

**Newsletter Numero 94 – Aprile 2017**

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

Sommario⇒ Oncologia

- Associazione del genotipo hOCT1/ABCB1 con l'efficacia e la tollerabilità di imatinib in pazienti affetti da leucemia mieloide cronica
- Insufficienza cardiaca congestizia indotta da antracicline: uno studio di associazione *genome-wide*
- Biomarker genetici di efficacia del sunitinib in pazienti affetti da carcinoma a cellule renali avanzato: risultati del trial RENAL EFFECT
- Alterazione dei livelli sierici di miR34a durante la chemioterapia neoadiuvante predicono la risposta terapeutica e la prognosi nel cancro al seno in stadio II/III
- miR-200b e miR-155 utilizzabili come biomarker predittivi per l'efficacia della chemio-radioterapia nel carcinoma a cellule squamose di testa e collo localmente avanzato
- Uno studio *genome-wide* correla una variante di *PNPLA3* con l'aumento delle transaminasi epatiche in seguito alla terapia per la leucemia linfoblastica acuta
- La variante IDH1 R132H stimola la migrazione cellulare attraverso l'attivazione del *pathway* AKT-mTOR, ma sensibilizza le cellule al trattamento con 5-FU attraverso la riduzione dei livelli di NADPH e GSH

⇒ Neurologia

- Polimorfismi di enzimi antiossidanti non influenzano il rischio di epilessia o la farmacoresistenza dopo lesioni ipossico-ischemiche cerebrali neonatali
- Neuroplasticità e *pathway* dei secondi messaggeri nell'efficacia degli antidepressivi: risultati farmacogenetici di un trial prospettico che ha investigato la resistenza al trattamento

ONCOLOGIA**ASSOCIAZIONE DEL GENOTIPO hOCT1/ABCB1 CON L'EFFICACIA E LA TOLLERABILITÀ DI IMATINIB IN PAZIENTI AFFETTI DA LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA**

A cura della Dott.ssa Sarah Allegra

La prognosi di pazienti affetti da leucemia mieloide cronica (CML) è notevolmente migliorata negli ultimi dieci anni dopo la disponibilità di inibitori della tirosina chinasi (TKIs), raggiungendo l'82% di risposta citogenetica completa (CCyR) e più del 90% dei pazienti liberi da progressione e vivi dopo 8 anni. Il primo TKI introdotto nella pratica clinica è l'imatinib, che offre circa il 60% della risposta molecolare precoce (EMR) (BCR-ABL1 / ABL1 <10% IS) dopo 3 mesi di trattamento e il 30% di risposta molecolare maggiore (MMR) (MR3: BCR-ABL1 / ABL1 = 0,1% IS) dopo 12 mesi.

Nonostante il notevole progresso raggiunto, circa il 30% dei pazienti interrompe il trattamento a causa della scarsa tollerabilità o di fallimento terapeutico. Sebbene tossicità ematologiche e altre reazioni avverse associate ad imatinib siano gestibili, questi eventi possono avere un impatto negativo sulla qualità della vita e sulla aderenza al trattamento con conseguente perdita di risposta.

Diversi autori hanno suggerito che il trasportatore di cationi organici umano 1 (hOCT1, gene *SLC22A1*) e i trasportatori ABC (geni *ABCB1* e *ABCG2*), potrebbero influenzare le concentrazioni plasmatiche e intracellulari di imatinib. Infatti, hOCT1 è espresso sulle cellule leucemiche, nonché in fegato, rene e colon. Inoltre, è stato dimostrato che il polimorfismo *hOCT1* c.480C>G influenza la farmacocinetica di imatinib: individui con almeno un allele polimorfico presentano una maggiore esposizione al farmaco, con alti tassi di eventi avversi e conseguente riduzione della sopravvivenza libera da eventi (EFS). Allo stesso modo, un altro studio ha osservato una significativa associazione tra i tassi di MR3 e il polimorfismo *hOCT1*. Inoltre, i pazienti con il genotipo polimorfico *hOCT1* c.1222A>G (rs628031) hanno una maggiore probabilità di scarsa risposta, EFS brevi e sopravvivenza globale (OS). In aggiunta, l'espressione dell'mRNA di hOCT1 è risultata significativamente superiore nel gruppo CCyR che nei pazienti resistenti. Recentemente, Watkins et al. hanno pubblicato una meta-analisi sul possibile ruolo delle varianti genetiche *hOCT1* nella risposta ad imatinib: solo 9 dei 16 studi considerati hanno dimostrato una rilevanza clinica, soprattutto nel risultato a lungo termine. Per quanto riguarda la P-glicoproteina (P-gp), polimorfismi del gene *ABCB1* sono stati associati ad una prognosi negativa: coloro che non hanno ottenuto MMR hanno mostrato un maggiore efflusso mediato dal P-gp. È stato anche correlato il polimorfismo *ABCB1* c.3435C>T con un rischio più elevato di resistenza all'imatinib. Al contrario, Kim et al. non ha trovato alcun impatto prognostico di questo polimorfismo.

Nel presente lavoro, è stato sviluppato e utilizzato un modello che include le combinazioni dei dati di farmacogenetica e le caratteristiche dei pazienti, per studiare il ruolo di covariate tempo-indipendenti su efficacia e tossicità di imatinib.

Lo studio è stato condotto su 54 pazienti adulti caucasici CML (31 maschi e 23 femmine), che non avevano ricevuto alcun trattamento, in ambito della CML, prima di imatinib. Cinquanta pazienti hanno ricevuto imatinib alla dose di 400 mg/giorno, ma in 6 di essi è stata necessaria una riduzione a 300 mg/giorno a causa della elevata ricorrenza di tossicità. Tre pazienti hanno ricevuto imatinib in 600 mg/die e 1 a 800 mg/die (400 mg/12 h).

Le variabili genetiche considerate sono state: c.1260_1262delGAT (rs72552763), c.181C>T (rs12208357), e c.480C>G (rs683369) per il gene *SLC22A1* (*hOCT1*); c.1236C>T (rs1128503), c.2677G>T/A (rs2032582) e c.3435C>T (rs1045642) per il gene *ABCB1*; c.334G>T (rs4149117) per il gene *SLCO1B3*.

Al fine di indagare la possibile associazione tra covariate categoriche e efficacia e tossicità di imatinib, sono state applicate strategie specifiche di analisi multi-step.

Secondo le linee guida 2013 dell'ELN, i responders ottimali sono stati identificati come i pazienti che raggiungono CCyR a 6 mesi o maggiore MR a 12 mesi, mentre i poor responders sono stati identificati come coloro che hanno mostrato più del 35% di metafasi Philadelphia o BCR ABL1/ABL1>10% a 6 mesi o che non erano in CCyR a 12 mesi. È stato scelto il tempo necessario per raggiungere il CCyR (TTC) come parametro per l'efficacia.

Per ogni paziente, la tossicità è stata valutata seguendo i *National Cancer Institute Common Terminology Criteria* (NCI-CTC) for *Adverse Events grading system* (version 4-2009) e i pazienti sono stati distinti in due gruppi in base al grado massimo di tossicità osservata: un gruppo di grado 1 o nessuna tossicità ed un gruppo per il grado 2 o superiore, a prescindere dall'effetto tossico.

Tramite test ANOVA per modelli ridotti, cinque combinazioni sono state identificate come potenzialmente significative e quindi sono state eseguite un totale di sei prove ANOVA. Un risultato significativo è stato

ottenuto dalla combinazione di *hOCT1* c.480C>G e *ABCB1* c.3435C>T ($p=0,006$). Per scoprire come le due covariate potevano essere combinate, sono stati calcolati i valori medi TTC per ciascuna delle quattro possibili combinazioni di genotipi wild-type e polimorfici *hOCT1* c.480C>G e *ABCB1* c.3435C>T. I genotipi identici per entrambi i loci (wild-type/wild-type o polimorfico/polimorfo) presentano un TTC molto più lungo di quelli di tipo misto (wild-type/polimorfico o polimorfico/wild-type). In considerazione di ciò, i dati dei pazienti sono stati divisi in due gruppi: il primo gruppo comprendeva soggetti con genotipi wild-type o polimorfici sia per *hOCT1* c.480C>G che per *ABCB1* c.3435C>T. Il secondo gruppo comprendeva pazienti con genotipo misto *hOCT1* (wild-type/polimorfico o polimorfico/wild-type). La differenza tra i valori TTC ottenuti per i due gruppi è statisticamente significativa con un valore $p=0,013$.

