEDIATRICI SOTTOPOSTI AD INTERVENTI CHIRURGICI DOLOROSI

A cura della Dott.ssa Gloria Ravegnini

Il trattamento del dolore in pazienti pediatriche che hanno subito interventi chirurgici è molto complicato a causa del rischio di eventi avversi o di un'adeguata analgesia.

Gli oppioidi sono tra gli analgesici più efficaci e considerati fondamentali nel *management* del dolore clinico. Nonostante la loro efficacia, tuttavia essi presentano alcuni effetti avversi nei bambini come ad esempio la depressione respiratoria, e questi sono imputabili alle differenze inter-individuali del metabolismo. La codeina è un profarmaco della famiglia degli oppioidi che è trasformato nel suo metabolita attiva dal CYP2D6; nei soggetti definiti "metabolizzatori lenti" (PM) la codeina viene convertita in morfina a livelli minimi, mentre nei "metabolizzatori ultra rapidi" (UM) vengono generate alte concentrazioni di morfina. Di conseguenza, a parità di dosaggio, gli effetti farmacologici possono variare da inefficaci a tossici. L'oxicodone è un oppioidi comunemente usato nei casi di dolore acuto o cronico. Viene metabolizzato dal CYP2D6 (che forma il metabolita oximorfone) e 3A4 (quest'ultima isoforma determina un metabolita senza effetto nocicettivo). Lo scopo di questo studio, che fa parte di un trial più ampio di fase IV, è stato quello di valutare gli effetti delle variazioni genetiche di CYP2D6 sulla farmacocinetica dell'oxicodone, in bambini che avevano subito operazioni chirurgiche dolorose. Nello studio sono stati arruolati un totale di 30 bambini tra i 2 e 18 anni, sottoposti a procedure ortopediche, toraciche, urologiche o coloretali dolorose.

I pazienti sono stati trattati con soluzioni orali di oxicodeone e prelievi di sangue seriali sono stati raccolti alle 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 ore dopo la somministrazione del farmaco, allo scopo di monitorarne la concentrazione plasmatica. È stata quindi calcolata l'area sotto la curva concentrazione plasmatica/tempo ( $AUC_{0-last}$ ) e le aree parziali alle 6h ( $AUC_{0-6}$ ), 12h ( $AUC_{0-12}$ ), 24h ( $AUC_{0-24}$ ). Per ogni soggetto è stato analizzato il genotipo di CYP2D6; il metabolismo dell'oxicodone dal punto di vista del fenotipo è stato determinato sulla base dei valori dell'attività totale (TAS) del CYP2D6, suddividendo quindi gli individui in PM, metabolizzatori intermedi (IM) e metabolizzatori estensivi (EM).

Tra i 30 soggetti analizzati, uno solo è stato classificato come PM, 13 come IM, 16 come EM.

L'impatto del genotipo di CYP2D6 è stato valutato osservando i marker di esposizione (picco di concentrazione plasmatica,  $C_{max}$ ,  $AUC_{0-6}$ ,  $AUC_{0-24}$ ).

Per quanto riguarda l'oxicodone, non sono state osservate differenze significative tra i soggetti PM/IM e EM; al contrario, i valori dell'oximorfone erano significativamente più alti negli individui EM, sia dal punto di vista del picco plasmatico ( $p=0.028$ ), sia per  $AUC_{0-6}$  ( $p=0.01$ ),  $AUC_{0-24}$  ( $p=0.02$ ). Analogamente, livelli più alti di conversione oxicodeone/oximorfone sono stati osservati negli individui EM rispetto ai PM/IM ( $C_{max}$   $p=0.0007$ ;  $AUC_{0-6}$ ,  $p=0.001$ ;  $AUC_{0-24}$ ,  $p=0.004$ ).