Un numero totale di 37 pazienti sono stati inclusi nelle indagini sulla tossicità. Sono stati generati i gruppi (*hOCT1* c.480C>G/*ABCB1* c.3435C>T): wild-type/wild-type 13,6%, wild-type/polimorfico 35,1%, polimorfico/wild-type 18,9%, e polimorfico/polimorfico 32,4%. Questi genotipi sono risultati significativamente associati con il massimo grado di tossicità, valore $p=0,022$. In particolare, i pazienti con genotipo misto *hOCT1* c.480C>G e *ABCB1* c.3435C>T hanno mostrato livelli elevati di tossicità. Per quanto riguarda la presenza di edema si è constatato che il momento della comparsa di edemi (TED) era significativamente correlato all'interazione tra genere e *ABCB1* c.3435C>T ($p=0,013$). I pazienti sono stati divisi in un primo gruppo (maschi e femmine c.3435CC c.3435CT/TT) e in un secondo gruppo (maschi c.3435CT/TT e femmine c.3435CC). I valori medi di TED ottenuti per i due gruppi erano 16,37 e 2,55 mesi, rispettivamente ($p=0,018$). La stessa analisi è stata applicata alla manifestazione di crampi (TCMP): è emersa una dipendenza di TCMP sul genere ($p=0,0047$). In particolare, le femmine presentano TCMP molto prima rispetto agli uomini, in media 5,3 e 22,6 mesi, rispettivamente.

I risultati mostrano che le combinazioni *hOCT1* c.480CG/GG-*ABCB1* c.3435CC e *hOCT1* c.480CC-*ABCB1* c.3435CT/TT caratterizzano i pazienti che hanno raggiunto un precoce CCyR, mentre le combinazioni *hOCT1* c.480CC-*ABCB1* c.3435CC e *hOCT1* c.480CG/GG-*ABCB1* c.3435CT/TT sono significativamente più frequenti nei pazienti che raggiungono un CCyR tardivo o che non rispondono alla terapia.

Questi risultati possono essere spiegati in termini di una maggiore penetrazione del farmaco all'interno delle cellule Philadelphia-positive e la sua lenta escrezione. Questi risultati sembrano fornire una forte indicazione per l'uso di combinazioni genotipiche come predittori efficienti per la risposta al trattamento con imatinib.

I risultati relativi all'efficacia possono essere considerati complementari a quanto presentato da Angelini et al.: *hOCT1* c.480C>G gioca un ruolo significativo nel raggiungimento di MR3 in pazienti trattati con imatinib. Inoltre, una recente meta-analisi sulla risposta clinica all'imatinib ha riportato che *ABCG2* era significativamente associato con un più alto tasso di MR3, senza alcun effetto clinico dei polimorfismi *ABCB1* C3435T e C1236T e con un debole impatto di G2677T/A.

La stessa combinazione di *hOCT1* c.480C>G e *ABCB1* c.3435C> T, in grado di predire l'efficacia del trattamento, è risultata essere associata ad un evento raddoppiato di grado ≥ 2 tossicità. Questo risultato conferma l'ipotesi che queste combinazioni genotipiche possono essere associate ad un aumento di uptake / ridotta escrezione di imatinib dalle cellule. Inoltre, è stato osservato che i tempi di manifestazione di crampi ed edemi sono correlati al sesso e al genere in combinazione con *ABCB1* c.3435C>T.

Il presente studio getta una prima luce sul possibile ruolo dell'interazione tra i polimorfismi *hOCT1* c.480C>G e *ABCB1* c.3435C>T come predittori sia dell'efficacia che della tossicità del trattamento con imatinib.

Parole chiave: imatinib, *hOCT1*, *ABCB1*

Riferimento bibliografico

[Galeotti L](#) et al. *Cancer Chemother Pharmacol* 2017, 79(4): 767-73.

INSUFFICIENZA CARDIACA CONGESTIZIA INDOTTA DA ANTRACICLINE: UNO STUDIO DI ASSOCIAZIONE GENOME-WIDE

A cura della Dott.ssa Sarah Cargnin

Le antracicline sono farmaci chemioterapici antitumorali largamente utilizzati nel trattamento di tumori solidi e di neoplasie maligne del tessuto emopoietico. A dispetto di una comprovata efficacia clinica, l'insorgenza di cardiotoxicità rappresenta ad oggi un effetto avverso dose-limitante per l'utilizzo delle antracicline. Tale tossicità può manifestarsi acutamente, sotto forma di aritmie o depressione della frazione di eiezione ventricolare sinistra, oppure cronicamente (1,7-2,1% dei casi), con la comparsa di insufficienza cardiaca congestizia (ICC) entro 1-2 anni dalla somministrazione dell'ultima dose di antracicline. Il meccanismo biologico sotteso al manifestarsi di cardiotoxicità si attribuisce alla capacità delle antracicline di produrre radicali liberi, dannosi per le membrane cardiache. Tra i fattori di rischio noti per lo sviluppo di cardiomiopatie antracicline-indotte si annoverano la dose cumulativa di antracicline, storia clinica di disordini cardiaci, ipertensione, danni epatici e radioterapia mediastinica. Numerosi studi in letteratura hanno investigato il ruolo di varianti genetiche germinali come potenziali fattori predittivi del rischio di danno cardiaco antracicline-indotto. Tuttavia, probabilmente a causa dell'eterogeneità delle popolazioni di pazienti arruolati per gli studi precedenti, i risultati farmacogenetici ad oggi disponibili risultano essere controversi. Alla luce della gravità dell'ICC come cardiotoxicità irriversibile antracicline-indotta e della necessità di identificare i pazienti ad alto rischio di manifestare tale effetto avverso, è stato condotto uno studio di associazione *genome-wide* (GWAS) finalizzato all'identificazione di varianti genetiche predittive dell'insorgenza di ICC in un'ampia ed omogenea coorte di pazienti neoplastici in trattamento con antracicline. Le varianti ivi emerse come correlate all'*outcome* in studio sono state successivamente validate in due coorti indipendenti di replicazione.

Lo studio GWAS è stato condotto su un sottogruppo di pazienti affetti da tumore alla mammella arruolati per il *trial* clinico E5103 (N=4994). Nello specifico, i soggetti eleggibili per lo studio E5103 sono stati randomizzati a i) braccio A: regime a base di doxorubicina e ciclofosfamide seguito da terapia con paclitaxel; ii) braccio B: regime a base di doxorubicina e ciclofosfamide in combinazione con bevacizumab; iii) braccio C: regime a base di doxorubicina e ciclofosfamide in combinazione/seguito da terapia con bevacizumab. Sono stati inclusi nello studio farmacogenetico i soggetti privi di storia clinica di disturbi cardiovascolari e sono stati definiti "casi" i pazienti aventi un evento di ICC (misurato da una frazione di eiezione ventricolare sinistra <50%) entro due anni dall'inizio della terapia con antracicline. La genotipizzazione è stata effettuata tramite piattaforma Array Illumina BeadChip. Le varianti emerse come associate all'*outcome* in studio con un $P < 10^{-5}$ sono state successivamente validate in una coorte indipendente di replicazione. Nello specifico, tale set di validazione era costituito da un sottogruppo di pazienti arruolati per lo studio E1199 (N=5052) che fossero i) affetti da carcinoma alla mammella, ii) in trattamento con doxorubicina + ciclofosfamide + paclitaxel/docetaxel e iii) privi di storia clinica di disturbi cardiovascolari. Sono stati definiti casi i soggetti con evento di ICC dopo trattamento con antracicline diagnosticato secondo i "Common Toxicity Criteria" versione 2.0. Gli SNPs ivi riportati come correlati all'insorgenza di ICC sono stati successivamente testati in una seconda coorte indipendente di replicazione selezionata all'interno del *trial* BEATRICE (N=2591), costituita da pazienti con neoplasia alla mammella e trattati con antracicline. Sono stati ivi selezionati come casi i soggetti aventi un evento di ICC farmaco-indotto definito da una frazione di eiezione ventricolare sinistra <45%.

Dei 4994 soggetti arruolati per il *trial* E5103, i dati genetici sono risultati essere disponibili per 3394 pazienti. Di questi soggetti, 68 (2%) hanno manifestato un evento di ICC, di cui 51 di origine europea-americana, 13 di etnia afro-americana e 4 di altre etnie. Dato il numero esiguo di soggetti di etnia afro-americana, l'analisi genetica è stata condotta unicamente nel sottogruppo di soggetti europei-americani. Per lo studio GWAS sono state genotipizzate 810907 varianti. Nessuna delle varianti analizzate ha raggiunto la significatività statistica *genome-wide* nell'analisi di associazione ($P < 6.16 \times 10^{-8}$). Tuttavia, 11 varianti in 9 regioni cromosomiche indipendenti sono emerse essere correlate con un $P < 10^{-5}$ all'insorgenza di ICC. Di queste varianti, 2 sono emerse essere i top SNPs (rs28714259: $P = 9.25 \times 10^{-6}$; rs6883259: $P = 4.1 \times 10^{-6}$). Rs28714259 e rs6883259 sono state, quindi, validate nel primo set di replicazione (E1199, N=47 casi di ICC) e solo lo SNP rs28714259 ha mostrato un'associazione *borderline* con l'*outcome* in studio ($P = 0.041$). La variante rs28714259 è stata, infine, testata nella seconda coorte di validazione (BEATRICE, N=24 casi di ICC) ed è risultata essere significativamente associata al rischio di insorgenza di ICC indotta da antracicline ($P = 0.018$).

In letteratura sono presenti alcuni studi finalizzati all'identificazione di fattori genetici predittivi dell'insorgenza di ICC indotta da antracicline in pazienti neoplastici. Nel presente GWAS non è stata

validata nessuna delle varianti emerse da studi precedenti come correlate ad ICC antracicline-indotta. Una delle possibili spiegazioni alla base di tale discordanza nei risultati ottenuti risiede nell'eterogeneità, in termini di esposizione ai farmaci, definizione del fenotipo e popolazioni incluse, degli studi precedentemente effettuati. Al contrario, il presente GWAS è stato condotto su ampie coorti di pazienti omogenei sia per tipologia di tumore solido che per trattamento farmacologico somministrato. Si evidenzia, tuttavia, come la definizione dell'evento ICC sia stata effettuata in maniera leggermente dissimile nelle tre coorti indipendenti di pazienti incluse nel GWAS. A dispetto di tale limitazione nel disegno dello studio, la variante intergenica rs28714259 localizzata sul cromosoma 15 è emersa essere correlata ad ICC indotta da antracicline in tutti e tre i *sets* di pazienti neoplastici inclusi nell'analisi. Dati di immunoprecipitazione della cromatina ottenuti nel contesto del progetto ENCODE dimostrano che lo SNP rs28714259 si colloca a livello del sito di legame dei recettori per i glucocorticoidi. È interessante evidenziare come recenti evidenze di letteratura supportino un ruolo chiave del *signaling* dei glucocorticoidi nella maturazione strutturale e funzionale dei tessuti cardiaci fetali nonché una sua implicazione nel mantenimento di una corretta funzionalità cardiaca in diversi modelli animali. Si rendono, tuttavia, necessari ulteriori studi finalizzati alla validazione del ruolo di tale variante come fattore genetico predittivo dell'insorgenza di ICC in pazienti neoplastici trattati con antracicline.

La variante intergenica rs28714259 è potenzialmente correlata all'insorgenza di insufficienza cardiaca congestizia in pazienti affetti da tumore alla mammella e in trattamento con antracicline.

Parole chiave: antracicline, insufficienza cardiaca congestizia, rs28714259

Riferimento bibliografico

[Schneider BP](#) et al. *Clin Cancer Res* 2017, 23(1): 43-51.

BIOMARKER GENETICI DI EFFICACIA DEL SUNITINIB IN PAZIENTI AFFETTI DA CARCINOMA A CELLULE RENALI AVANZATO: RISULTATI DEL TRIAL RENAL EFFECT

A cura della Dott.ssa Lucia Gozzo

Il sunitinib maleato è un inibitore multi-target tirosin chinasi (TKI) approvato dal 2006 per il trattamento del carcinoma a cellule renali avanzato (RCC) e rappresenta un farmaco anti-angiogenetico di prima linea nel RCC metastatico (mRCC) (Mendel DB et al. *Clin Cancer Res* 2003, 9:327-37; Wagstaff J et al. *Ann Oncol* 2016, 27:159-65; Hess G et al. *Clin Genitourin Cancer* 2013, 11:161-7; Harrison MR et al. *J Oncol Pract* 2014, 10:e63-72). È stata osservata una variabilità inter-paziente nella risposta al trattamento e la risposta può essere temporanea a causa dello sviluppo di resistenza. I meccanismi alla base della variabilità nella risposta e dello sviluppo di resistenza non sono ancora stati chiariti, ma sembrerebbero processi multifattoriali (Joosten SC et al. *Biochim Biophys Acta* 2015, 1855:1-16). L'identificazione di *biomarker* potrebbe essere utile per la selezione del trattamento migliore in modo da massimizzare il beneficio clinico per il paziente. Lo studio dei possibili *biomarker* si è focalizzato sulle vie dell'angiogenesi, identificando diversi geni candidati tra cui *VEGF-A*, *VEGFR3*, *HIF1A* e *CXCL8*. Lo studio di Johnson et al. (Johnson T et al. *J Clin Oncol* 2014, 32:4503) non ha confermato l'associazione tra la presenza dei polimorfismi *VEGF-A* e *VEGFR3* e l'efficacia ma ha individuato un'associazione per una variante del gene *LOXL2* e per gli SNP dei geni *CCDC26*, *NTN4*, *SH3GL2* e *IL2RA*. Una valutazione prospettica è tuttavia necessaria.

Lo studio RENAL EFFECT è uno studio multicentrico di fase II di confronto fra due diversi schemi terapeutici a base di sunitinib maleato in prima linea per il mRCC (Motzer RJ et al. *J Clin Oncol* 2012, 30:1371-7). Anche in questo studio, un'analisi esplorativa non ha confermato l'associazione tra efficacia e presenza dei polimorfismi *VEGF-A* e *VEGFR3* (Motzer RJ et al. *Cancer Chemother Pharmacol* 2014, 74:739-50).

In questo studio gli autori riportano una seconda analisi esplorativa effettuata per valutare l'associazione tra l'efficacia della terapia con sunitinib e la presenza di varianti precedentemente identificate, comprese quelle dei geni *LOXL2*, *SH3GL2*, *CCDC26*, *CXCL8* e *IL2RA*.

Sono stati arruolati 292 pazienti, di età superiore ai 18 anni con diagnosi confermata di RCC avanzato e non sottoposti ad altri trattamenti, e sono stati randomizzati ad uno dei 2 regimi a base di sunitinib previsti dallo studio (4 settimane di trattamento+2 di pausa versus dosaggio continuo). L'endpoint primario era il *time to progression* (TTP) mentre l'endpoint secondario era l'*overall response rate* (ORR), l'*overall survival* (OS) e la *progression free survival* (PFS). Sono stati valutati 9 SNP germinali su campioni provenienti da 202 pazienti (69.9%; 101 trattati con il regime 4+2 e 101 con il trattamento continuo). In generale non sono state riscontrate differenze tra la presenza dei genotipi e l'efficacia del trattamento nel braccio con sunitinib a dosaggio continuo rispetto al braccio con schema 4+2. Sono state trovate 2 associazioni significative tra le differenze di OS tra gruppi e i seguenti genotipi: *CLLU1 rs525810 A/A* è stato associato a prolungato OS nei pazienti con trattamento continuo rispetto al braccio con trattamento 4+2 (OS mediana non raggiunta versus 23,39 mesi; p=0,047); *LOXL2 rs4872122 C/A* è stato associato con una OS più lunga in pazienti sottoposti a trattamento continuo rispetto a quelli del braccio 4+2 (OS mediana non raggiunta versus 16,43 mesi; p=0,034). L'analisi di associazione tra i genotipi e l'efficacia intra-gruppo ha mostrato nei pazienti in trattamento continuo un'associazione significativa tra PFS e genotipo *CLLU1 rs525810 A/A* (n=34) rispetto al genotipo *A/G* (12,58 mesi versus 7,29 mesi; n= 52; p=0.014) o *G/G* (12,58 mesi versus 6,6 mesi; n= 15; p=0.048). Nei pazienti del gruppo 4+2 il genotipo *IL2RA rs7893467 T/G* è stato associato a maggiore PFS rispetto al genotipo *T/T* (17,81 mesi; n=15 versus 6,96; n= 86; p=0,034). Il genotipo *CXCL8 rs1126647 A/A* (n=87) è stato associato a maggiore OS rispetto al genotipo *A/A* (OS mediana non raggiunta versus 21,75 mesi; n=89; p=0.004) o *T/T* (12,44; n=26; p<0.001) considerati i gruppi di trattamento combinati. Il genotipo *SH3GL2 rs10963287 C/C* (n=108) è stato associato a maggiore OS rispetto al genotipo *C/T* (OS mediana non raggiunta versus 17,68 mesi; n=79; p=0.005) o *T/T* (21,78 mesi; n=15; p=0.018) considerati i gruppi di trattamento combinati.