Questo studio pilota offre le prime evidenze che il genotipo di CYP2D6 influisce sul metabolismo dell'oxicodone nei pazienti pediatriche che hanno subito un intervento chirurgico doloroso. In particolare, i pazienti con un'attività maggiore del CYP2D6 mostravano livelli più alti di oximorfone. Di conseguenza, nell'era della medicina di precisione, il medico dovrebbe prestare più attenzione ai pazienti EM, a causa della possibilità di eventi tossici.

Come precedentemente descritto, questa analisi ha coinvolto un totale di 30 pazienti, che tuttavia rappresentano un numero esiguo per il raggiungimento di un adeguato potere statistico. Va inoltre sottolineato che l'età variava tra i 2 e i 18 anni, con solo 5 bambini al di sotto dei 6 anni. Questo aspetto va sicuramente tenuto in considerazione quando si interpretano i risultati qui riportati. Gli autori stessi dichiarano tale disparità e che stanno cercando di arruolare una coorte più estesa di pazienti con un maggior numero di bambini con età inferiore a 6 anni.

Ulteriori studi saranno sicuramente necessari per confermare questi dati preliminari in coorti di analisi indipendenti e più grandi.

Questo studio di farmacogenetica e farmacocinetica ha mostrato che il genotipo di CYP2D6 gioca un ruolo chiave nella farmacocinetica dell'oxicodone e del suo metabolita, oximorfone. In particolare, i bambini EM hanno un'esposizione significativamente più alta al metabolita oximorfone, rispetto ai PM e IM.

**Parole chiave:** trattamento del dolore, oxicodone, CYP2D6

**Riferimento bibliografico**

[Balyan R](#) et al. *Pharmacogenomics* 2017, 18(4):337-48.

## CARDIOVASCOLARE

### INTERAZIONI GENE-GENE TRA POLIMORFISMI DI *PRKCA*, *NOS3* E *BDKRB2* INFLUENZANO GLI EFFETTI ANTIPERTENSIVI DI ENALAPRIL

A cura della Dott.ssa Sarah Allegra

L'ipertensione è una malattia complessa che colpisce circa un miliardo di individui ed è il fattore di rischio prevalente per gli eventi cardiovascolari, tra cui ictus e malattie cardiache coronariche. Gli inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina (ACEi) sono ampiamente utilizzati per trattare l'ipertensione. Il principale meccanismo di azione degli ACEi comporta la riduzione della formazione dell'angiotensina II; un meccanismo secondario è legato alla vasodilatazione prodotta dall'ossido nitrico (NO), come risultato dell'attivazione della ossido nitrico sintasi endoteliale (NOS3). Entrambi i meccanismi sembrano influenzati dal signaling della proteina chinasi C (PKC), coinvolta nei meccanismi vascolari di controllo della pressione sanguigna. Studi sperimentali hanno dimostrato che gli ACEi influenzano l'espressione e l'attività della PKC; pertanto, è possibile che le variazioni nei geni che codificano isoforme della PKC possano influenzare le risposte agli antipertensivi ACEi.

In particolare, il polimorfismo *rs16960228* del gene che codifica la PKC $\alpha$  (*PRKCA*, proteina chinasi C, alfa), una delle principali isoforme di PKC espressa nelle cellule endoteliali, è stato recentemente associato con la risposta ai farmaci antipertensivi. Tuttavia, nessuno studio precedente ha esaminato se i polimorfismi e gli aplotipi di *PRKCA* influenzano le risposte agli anti-ipertensivi ACEi. Inoltre, è possibile che le interazioni tra polimorfismi *PRKCA* e altri geni all'interno del percorso degli ACEi possano influenzare le risposte a questi farmaci. La PKC $\alpha$  aumenta la trascrizione di NOS3 e up-regola l'attività NOS3 fosforilando la Ser1179, che porta alla maggiore produzione di NO e a vasodilatazione. Di conseguenza, il trattamento con ACEi aumenta i livelli di bradichinina, stimolando così i recettori di bradichinina sulle cellule endoteliali, che possono provocare la up-regolazione di NOS3 mediata dalla PKC $\alpha$ . I polimorfismi dei geni che codificano i recettori B2 della bradichinina (*BDKRB2*) e NOS3 sono associati con la risposta all'ACEi enalapril.