Nonostante i numerosi sforzi effettuati, nella pratica clinica non sono ancora disponibili *biomarker* per selezionare la migliore terapia anti-angiogenetica per i pazienti affetti da mRCC. In questo studio è stata condotta una valutazione di SNP identificati in studi precedenti per valutarne l'associazione con l'efficacia in pazienti affetti da mRCC trattati con sunitinib. È stato confermato il ruolo dei geni *IL2RA*, *SH3GL2* e *CXCL8*. L'*IL2RA* codifica per la catena alfa del recettore ad alta affinità dell'interleuchina 2, con ruolo fondamentale nello sviluppo e funzione delle cellule T regolatorie (Sebode M et al. *J Hepatol* 2014, 60:1010-6). Il gene *SH3GL2* codifica per l'endofilina A1, con un ruolo nell'omeostasi dei recettori per il fattore di crescita dell'epidermide (Dikic I. *Biochem Soc Trans* 2003, 31:1178-81) ed ha dimostrato un'azione oncosoppressiva in alcuni tipi tumorali (Maiti GP et al. *PLoS One* 2013, 8:e63440; Dasgupta S et al. *J Mol Med (Berl)* 2013, 91:381-93; Potter N et al. *Neoplasia* 2008, 10:757-72). Il *CXCL8* regola una via alternativa dell'angiogenesi e può agire da meccanismo compensatorio di resistenza a seguito del blocco del VEGF (Huang D et al. *Cancer Res* 2010; 70:1063-71).

In conclusione, i risultati di questo studio suggeriscono un ruolo delle varianti dei geni *CLLU1*, *IL2RA*, *CXCL8* e *SH3GL2* nel determinare la risposta al trattamento con sunitinib in pazienti affetti da mRCC. È necessario confermare questi dati per determinare la potenziale utilità di questi geni come fattori prognostici e predittivi in questa popolazione di pazienti.

Parole chiave: carcinoma a cellule renali avanzato, *SNP germinali*, sunitinib

Riferimento bibliografico

[Motzer RJ](#) et al. *Clin Genitourin Cancer* 2017 Feb 27 [Epub ahead of print].

ALTERAZIONE DEI LIVELLI SIERICI DI MIR34A DURANTE LA CHEMIOTERAPIA NEOADIUVANTE PREDICONO LA RISPOSTA TERAPEUTICA E LA PROGNOSI NEL CANCRO AL SENO IN STADIO II/III

A cura della Dott.ssa Gloria Ravegnini

Il cancro al seno è uno dei più comuni tipi di cancro nelle donne. Il trattamento di questa tipologia di cancro prevede la resezione chirurgica, la chemioterapia e la terapia ormonale; recentemente è stata introdotta la

chemioterapia preoperatoria neoadiuvante (NACT). NACT è raccomandata per tumori inoperabili e avanzati ma anche per quelli precoci, poiché ne riduce le dimensioni, elimina le micro-metastasi e aumenta il tasso di interventi conservativi. Benché l'impiego di NACT abbia avuto notevoli benefici sul trattamento del cancro al seno, tuttavia alcune pazienti mostrano una scarsa risposta a causa della resistenza alla chemioterapia. Per questo, diventa sempre più importante identificare marker non invasivi e specifici, in grado di stimare i benefici clinici della NACT nei primi stadi della terapia. I miRNA sono implicati nella tumorigenesi, nel trattamento e nella prognosi del cancro e negli ultimi anni diversi studi hanno mostrato che alcuni di questi, come il miR221, miR125 e miR34a sono implicati nel cancro al seno. I miRNA sono stabilmente presenti nel sangue e possono essere sfruttati come biomarcatori per diagnosi e outcome clinico. Date le suddette premesse, lo scopo di questo lavoro è stato quello di investigare il valore predittivo dell'espressione del miR34a sierico (ser-miR34a) nella risposta al trattamento e nella prognosi di pazienti con cancro al seno riceventi NACT.

Nello studio sono stati arruolati un totale di 86 pazienti con cancro al seno in stadio II/III, HER2 negativi. Tutti i soggetti sono stati trattati con 6 cicli di NACT neoadiuvante (75mg/m² docetaxel + 75mg/m² epirubicina, 500mg/m² cytoxan); in aggiunta, 20 donne sane sono state incluse come controllo. Il periodo di follow-up medio dopo l'intervento chirurgico è stato di 26 mesi (range 11-36 mesi). Il sangue è stato prelevato da ciascuna paziente prima del trattamento (BS, baseline), dopo il secondo ciclo (FEN, first evaluation during NACT) e alla fine della chemioterapia (SEN, second evaluation). Il tumore è stato valutato mediante CT scan e raggi X; sulla base dei criteri di valutazione dei tumori solidi, le pazienti sono state suddivise in responsive se presentavano una risposta completa o parziale o non responsive, in caso di malattia stabile o in progressione.

Dal confronto delle donne sane con le pazienti prima dell'inizio del trattamento, è emerso che i livelli di ser-miR34a erano significativamente più elevati rispetto ai controlli (5.79 ± 2.80 vs 1.06 ± 0.33 , $p < 0.001$), mentre non sono emerse associazioni significative con i parametri clinico-patologici. Per quanto riguarda la risposta alla terapia, alla fine della NACT, 55 pazienti su 86 avevano risposto, mentre 31 erano state classificate come non responsive. I livelli medi di ser-miR34a non avevano mostrato differenze significative tra le pazienti responsive e non, ai diversi *time points* (BS, FEN e SEN); tuttavia i cambiamenti nell'espressione di ser-miR34a durante NACT erano significativamente associati con la risposta chemioterapica. Dopo il secondo ciclo di chemioterapia (FEN), delle 55 pazienti responsive, 48 mostravano una diminuita espressione di ser-miR34a rispetto all'inizio del trattamento, mentre delle 31 pazienti non responsive, solo 9 presentavano una simile diminuzione, con una differenza significativa tra i due gruppi ($p < 0.001$). In particolare, nel gruppo responsivo il livello medio di espressione di ser-miR34a al timepoint FEN era di 4.63 ± 2.55 , significativamente più basso rispetto a prima del trattamento neoadiuvante (5.73 ± 3.17) ($P = 0.016$). Analogamente, risultati simili si riscontravano osservando i valori di espressione alla BL e alla SEN. Ancora una volta, nelle pazienti responsive, era stata osservata una diminuzione dei livelli di ser-miR34a rispetto all'inizio di NACT (BL: 5.82 ± 2.60 ; SEN: 4.27 ± 2.45 , $p = 0.02$); al contrario, nella coorte non responsiva non si era registrato alcun cambiamento. Questi risultati indicano che le variazioni dei livelli sierici del miR-34a durante NACT possono predire la risposta al trattamento. Per stimare il potere predittivo di ser-miR-34a, sono state costruite le curve ROC; i valori di AUC per i cambiamenti di espressione di ser-miR-34a da BL a FEN e da BL a SEN erano rispettivamente di 0.816 e 0.808 ($p < 0.001$). Questi risultati indicavano che le variazioni di ser-miR-34a erano in grado di discriminare tra pazienti responsive e non, durante NACT. Infine per determinare il valore prognostico di questo miRNA sono state impiegate le curve di sopravvivenza. I cambiamenti nei livelli di espressione da BL a FEN e da BL a SEN erano significativamente associati con il tempo libero da malattia (DFS). In particolare, le pazienti con una diminuzione di ser-miR-34a da BL a FEN e da BL a SEN mostravano un DFS favorevole, rispetto a quelli in cui ser-miR-34a aumentava ($p < 0.001$, per entrambi). Dall'analisi multivariata di Cox è infine emerso che le alterazioni di ser-miR-34a durante la terapia rappresentavano un fattore prognostico indipendente.

Questo studio pone l'attenzione su una tematica molto importante nell'era della medicina personalizzata, ossia l'identificazione di biomarcatori non invasivi, in grado di fornire informazioni utili per monitorare l'outcome clinico. I risultati sul ruolo di ser-miR34a, qui riportati, sono tuttavia in disaccordo con dati precedentemente pubblicati (Hagrass HA *et al*, Gene Cancer 2015), che riportavano i livelli sierici nel cancro al seno significativamente più bassi rispetto ai controlli sani. Questo sottolinea l'importanza di future analisi

in coorti più ampie e omogenee. Infatti, il limite principale di questo studio, oltre alla bassa numerosità, è rappresentato dal fatto che il gruppo arruolato era disomogeneo dal punto di vista del sottotipo molecolare, che si ripercuote sulle differenti caratteristiche biologiche del tumore. Inoltre, come sottolineato dagli autori stessi, le pazienti erano di etnia asiatica e di conseguenza non è da escludere che tali risultati non siano estrapolabili a etnie differenti.

In conclusione, il presente studio ha permesso di identificare un nuovo biomarcatore, non invasivo, per il cancro al seno. Una monitoraggio dinamico dell'espressione di miR-34a sierico può predire infatti l'efficacia del trattamento con NACT e il tempo libero da malattia

Parole chiave: cancro al seno, NACT, ser-miR34a

Riferimento bibliografico

[Liu B](#) et al. *Biomed Pharmacother* 2017, 88: 911-7

miR-200B E miR-155 UTILIZZABILI COME BIOMARKER PREDITTIVI PER L'EFFICACIA DELLA CHEMIO-RADIOTERAPIA NEL CARCINOMA A CELLULE SQUAMOSE DI TESTA E COLLO LOCALMENTE AVANZATO

A cura della Dott.ssa Giulia Sammarini

I recenti progressi nella diagnosi e nel trattamento del carcinoma a cellule squamose di testa e collo (HNSCC) hanno migliorato notevolmente la sopravvivenza dei pazienti. Un esito clinico sfavorevole è da imputarsi alla resistenza delle cellule tumorali al trattamento con radio- e chemioterapia, quindi gli obiettivi che si sta cercando di raggiungere al momento sono la scoperta del meccanismo molecolare che provoca questo fallimento e l'identificazione di biomarker predittivi.

I miRNA sono importanti regolatori dell'espressione genica e pertanto sono una promettente risorsa utilizzabile come biomarcatori. Poiché questi piccoli frammenti di RNA sono molto stabili, l'analisi della loro espressione è fattibile anche in tessuti tumorali paraffinati (FFPE). La deregolazione dei miRNA può essere associata a progressione tumorale, metastasi e resistenza a radio- chemioterapia, la quale può essere ulteriormente condizionata dal microambiente tumorale.

L'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare il valore predittivo dei miRNA sul trattamento personalizzato di pazienti affetti da HNSCC localmente avanzato, facenti parte di un trial di fase III (ARO-0401, n=364), cui sono stati somministrati due regimi terapeutici di chemio- radioterapia (CRTX). Inoltre, gli autori hanno voluto determinare l'eventuale presenza di associazioni fra il profilo di espressione dei miRNA con la risposta immunitaria, e la correlazione fra le cellule immunitarie target dei miRNA e l'efficacia della CRTX.

Sono state analizzate le paraffine di tessuto tumorale di 149 pazienti con HNSCC inoperabile e localmente avanzato (78 orofaringei [OPSCC] e 71 ipofaringei [HPSCC]), sottoposti a trattamento con radioterapia iperfrazionata accelerata in combinazione con 5-fluorouracile (5-FU) e mitomicina C (MMC-CRTX, braccio di controllo), oppure 5-FU e cisplatino (CDDP-CRTX, braccio sperimentale). Il follow up medio è stato di 61 mesi. Per l'analisi delle associazioni fra il livello di espressione dei miRNA e l'outcome, sono stati utilizzati i seguenti parametri: OS, in cui il fallimento è stato determinato da morte per qualunque causa; sopravvivenza priva di ricadute locali, in cui il fallimento è stato definito come progressione locale, e sopravvivenza priva di metastasi, interrotta dalla comparsa di progressione distante dal punto d'origine.

Sono stati analizzati i livelli di espressione pre-terapeutici dei miRNA nei 48 casi con OPSCC e sono stati realizzati cluster gerarchici dei miRNA aventi differenti espressioni con range ≥ 2 o ≤ 0.5 fra pazienti vivi e morti dopo 3 anni. Solo un miRNA è risultato up-regolato nei pazienti con prolungata OS. È stata poi realizzata una classificazione dei soggetti in alta e bassa espressione del miRNA secondo la mediana delle espressioni del profiling. 5 miRNA (miR-532-5p, miR-200b, miR-27b, miR-451 e miR-130b), su 9 differentemente espressi sono significativamente associati con OS in seguito a trattamento con MMC-CRTX. Tutti i 6 miRNA differentemente espressi (miR-125b, -146a, -150, -155, -187 e -342-5p) sono significativamente correlati con OS nel braccio CDDP-CRTX. In seguito, gli autori si sono focalizzati su

miR-200b e miR-155/miR-146a, a causa del loro forte impatto su OS nei due bracci del trial. L'alta espressione del miR-200b era significativamente associata con un'aumentata OS in seguito a MMC-CRTX, ma non nella coorte di controllo CDDP-CRTX. Viceversa, un'alta espressione di miR-155 e di miR-146a era predittiva di una prolungata OS in seguito a trattamento con CDDP-CRTX, ma non con MMC-CRTX.

I valori predittivi dei miR-200b, miR-155 e miR-146a sono stati validati mediante real-time PCR nella coorte di pazienti con OPSCC, confermando la significatività dei primi due miRNA con OS; in contrasto con i dati degli array, i risultati delle analisi dei campioni della coorte di validazione OPSCC analizzati con real-time PCR non hanno evidenziato una significativa associazione di miR-146a con OS. Dopo aggiustamento per status HPV, fumo e braccio di trattamento, il miR-146a è rimasto un fattore pronostico indipendente, così come il miR-155. I valori predittivi dei 3 miRNA sono stati ulteriormente analizzati, nei rispettivi bracci di trattamento, nei pazienti con HNSCC, ma non sono state riscontrate associazioni positive. Successivamente, è stato dimostrato che il miR-200b è positivamente associato con la progressione in siti distanti, in seguito a trattamento MMC-CRTX, mentre il miR-155 è significativamente correlato con ricadute locali in seguito a terapia con CDDP-CRTX, mantenendo però solo un *trend* per le metastasi in siti distanti.

Per quanto riguarda la funzione regolatoria nelle cellule tumorali, è stato visto che miR-155 e il miR-146a hanno un ruolo importante nella risposta immunitaria innata e adattativa. L'espressione dei due miRNA è strettamente collegata con i livelli di cellule NK, cellule T CD8+, cellule T regolatorie, cellule Th1, cellule B e cellule T attivate CD4+. Gli alti livelli delle 6 tipologie cellulari sono significativamente associati con OS in seguito a trattamento con CDDP-CRTX, ma non con MMC-CRTX.

La forza di questo studio è rappresentata dal fatto che l'associazione fra il profilo dei miRNA e l'esito clinico sia stata studiata in una popolazione uniforme e ben caratterizzata a livello clinico appartenente ad un trial, e che il valore predittivo dei miRNA candidati sia stato poi validato mediante ulteriori tecniche. Le limitazioni di questi esperimenti sono costituite dal ristretto numero di soggetti analizzati, dalla natura retrospettiva dello studio molecolare e dal focus solo su pazienti con tumore orofaringeo o ipofaringeo.

In conclusione, il miR-200b e il miR-155 sono risultati potenziali biomarker predittivi nel trattamento personalizzato, selezionando fra due differenti regimi terapeutici di CRTX.

Parole chiave: HNSCC, miR-200b, miR-155, chemio-radioterapia

Riferimento bibliografico

Hess AK et al. *Eur J Cancer* 2017, 77: 3-12

UNO STUDIO *GENOME-WIDE* CORRELA UNA VARIANTE DI *PNPLA3* CON L'AUMENTO DELLE TRANSAMINASI EPATICHE IN SEGUITO ALLA TERAPIA PER LA LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA

A cura della Dott.ssa Raffaella Franca

Nonostante la cura della leucemia linfoblastica acuta (LLA) abbia ormai raggiunto tassi di guarigione intorno al 90% nei bambini, essa è spesso complicata dall'insorgenza di tossicità severe dovute ai farmaci somministrati. L'epatotossicità è tra gli effetti avversi più comuni: essa viene indotta da molti dei chemioterapici usati (asparaginasi, mercaptopurina, tioguanina, metotressato, etoposide e glucocorticoidi) e, nei suoi episodi più gravi, comporta la sospensione temporanea del trattamento farmacologico aumentando così il rischio di ricaduta nei pazienti. Alcuni regimi di trattamento per gli adulti affetti da LLA evitano o riducono le dosi di farmaci quali l'asparaginasi o il metotressato, proprio con lo scopo di ridurre al minimo questa complicanza; tuttavia, questo approccio potrebbe essere causa del maggiore insuccesso della terapia osservato negli adulti rispetto ai bambini. Studi mirati a chiarire il meccanismo della epatotossicità indotta da farmaci sono quindi importanti per sviluppare delle strategie terapeutiche personalizzate in grado di migliorare l'efficacia della cura, identificando i pazienti che possono trarne il maggiore beneficio e riducendo l'incidenza di episodi avversi e le conseguenti interruzioni della cura.