Nel presente studio, gli autori hanno indagato se i polimorfismi *PRKCA rs887797*, *rs1010544* e *rs16960228*, o gli aplotipi da essi formati, influenzano la risposta alla terapia antipertensiva in 104 pazienti classificati come poor (PR) e good (GR) responders all'ACEi enalapril. Inoltre, hanno esaminato se le interazioni tra i polimorfismi *PRKCA* e i polimorfismi di *NOS3 rs2070744*, *rs3918226*, *4b/4a VNTR* e *rs1799983* e *BDKRB2 rs1799722* e *BE1 +9/-9* sono associati con la risposta all'enalapril.

I pazienti sono stati trattati per 60 giorni con enalapril in monoterapia, alle dosi di 10 mg / giorno (n = 48) oppure 20 mg / giorno (n = 56), secondo il giudizio del medico e tenendo presente i fattori di rischio e le terapie precedenti. La risposta all'enalapril è stata calcolata come la variazione di MBP (pressione sanguigna media calcolata usando la media di tre diverse misurazioni della pressione sanguigna sistolica (SBP) e diastolica (DBP), con intervalli di 1 min l'uno dall'altro, secondo la formula  $MBP=(SBP+2*DBP)/3$ ;  $\Delta MBP$ ) ottenuto dalla differenza tra prima e dopo il trattamento con enalapril. I pazienti sono stati classificati come PR e GR quando il loro  $\Delta MBP$  era, rispettivamente, al di sotto o al di sopra del valore mediano della distribuzione  $\Delta MBP$ .

I genotipi per i polimorfismi *PRKCA rs887797*, *rs1010544* e *rs16960228* e *NOS3 rs2070744*, *rs3918226* e *rs1799983* sono stati determinati mediante saggio di discriminazione allelica TaqMan (Applied Biosystems)

con apparecchiatura StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems). I genotipi per *NOS3 4b/4a VNTR*, *BDKRB2 rs1799722* e *BE1 +9/-9* sono stati determinati mediante PCR seguita da sequenziamento del DNA.

Una riduzione significativa di SBP e DBP è stata osservata dopo il trattamento con enalapril ( $p < 0.001$ ), in entrambi i gruppi ( $p < 0.001$ ); al basale SBP e DBP erano maggiori nei GR ( $p < 0.05$ ).

I GR hanno mostrato frequenze più elevate dei genotipi TC/CC per il polimorfismo *PRKCA rs1010544* rispetto ai PR ( $p < 0.05$ ). Viceversa, i PR hanno mostrato elevate frequenze dei genotipi GA/AA e dell'allele A del polimorfismo *rs16960228* rispetto ai GR.

Il genotipo TC e l'allele C per il polimorfismo *NOS3 rs2070744* sono più frequenti nel gruppo GR; il genotipo TT del polimorfismo *BDKRB2 rs1799722* era più frequente nel gruppo PR (anche se non statisticamente significativo), probabilmente a causa della differenza nella dimensione del campione.

Stratificando PR e GR in base al dosaggio di enalapril, è stato osservato che l'aplotipo *PRKCA CTA* è più frequente nei PR che nei GR, trattati con enalapril 20 mg/die

Valutato gli effetti di *PRKCA* sulle variazioni della pressione sanguigna, è stato osservato che i genotipi TC/CC per *rs1010544* sono stati associati con una diminuzione più intensa della MBP in risposta ad enalapril. Inoltre, i genotipi GA/AA per il polimorfismo *rs16960228* sono stati associati a diminuzioni inferiori di MBP e DBP dopo il trattamento con enalapril, rispetto al genotipo GG.