L'articolo di Liu e collaboratori si colloca in questo contesto ed è volto a studiare le varianti genetiche codificanti e non codificanti associate con l'aumento delle alanina aminotransferasi (ALT) al termine della

terapia di induzione della remissione nei pazienti pediatrici affetti da LLA. Per tale scopo, sono stati genotipizzati 715 bambini arruolati nei protocolli Total XV e Total XVI del St. Jude Children's Research Hospital (SJCRH, Memphis, USA). I due protocolli presentavano differenze terapeutiche minime: nel primo veniva impiegata una finestra terapeutica pre-induzione a base di metotressato e la maggior parte dei pazienti riceveva, oltre ai farmaci tipici dell'induzione della LLA, 6-mercaptopurina e asparaginasi nativa di *E.coli* (Elspar) mentre nel secondo, i pazienti venivano piuttosto trattati con 6-tioguanina e asparaginasi pegilata di *E.coli* (Oncospar); in entrambi i protocolli, pazienti che non rispondevano adeguatamente all'induzione (misurata come malattia residua minima elevata al giorno +15-19) ricevevano dosi aggiuntive di asparaginasi. Nella coorte analizzata, i livelli di ALT più elevati sono stati riscontrati nel protocollo Total XVI ($p=0,041$), nei pazienti che avevano ricevuto una dose maggiore di asparaginasi nell'induzione ($p=2,7 \times 10^{-4}$), nei bambini bianchi ($p=8,7 \times 10^{-13}$) e ispanici ($p=2,6 \times 10^{-7}$), nei bambini più grandi ($p=1,4 \times 10^{-6}$) e con un indice di massa corporea più alto ($p=2,9 \times 10^{-3}$). L'etnia contribuiva al 7,2% della variabilità dei livelli di ALT. I pazienti del protocollo Total XVI presentavano inoltre più epatotossicità di grado 2-3 rispetto agli altri (tra 2,5 e 20 volte il limite superiore normale delle ALT secondo dei criteri di tossicità del National Cancer Institute).

Le analisi genetiche sono state condotte sia nella coorte del SJCRH che in un gruppo indipendente di 2285 pazienti arruolati nel protocollo COG (Children's Oncology) AALL0232. Il DNA germinale è stato genotipizzato tramite l'impiego delle piattaforme Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 oppure Affymetrix Human Mapping 500K Array Set (839 pazienti SJCRH e 2666 COG); il sequenziamento esonico è stato eseguito mediante Exome-24 BeadChip (Illumina, San Diego, CA) (689 pazienti SJCRH e 2382 COG) o mediante whole exome sequencing (552 pazienti SJCRH). Il sistema MaCH-Admix (<http://www.unc.edu/~yunmli/MaCHAdmix>) è stato utilizzato per imputare il genotipo degli SNP non direttamente tipizzati, sulla base del 1000 Genomes Project (<http://www.1000genomes.org>).

Per identificare le varianti genetiche associate con i livelli elevati di ALT post-induzione, è stato usato un modello di regressione lineare multivariata aggiustato per età, indice di massa corporea, gruppo etnico, tipo e dose di asparaginasi impiegata. L'associazione più forte ($p=2,5 \times 10^{-8}$) è stata riscontrata per il polimorfismo rs738409 nel gene *PNPLA3* (C>G; I148M) con valori mediani di ALT pari a 35, 45, e 58 IU/L rispettivamente per i pazienti portatori dei genotipi CC, GC e GG ed un'incidenza nella tossicità severa (ALT di grado >2) rispettivamente del 2,6%, 3,9% e 5,3%. La variante *PNPLA3* rs738409 spiegava il 3,8% della variabilità osservata nei valori ALT e spiegava, almeno in parte, anche le differenze dovute all'etnia. L'associazione tra questo polimorfismo e valori elevati di ALT è stata confermata anche nella coorte di validazione COG ($p=0,024$). Studi genome-wide precedenti avevano identificato il polimorfismo *PNPLA3* (C>G; I148M) come una variante di suscettibilità alle malattie epatiche: questa variante genica era stata infatti già associata ad un aumento dei livelli di ALT nella popolazione generale, all'incidenza della fibrosi epatica e della steatosi epatica non alcolica; era stata inoltre associata ad una scarsa risposta al trattamento nell'epatite C cronica, al carcinoma epatocellulare e alla resistenza all'insulina. Studi di meta-analisi hanno confermato in particolare il suo ruolo nell'insorgenza e nella gravità della steatosi epatica non alcolica.

In conclusione, lo studio di Liu e collaboratori identifica la variante missense *PNPLA3* rs738409 come una variante farmacogenetica associata ad epatotossicità al termine della fase di induzione del trattamento per la LLA. Essendo questa variante associata al rischio di malattie epatiche, gli autori suggeriscono che l'aumento delle ALT possa essere conseguenza di un'alterazione genetica nell'omeostasi dei trigliceridi epatici e ad un'augmentata incidenza su base genetica di steatosi epatica nei pazienti portatori dell'allele mutato.

Parole chiave: pediatric acute lymphoblastic leukemia, hepatotoxicity, induction therapy, genome-wide study, *PNPLA3*

Riferimento bibliografico

[Liu Y](#) et al. *Clin Pharmacol Ther* 2017 Jan 16 [Epub ahead of print]

LA VARIANTE IDH1 R132H STIMOLA LA MIGRAZIONE CELLULARE ATTRAVERSO L'ATTIVAZIONE DEL PATHWAY AKT-MTOR, MA SENSIBILIZZA LE CELLULE AL TRATTAMENTO CON 5-FU ATTRAVERSO LA RIDUZIONE DEI LIVELLI DI NADPH E GSH

A cura della Dott.ssa Valeria Conti

Le mutazioni nei geni codificanti per gli enzimi isocitrato deidrogenasi (IDH1 e IDH2) sono frequenti nei pazienti affetti da glioma. L'IDH catalizza l'ossidazione dell'isocitrato ad α -chetoglutarato e allo stesso tempo, utilizzando NADP⁺ come cofattore, produce NADPH.

Le varianti di IDH1 sono particolarmente frequenti nei gliomi di grado II/III e nei glioblastomi secondari. La più comune di tali varianti è la *gain-of-function* R132H che porta alla riduzione dell' α -chetoglutarato a D-2-idrossichetoglutarato con consumo di NADPH causando anche una diminuzione dei livelli di glutatione ridotto (GSH).

È stato dimostrato che questa variante induce una significativa riduzione della proliferazione cellulare e cambi della morfologia e del pattern di migrazione in cellule di glioma della linea U87MG (Bralten LB et al. *Ann Neurol* 2011, 69(3):455–63). Una comprensione approfondita degli effetti della mutazione IDH1 R132H sui meccanismi molecolari che regolano la proliferazione e la migrazione e quindi la patogenesi del glioma potrebbe generare ricadute molto importanti per lo sviluppo di nuove terapie antitumorali sempre più mirate.

Gli autori di questo studio hanno investigato il ruolo della variante IDH1 R132H nell'influenzare la proliferazione e la migrazione cellulare e il *pathway* AKT-mTOR attraverso la sua over-espressione e *knocking down* tramite silenziamento genico in cellule primarie di glioma (U87MG).

Inoltre, poiché era stato dimostrato che pazienti portatori della mutazione hanno livelli di NADPH più bassi dei *wild type* e mostrano una sopravvivenza maggiore, un obiettivo ulteriore è stato verificare se livelli ridotti di NADPH fossero associati a un aumento della sensibilità del tumore alla terapia antitumorale.

Le cellule U87MG sono state transfettate con un vettore plasmidico contenente la variante IDH1 R132H. Nelle U87MG sono stati eseguiti esperimenti di MTT, *scratch repair assay* e western blot per valutare rispettivamente l'influenza della variante sulla proliferazione e migrazione cellulare e sull'attivazione del *pathway* AKT-mTOR. Infine, i livelli di NADPH e GSH sono stati misurati per valutare l'effetto della variante sulla produzione di queste molecole antiossidanti.

L'over-espressione della mutazione IDH1 R132H riduceva la proliferazione delle cellule di glioma e ne aumentava il tasso di migrazione e invasione. I cloni cellulari mutanti mostravano anche un aumento significativo dell'attivazione del *pathway* AKT-mTOR, che gioca un ruolo cruciale nella regolazione della migrazione cellulare e dell'apoptosi.

Inoltre, la presenza della mutazione IDH1 R132H rendeva le cellule più sensibili al trattamento con 5-FU ed era associata a livelli ridotti di NADPH e GSH.

Gli esperimenti di *knocking down* con siRNA confermavano i risultati ottenuti tramite l'over-espressione della mutazione.

Gli effetti della variante sulla migrazione cellulare sono probabilmente dovuti all'induzione del *pathway* AKT-mTOR. Infatti, l'attivazione di AKT a sua volta attiva mTOR fattore coinvolto nella stimolazione della trascrizione genica e della traduzione di proteine regolatrici della sopravvivenza cellulare e dell'apoptosi.

Il *pathway* AKT-mTOR gioca un ruolo cruciale nella migrazione e invasione cellulare poiché controlla l'espressione e l'attivazione di diversi fattori coinvolti in questi processi, come l'isoforma endoteliale della sintasi dell'ossido nitrico e molecole di adesione come ICAM, catenina β e caderina E ed alcune metalloproteinasi. In questo studio, l'IDH1-siRNA, inibendo l'attivazione del segnale di AKT-mTOR, comportava una riduzione della migrazione cellulare.

Diversi studi avevano mostrato come la mutazione IDH1 R132H causasse cambi metabolici molto importanti nel grado di metilazione e di riparo del DNA. In particolare, Fonneet e collaboratori avevano dimostrato che campioni di glioma portatori della mutazione riducevano del 38% la capacità di produrre NADPH, che insieme al GSH è un antiossidante molto importanti nel regolare lo stato redox della cellula.

Gli autori di questo studio hanno dimostrato che l'induzione dell'espressione della variante IDH1 R132H comportava una diminuzione dei livelli di NADPH and GSH rendendo le cellule di glioma più vulnerabili e quindi più sensibili al trattamento chemioterapico con 5-FU. Questi risultati sottolineano il ruolo del NADPH come antiossidante e come target terapeutico nelle linee tumorali di glioma che esprimono la mutazione IDH1 R132H o altre mutazioni da investigare in studi futuri.

In conclusione, questo studio ha confermato il ruolo della variante IDH1 R132H nell'attivare il *pathway* di AKT-mTOR e quindi nella stimolazione della migrazione e invasione cellulare, suggerendo un suo coinvolgimento nella patogenesi del glioma. L'osservazione che la variante IDH1 R132H, influenzando lo stato redox, rende le cellule tumorali più sensibili al 5-FU rappresenta uno spunto molto interessante per guidare il clinico verso la scelta di un approccio terapeutico sempre più mirato.

Parole chiave: glioblastoma, 5-FU, NADPH, proliferazione cellulare, migrazione cellulare, apoptosi

Riferimento bibliografico

[Zhu H](#) et al. *PLoS One* 2017, 12(1): e0169038

NEUROLOGIA

POLIMORFISMI DI ENZIMI ANTIOSSIDANTI NON INFLUENZANO IL RISCHIO DI EPILESSIA O LA FARMACO-RESISTENZA DOPO LESIONI IPOSSICO-ISCHEMICHE CEREBRALI NEONATALI

A cura della Dott.ssa Donatella Carretta

L'encefalopatia ipossico-ischemica (*hypoxic-ischemic encephalopathy*, HIE) si sviluppa a seguito di un'ipossia intrauterina o perinatale associata a diverse condizioni materne, placentari e/o fetali. L'asfissia perinatale porta ad una cascata di eventi neurotossici che includono danno dei meccanismi energetici cellulari e accumulo di specie reattive dell'ossigeno (*reactive oxygen species*, ROS). Nell'encefalo immaturo, che ha una ridotta capacità di difesa contro i ROS dovuta ad una minore attività della glutazione perossidasi, il danno tissutale che ne risulta può portare a *minimal brain damage disorders* (deficit di attenzione e iperattività) o a più gravi patologie neurologiche, quali epilessia, paralisi cerebrale (*cerebral palsy*, CP) o entrambe. Gli enzimi antiossidanti rappresentano un importante meccanismo di difesa contro i ROS; si ritiene, inoltre, che lo stress ossidativo nel tessuto cerebrale giochi un ruolo importante nell'epilettogenesi e che l'attività degli enzimi antiossidanti influenzino la suscettibilità all'epilessia o le sue caratteristiche quali, ad esempio, la resistenza farmacologica.

Gli enzimi antiossidanti, come la manganese superossido dismutasi (SOD2), la glutazione perossidasi (GPX1) e la catalasi (CAT) detossificano l'anione superossido e il perossido di idrogeno e costituiscono la difesa primaria contro i ROS. L'attività di questi enzimi protegge le cellule dai ROS ed è influenzata da polimorfismi genetici funzionali. Lo scopo del presente studio è investigare eventuali associazioni tra i polimorfismi SOD2 rs4880, GPX1 rs1050450 and CAT rs1001179 ed epilessia dopo HIE neonatale.

Sono stati reclutati 214 pazienti (bambini ed adolescenti) Caucasici con epilessia. I dati medici sono stati raccolti retrospettivamente, in particolare quelli relativi al periodo neonatale quali stato di coscienza, attività, controllo neuromuscolare, riflessi primitivi, funzioni autonome e presenza di epilessia. I pazienti sono stati divisi in due gruppi in base all'eziologia dell'epilessia. Il criterio di inclusione per il primo gruppo era presenza di HIE di grado II-III, in accordo con la classificazione della *Sarnat and Sarnat Grading Scale*. In questo gruppo sono stati inclusi solo i neonati che avevano sofferto di un episodio di ipossia perinatale acuta. I criteri di esclusione per il primo gruppo erano HIE di primo grado e la presenza di altre condizioni mediche in grado di causare epilessia. Il criterio di inclusione per il secondo gruppo era la diagnosi di epilessia a prescindere dall'eziologia, ma in assenza di HIE perinatale. Per tutti i pazienti sono stati raccolti i seguenti dati: genere, data di nascita, età gestazionale, eziologia dell'epilessia e responsività dell'epilessia al trattamento farmacologico (epilessia in remissione, in assenza di crisi nell'ultimo anno, epilessia farmaco-resistente, in presenza di almeno una crisi nell'ultimo anno). Un ulteriore gruppo di controllo consisteva di 95 soggetti sani con meno di 30 anni. La genotipizzazione di è stata realizzata usando la *TaqMan genotyping*

assays (*Applied Biosystems*) per GPX1 rs1050450 e SOD2 rs4880 e la *KASPar assay* (*KBiosciences*) per CAT rs1001179.

L'intera popolazione comprendeva 214 pazienti con epilessia, 64 (29,9%) con HIE e 150 (70,1%) con altre cause di epilessia e senza HIE. Dei 95 controlli sani, 46 (48,9%) erano maschi e l'età mediana era di 21 (20-23) anni. La distribuzione della frequenza di GPX1 rs1050450, SOD2 rs4880 e CAT rs1001179 tra i pazienti con epilessia non differiva significativamente dai controlli sani ($p=0,26$, $p=0,65$, $p=0,53$). La distribuzione dei polimorfismi tra i pazienti con epilessia dopo HIE era simile ai controlli. Non vi erano inoltre differenze significative nella distribuzione dei genotipi tra i pazienti con epilessia dopo HIE e pazienti con epilessia senza HIE.

Nel gruppo dei pazienti con epilessia, 105 (49,5%) hanno raggiunto la remissione e 107 (50,5%) erano invece farmaco-resistenti (i dati relativi alle crisi erano inconcludenti per due pazienti). Diverse caratteristiche cliniche erano associate alla resistenza farmacologica: pazienti con epilessia e HIE avevano, infatti, maggiori probabilità di essere farmaco-resistenti rispetto ai pazienti con epilessia senza HIE ($p=0,009$, $OR=2,25$; 95% $CI=1,22-4,15$). I pazienti con epilessia che avevano avuto anche CP hanno sviluppato epilessia farmaco-resistente più frequentemente ($p=0,006$, $OR=2,6$; 95% $CI=1,3-5,2$). Il genere non era associato alla farmaco-resistenza, al contrario dell'età, con i pazienti più grandi risultati più spesso in remissione ($p=0,039$, $OR=0,96$; 95% $CI=0,92-1,00$). Inoltre, la distribuzione di GPX1 rs1050450, SOD2 rs4880 o CAT rs1001179 non differiva tra i pazienti in remissione e pazienti con farmaco-resistenza. Nel gruppo dei 64 pazienti con epilessia e HIE, solo 22 (35,50%) hanno raggiunto la remissione. In questo gruppo, nessuna delle variabili cliniche era associata alla farmaco-resistenza. La distribuzione dei genotipi polimorfici tra i pazienti con HIE in remissione e i pazienti con HIE con farmaco-resistenza non differiva.

Il presente studio dimostra che GPX1 rs1050450, SOD2 rs4480 e CAT rs1001179 non sono associate né allo sviluppo di epilessia dopo HIE, né alla farmaco-resistenza. Il numero totale di pazienti in remissione era paragonabile a quello non in remissione e i due gruppi non differivano nella distribuzione dei polimorfismi degli enzimi antiossidanti. Dagli studi in letteratura emerge una chiara evidenza dell'implicazione dello stress ossidativo e del ruolo del sistema antiossidante nella patogenesi dell'epilessia. È stato dimostrato, ad esempio, un aumento dei livelli di CAT, una diminuzione di GPX e livelli invariati di SOD in campioni di tessuto cerebrale di pazienti con epilessia. Questi dati indicano CAT come il principale antiossidante enzimatico nella neocortex umana epilettica, mentre GPX e SOD sembrano rivestire un ruolo minore. I dati del presente studio risentono di diverse limitazioni: il numero di pazienti nel gruppo con HIE era piccolo ed eterogeneo: alcuni pazienti prematuri, infatti, presentavano una HIE associata ad emorragia subependimale ed intraventricolare. Il numero dei pazienti con emorragia era troppo ridotto per essere studiato separatamente. Un'altra limitazione dello studio riguarda il reclutamento di neonati con età gestazionale differenti (dai prematuri ai neonati a termine); il numero dei pazienti di questi due sottogruppi era troppo esiguo per effettuare un'analisi statistica separata per età gestazionale. Per studiare con maggior precisione l'impatto di questi polimorfismi, in futuro sarebbe opportuno realizzare uno studio prospettico di una coorte di neonati con HIE ma senza epilessia rispetto ai neonati che invece sviluppano epilessia.