Infine, è stato trovato un modello significativo di interazione tra i polimorfismi *PRKCA*, *NOS3* e *BDKRB2*: i genotipi GG (*PRKCA rs16960228*) e TT/TC (*NOS3 rs2070744*) erano più frequenti nei gruppi GR o PR, rispettivamente, combinati con il genotipo CC di *BDKRB2 rs1799722*.

I genotipi GA/AA per il polimorfismo *PRKCA rs16960228* sono stati associati con risposte migliori a idroclorotiazide e peggiori all'atenololo in uno studio GWAS; in questo lavoro i genotipi GA/AA (e l'allele A) sono associati con risposte peggiori all'enalapril. Gli ACEi possono portare ad una up-regolazione del signaling della PKC $\alpha$ , che contribuisce alla vasodilatazione e alla riduzione della pressione sanguigna dovute all'attivazione di NOS3. Pertanto, è possibile che il genotipo GG del polimorfismo *rs16960228* riduca l'espressione della *PRKCA*, portando ad una migliore risposta ai farmaci che aumentano la PKC $\alpha$ , come gli ACEi. Al contrario, sembra ragionevole suggerire che il signaling della PKC $\alpha$  potrebbe essere influenzato meno dagli ACEi nei pazienti con genotipo GA/AA, con risposte peggiori a questi farmaci. Tuttavia, i meccanismi molecolari che sostengono queste ipotesi devono ancora essere dimostrati.

Considerando gli aplotipi *PRKCA*, anche se non è stata osservata un'influenza significativa sulla risposta all'enalapril considerando il numero totale di pazienti, è stato riscontrato che l'aplotipo CTA è associata con risposte peggiori all'enalapril somministrato 20 mg/die. Questo risultato è in linea con studi precedenti che dimostrano che gli effetti dei polimorfismi o degli aplotipi sulle risposte ai farmaci antipertensivi sono più evidenti considerando dosi più elevate di farmaco. Inoltre gli alleli T (*rs1010544*) e A (*rs16960228*) sono coinvolti con le risposte peggiori all'enalapril. Pertanto, gli autori suggeriscono che l'aplotipo CTA può aumentare l'espressione della PKC $\alpha$ , e di conseguenza portare a risposte peggiori all'enalapril. Tuttavia, ulteriori studi sono necessari per affrontare la funzionalità di questo aplotipo.

Infine, è stato osservato che il genotipo GG del polimorfismo *PRKCA rs16960228* è associato con risposte più efficaci all'enalapril. Invece, il genotipo GG è risultato associata con GR (*NOS3 rs2070744*) e PR (*BDKRB2 rs1799722*). Questi risultati evidenziano l'importanza delle interazioni gene-gene in farmacogenomica, ma ulteriori studi sono necessari per studiare gli effetti di interazioni tra i geni *PRKCA*, *NOS3* e *BDKRB2* sui livelli di nitriti circolanti e sull'attività di NOS3 nei pazienti trattati con ACEi.

Il limite principale di questo lavoro è il numero relativamente basso di pazienti inclusi; inoltre non sono stati valutati gli effetti dei polimorfismi *PRKCA* sui parametri di stress ossidativo.

I polimorfismi di *PRKCA* influenzano la risposta al trattamento con enalapril. I genotipi TC/CC *rs1010544* sono associati a migliori risposte al farmaco e i genotipi GA/AA *rs16960228* e l'aplotipo CTA sono associati con risposte peggiori a questo ACEi. Inoltre, sono state osservate interazioni significative tra *PRKCA*, *NOS3* e *BDKRB2* con la risposta all'enalapril.

**Parole chiave:** enalapril, ipertensione, *PRKCA*

**Riferimento bibliografico**

Oliveira-Paula GH et al. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2017, 120(3):284-91

**IMMUNOMODULAZIONE****L'ESPRESSIONE DEI GENI DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA DI TIPO 2 E TIPO 17 NELLA MUCOSA DISTINGUE LA RETTOCOLITE ULCEROSA DAL MORBO DI CROHN NEL TRATTAMENTO DI PAZIENTI PEDIATRICI NAÏVE**

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

Nelle malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD) una delle più grandi sfide, soprattutto nei pazienti pediatrici, è riuscire a fare una corretta diagnosi differenziale tra rettocolite ulcerosa (UC) e morbo di Crohn (CD). I pazienti pediatrici affetti da UC o da IBD non classificabili sono circa il 30-40% dei pazienti pediatrici negli Stati Uniti e in Europa. Il 25% di bambini affetti da CD presenta un'inflammatione del solo colon (CDc) senza il coinvolgimento dell'intestino tenue. Molti di questi pazienti pediatrici esibiscono delle caratteristiche atipiche che ostacolano la corretta interpretazione di una diagnosi specifica tra UC e CD.

La risposta immunitaria di tipo 2 è definita dalla produzione delle citochine IL-4, IL-5 e IL-13. Le UC sono state associate ad una risposta immunitaria di tipo 2 inconsueta, con un aumento delle IL-5 e IL-13 ma non dell'IL-4. Non è ancora noto se l'espressione a livello della mucosa dei geni associati alla risposta immunitaria di tipo 2 sia in grado di distinguere, alla diagnosi, pazienti pediatrici con UC da quelli CDc.

Lo studio è stato condotto su un sottogruppo di pazienti pediatrici naïve (n=138) facente parte del *RISK Study*, uno studio prospettico sponsorizzato dalla *Crohn's & Colitis Foundation of America*. Tutti i partecipanti con UC (n=56) e CDc (n=36) esibivano un'inflammatione macroscopica del retto al momento della visita, in particolare i pazienti pediatrici CDc non presentavano segni di inflammatione dell'ileo e del digiuno.

E' stata valutata l'espressione di 22 geni associati alla risposta immunitaria di tipo 2, tipo 1 e tipo 17 ed i risultati sono stati analizzati rispetto ad un gruppo di controllo di pazienti non affetti da IBD (n=49). E' stato osservato che solo i pazienti con UC esibiscono un significativo aumento dei geni delle citochine di tipo 2 (*IL5* e *IL13*,  $P<0.001$ ) mentre le citochine di tipo 17 (*IL17A* e *IL23A*) sono significativamente maggiori sia nei pazienti con UC ( $P<0.001$ ) che CDc ( $P<0.001$  e  $P<0.05$ , rispettivamente). Analizzando i dati tra pazienti con UC rispetto ai pazienti CDc, i pazienti UC esibiscono una maggiore espressione dei geni di tipo 2 (*IL5*, *IL13*, *IL13RA2*, *ICOS* e *IL1RL1(m)*,  $P<0.05$ ) e di tipo 17 (*IL17A*, *IL23A*,  $P<0.05$ ).

I risultati ottenuti dalla coorte dei pazienti del *RISK Study* sono stati validati in un gruppo indipendente di pazienti pediatrici del *Cincinnati Children's Medical Center*. Le validazioni sono state effettuate su 14 pazienti pediatrici affetti da UC, 20 da CDc e 17 pazienti non affetti da IBD.

I valori di espressione genica sono in linea con quelli precedentemente descritti, infatti nei pazienti affetti da UC si osservano maggiori livelli di *IL5*, *IL13*, *IL13RA2*, *IL17A* e *IL23A* rispetto ai pazienti con CDc e al gruppo di controllo.

Per determinare se i livelli di espressione dei geni della risposta immunitaria di tipo 2 e di tipo 17 sono collegati ad un miglioramento della mucosa in seguito a trattamento, i dati dei pazienti UC nella coorte di studio del *Cincinnati Children's Medical Center* sono stati comparati quelli ottenuti da tre pazienti con UC che hanno mostrato una completa guarigione della mucosa in seguito a trattamento (Mayo endoscopic score=0, sesso=femminile, età=7, 9 e 20, trattamento= 6-mercaptopurina + infliximab, 5-ASA, 5-ASA e corticosteroidi per uso orale). I risultati dimostrano che l'espressione dell'*IL13* e dell'*IL17A* è significativamente inferiore ( $P<0.05$ ) nei pazienti con completa guarigione della mucosa rispetto a quelli con malattia attiva.