In conclusione, il presente studio mostra che i polimorfismi SOD2 rs4880, GPX1 rs1050450 e CAT rs1001179 non sono associati ad un'aumentata suscettibilità all'epilessia dopo encefalopatia ipossico-ischemica neonatale o alla farmaco-resistenza.

Parole chiave: enzimi antiossidanti, polimorfismi, epilessia, epilessia farmaco-resistente, encefalopatia ipossico-ischemica

Riferimento bibliografico

[Esih K et al. *Seizure* 2017, 46: 38-42](#)

NEUROPLASTICITÀ E PATHWAY DEI SECONDI MESSAGGERI NELL'EFFICACIA DEGLI ANTIDEPRESSIVI: RISULTATI FARMACOGENETICI DI UN TRIAL PROSPETTICO CHE HA INVESTIGATO LA RESISTENZA AL TRATTAMENTO

A cura della Dott.ssa Claudia Pisanu

I pazienti affetti da disturbo depressivo maggiore (MDD) presentano un'elevata percentuale di resistenza al trattamento (TRD). La definizione più diffusa di TRD consiste nel fallimento dopo trattamento consecutivo con due antidepressivi appartenenti a classi diverse, utilizzati con una durata di terapia e dosi adeguate. È stato stimato che il 30-40% degli episodi di MDD trattati per un periodo di tempo adeguato, con una dose raccomandata di un antidepressivo, mostrino resistenza al trattamento. È stato suggerito che alcune varianti di geni coinvolti nella trasmissione monoaminergica (*HTR2A*, *COMT*), nella plasticità neuronale (*BDNF*, *CHL1*, *ITGB3*, *ST8SIA2*, *PPP3CC*, *PLA2G4A*, *GSK3B*), nella regolazione dei ritmi circadiani (*RORA*, *VIPR2*), nella cascata dei secondi messaggeri e nelle *pathway* dei fattori di trascrizione (*ZNF804A*, *SP4*) possano essere associati alla risposta agli antidepressivi e alla TRD. Il presente studio ha avuto come obiettivo quello di replicare questi risultati in un campione prospettico indipendente, e di valutare il ruolo di ulteriori varianti genetiche selezionate dagli autori (non associate con la risposta ad antidepressivi in studi precedenti).

Lo studio multicentrico ha coinvolto 417 pazienti, reclutati tra il 2005 e il 2011, con una diagnosi di MDD e una storia di mancata risposta a un trattamento con antidepressivi. 220 pazienti hanno accettato di effettuare un prelievo ematico per l'analisi genetica e sono stati inclusi nello studio.

Nella prima fase, i pazienti hanno ricevuto un trattamento con venlafaxina per sei settimane. Nella seconda fase, i pazienti che non avevano risposto sono stati trattati per ulteriori sei settimane con escitalopram. I criteri di inclusione erano: 1) capacità di leggere e comprendere le informazioni riguardanti lo studio; 2) firma del consenso informato; 3) età pari ad almeno 18 anni; 4) MDD valutato con la *Mini International Neuropsychiatric Interview* (MINI), di gravità moderata o severa in accordo con i criteri del DSM-IV-TR; 5) storia di trattamento dell'attuale episodio depressivo con un qualsiasi antidepressivo (eccetto venlafaxina o escitalopram) ad un dosaggio ottimale per almeno 4 settimane; 6) mancata risposta a questo precedente trattamento (miglioramento < 50% secondo la *Montgomery-Asberg Depression Rating Scale* (MADRS)); e *total score* MADRS ≥ 22 . I principali criteri di esclusione erano: 1) *non-responder* a una combinazione dei due antidepressivi al momento dello *screening*; 2) storia di allergia o ipersensibilità a farmaci; 3) altri disturbi psichiatrici oltre al MDD, disturbi da abuso di sostanze nei sei mesi precedenti o disturbi della personalità; 4) trattamento con altri farmaci psicotropi; 5) malattie organiche severe o che potessero rappresentare una controindicazione al trattamento con venlafaxina o escitalopram; e 6) stato di gravidanza o allattamento.

La dose iniziale di venlafaxina era 75 mg/die e poteva essere aumentata fino ad un massimo di 225 mg/die in caso di risposta insoddisfacente. I pazienti che 1) al 28 giorno presentavano un *total score* MADRS ≥ 20 e una riduzione del *total score* MADRS < 25% rispetto al *baseline*, o 2) che al giorno 42 presentavano un *total score* MADRS ≥ 20 o una riduzione del *total score* MADRS < 50% rispetto al *baseline*, erano eleggibili per la fase di trattamento con escitalopram. La dose iniziale di escitalopram era 10 mg/die e poteva essere aumentata fino ad un massimo di 30 mg/die in caso di risposta insoddisfacente. 190 pazienti hanno completato il trattamento con venlafaxina, 83 hanno iniziato la fase di trattamento con escitalopram e 79 hanno completato il trattamento con escitalopram.

I polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) da genotipizzare sono stati selezionati in base ai seguenti criteri: 1) frequenza dell'allele minore pari ad almeno il 5% nella popolazione caucasica; 2) selezione di tag SNP ($R^2 \geq 0.8$); 3) posizione all'interno dei geni candidati selezionati; e 4) disponibilità di un assay validato nel laboratorio. L'effetto dei singoli SNP sul fenotipo è stato valutato utilizzando un modello di regressione logistica. Trattandosi di uno studio di replicazione, gli autori hanno considerato significativo un *p* value < 0.05. Inoltre, è stata condotta un'analisi di *pathway* nel dataset *genome-wide* dello studio STAR*D, includendo tutti i geni per i quali uno o più SNP sono risultati significativamente associati con la risposta agli antidepressivi nel presente studio.

Lo *score* MADRS al *baseline* è risultato associato con la risposta e la remissione dopo trattamento con venlafaxina, oltre che alla non-remissione dopo trattamento con escitalopram; il rischio suicidario è risultato associato con la non-remissione dopo trattamento con escitalopram. Pertanto, queste variabili sono state incluse nelle analisi come covariate.

L'allele G dello SNP rs7603001 (*ZNF804A*) e il genotipo AA dello SNP rs2254137 (*CREB1*) sono risultati associati con la risposta e con la remissione, rispettivamente. Gli SNP rs10489407 (*PLA2G4A*) e rs11030104 (*BDNF*) sono risultati associati con la risposta nella direzione opposta a quella attesa. Lo SNP rs7603001

(*ZNF804A*) è risultato associato anche con il miglioramento dei sintomi nel tempo. Nessuna delle associazioni sarebbe risultata significativa in caso di correzione per test multipli.

Tra gli SNP selezionati dagli autori (non associati con la risposta agli antidepressivi da studi precedenti), rs6928 (*MAPK1*) è risultato associato con la remissione ($p = 0.0006$), e gli SNP rs17288723 (*HTR2A*) e rs10737276 (*PLA2G4A*) sono risultati associati con il miglioramento dei sintomi durante il trattamento con venlafaxina ($p = 0.00011$ e $p = 0.00044$, rispettivamente).

L'analisi condotta nel dataset dello studio STAR*D ha riscontrato un'associazione con la risposta con significatività solo nominale ($p = 0.017$) per la *pathway* "processazione delle proteine nel reticolo endoplasmatico".

I limiti dello studio comprendono la dimensione del campione relativamente ridotta, il numero limitato di associazioni sopravvissute alla correzione per test multipli e il disegno dello studio (valutazione del ruolo di singoli geni candidati).

In conclusione, lo studio ha replicato l'associazione dello SNP rs7603001 (*ZNF804A*) con la risposta agli antidepressivi e dello SNP rs2254137 (*CREB1*) con la remissione. Inoltre, lo SNP rs6928 (*MAPK1*) è risultato associato con la remissione nonostante studi precedenti non avessero riscontrato questa associazione.

Parole chiave: antidepressivi, disturbo depressivo maggiore, *ZNF804A*, *CREB1*, *MAPK1*

Riferimento bibliografico

[Fabbri C](#) et al. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2017 Mar 4 [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 Allegra (Università di Torino)
- Dott.ssa Sarah Cargin (Università del Piemonte Orientale)
- Dott.ssa Donatella Carretta (Università di Bologna)
- Dott.ssa Valeria Conti (Università di Salerno)
- Dott.ssa Raffaella Franco (Università di Trieste)
- Dott.ssa Lucia Gozzo (Università di Catania)
- Dott.ssa Claudia Pisanu (Università di Cagliari)
- Dott.ssa Gloria Ravegnini (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

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.