E' stata eseguita un'analisi di regressione logistica univariata sulla coorte di pazienti pediatrici affetti da UC del *RISK Study* trattati con differenti terapie (corticosteroidi, 5-ASA, tiopurine, metotrexato e farmaci

biologici anti-TNF) e di cui è nota la risposta dopo 6 e 12 mesi di trattamento. L'analisi è stata condotta sui geni che hanno mostrato una significativa differenza in termini di espressione tra i pazienti con UC e CDc del gruppo *RISK Study*. I risultati dimostrano che l'espressione del gene *IL13* è associata all'aumentata probabilità di una risposta clinica a 6 (odds ratio [OR] 1.182, 95% intervallo di confidenza [CI] 1.028-1.359) o 12 mesi (OR 1.172, 95% CI 1.012-1.359) e una tendenza verso la remissione clinica a 12 mesi (OR 1.126, 95% CI .978-1.297). I pazienti pediatrici con UC, che prima del trattamento presentavano elevati livelli di *IL13*, hanno una maggiore predisposizione alla remissione a 6 e 12 mesi.

In conclusione questo lavoro descrive l'importanza della risposta immunitaria di tipo 2 a livello della mucosa di pazienti pediatrici con UC naïve. E' stato dimostrato che i pazienti con UC possono essere distinti dai pazienti CDc per via dall'aumentata espressione dei geni associati alla risposta immunitaria di tipo 2 e 17. Inoltre, nei pazienti pediatrici con UC, l'elevata espressione dell'*IL13*, è associata ad una aumentata risposta al trattamento e remissione della patologia.

**Parole chiave:** immuno-regolazione, profilo di espressione genica, fattore prognostico, UC, CD

#### Riferimento bibliografico

[Rosen MJ](#) et al. *Gastroenterology* 2017 Jan 23 [Epub ahead of print]



#### Sostieni la Società Italiana di Farmacologia

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

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

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

[sif.informazione@segr.it](mailto:sif.informazione@segr.it); [sif.farmacologia@segr.it](mailto:sif.farmacologia@segr.it).

### SIF – FARMACOGENETICA

#### Newsletter del Gruppo di lavoro sulla Farmacogenetica della Società Italiana di Farmacologia

Registrazione del Tribunale di Milano n° 180 data 31/03/2010 - ISSN 2282-4758

[http://www.sifweb.org/gruppilavoro/sif\\_gruppo\\_farmacogen.php](http://www.sifweb.org/gruppilavoro/sif_gruppo_farmacogen.php)

Direttore	Prof. Emilio Clementi (Università di Milano)
Vice-Direttore	Prof. Diego Fornasari (Università di Milano)
Coordinatore	Dott.ssa Valentina Boscaro (Università di Torino)
Caporedattori	Dott. Gabriele Stocco (Università di Trieste) Dott. Salvatore Terrazzino (Università del Piemonte Orientale)
Web Editor	Dott. Federico Casale (Università di Torino)
Hanno contribuito a questo numero:	Dott.ssa Sarah Allegra (Università di Torino) Dott.ssa Sarah Cagnin (Università del Piemonte Orientale) Dott.ssa Donatella Carretta (Università di Bologna) 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 Ravagnini (Università di Bologna)  
Dott.ssa Giulia Sammarini (Università di Bologna)

---

**Archivio SIF-Farmacogenetica Edicola Virtuale SIF**  
<http://edicola.sifweb.org/edicola/farmacogenetica/pagina/archivio>  
Contatti: [webmaster@sifweb.org](mailto:webmaster@sifweb.org)

---

### **DISCLAIMER – Leggere attentamente**

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

---

### **RICEZIONE NEWSLETTER**

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

---

---