



## SIF - FARMACOGENETICA



### Newsletter Numero 116 – Aprile 2019

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

#### Sommario

##### **Infettivologia**

- Analisi di farmacocinetica di popolazione che mostra l'influenza di un polimorfismo del gene arilacetammide deacetylase (AADAC) e dell'infezione da HIV sull'esposizione della rifa-pentina

##### **Neuropsichiatria**

- Varianti farmacogenomiche e interazioni tra xenobiotici identificate tramite l'analisi genetica del metabolismo della clozapina

##### **Gastroenterologia**

- Studio di associazione tra le varianti genetiche di NUDT15 e la mielosoppressione indotta da tiopurine in pazienti con malattie infiammatorie croniche intestinali

##### **Cardiovascolare**

- Dosaggio del warfarin in pazienti con trombosi severa o trombofilia

##### **La metanalisi del mese**

- Impatto di polimorfismi a carico di geni implicati nella regolazione della metilazione del DNA sulla prognosi di pazienti affetti da carcinoma metastatico al colon-retto: una meta-analisi degli studi clinici randomizzati in aperto TRIBE, MAVERICC e FIRE-3

#### **INFETTIVOLOGIA**

**ANALISI DI FARMACOCINETICA DI POPOLAZIONE CHE MOSTRA L'INFLUENZA DI UN POLIMORFISMO DEL GENE ARILACETAMMIDE DEACETYLAASE (AADAC) E DELL'INFEZIONE DA HIV SULL'ESPOSIZIONE DELLA RIFAPENTINA**

*A cura della Dott.ssa Sarah Allegra*

Le rifamicine svolgono un ruolo chiave nel trattamento multiresistente della tubercolosi e la loro attività è esposizione dipendente. La rifapentina è stata approvata dalla Food and Drug Administration nel 1998 per il trattamento della tubercolosi polmonare. La sua farmacocinetica è influenzata dall'età, dal peso, dal tipo di dosaggio, dall'infezione da HIV e dal sesso. La rifapentina viene assorbita meno rapidamente rispetto alla rifampicina, raggiungendo il picco di concentrazione plasmatica entro 5 ore; l'emivita osservata è di 12 ore. L'entità dell'assorbimento della rifapentina aumenta dal 33% all'86% quando somministrata insieme ai pasti. Essa rappresenta un'alternativa alla rifampicina ed è sempre più utilizzata per il trattamento della tubercolosi attiva e delle infezioni latenti. Tuttavia, vi è una marcata variabilità interpaziente nella sua farmacocinetica. La rifapentina viene metabolizzata principalmente mediante deacetilazione, a carico dall'arilacetamide umana deacetilasi (AADAC), e idrolisi non enzimatica. Il legame della rifapentina alle proteine è stimato intorno al 98% e, come altre rifamicine, induce il suo stesso metabolismo.

Dati precedentemente pubblicati indicano che polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) nel *trasportatore di anioni organici 1B1 (SLCO1B1)*, che codifica per il recettore transmembrana OATP1B1, influenzano le concentrazioni di rifampicina. Il polimorfismo *SLCO1B1* rs4149032 C>T, presente nel 70% dei sudafricani con tubercolosi che vivono a Città del Capo, è stato associato ad una riduzione del 20% e del 28% della biodisponibilità della rifampicina in eterozigoti e omozigoti, rispettivamente. Le rifamicine sono anche substrati della glicoproteina-P, codificata dal gene polimorfico *ABCB1*. Le esposizioni umane alla rifamicina sono anche modulate dal recettore X per il pregnano (PXR) e dai recettori nucleari costitutivi per l'androstano (CAR). Poiché lo sviluppo della resistenza alle rifamicine e i loro effetti battericidi sono correlati alle concentrazioni di farmaco, gli SNPs che influenzano l'esposizione alla rifamicina possono essere di importanza terapeutica. Poco si conosce ad oggi sulla relazione farmacogenetica-farmacocinetica della rifapentina, che può potenzialmente aiutare a individuare la dose ottimale di farmaco. Pertanto, lo scopo di questo studio era di determinare l'effetto dei polimorfismi dei geni *SLCO1B1*, *PXR*, *CAR* e *AADAC* sulla farmacocinetica della rifapentina.

L'analisi è stata eseguita su pazienti con diagnosi di tubercolosi polmonare arruolati in due studi diversi: RIFAQUIN e Daily RPE. Nello studio RIFAQUIN, ai pazienti sono stati somministrati moxifloxacina, rifampicina, pirazinamide ed etambutolo per 2 mesi e 1.200 mg di rifapentina nei successivi 4 mesi, una volta alla settimana insieme a 400 mg di moxifloxacina o 2 mesi di 400 mg di moxifloxacina due volte a settimana con 900 mg di rifapentina. Lo studio è stato condotto nella provincia del Capo Occidentale e nel Gauteng (Sud Africa) e ad Harare (Zimbabwe). Le dosi di rifapentina e moxifloxacina sono state assunte con 240 mL di acqua 15 minuti dopo un pasto leggero di 2 uova sode con pane. Durante il 4° mese di trattamento, sono stati prelevati campioni di sangue per la determinazione delle concentrazioni di rifapentina nel plasma.

Nello studio Daily RPE, i pazienti con tubercolosi polmonare sono stati trattati con 450 o 600 mg di rifapentina al giorno, che hanno sostituito 600 mg di rifampicina durante la fase intensiva della terapia standard. I partecipanti allo studio sono stati reclutati nella provincia del Capo Occidentale (Sudafrica). Ai pazienti è stato consigliato di assumere la dose di rifapentina richiesta con il cibo, ma durante lo studio non è stato fornito alcun pasto standardizzato e non sono stati registrati dettagli accurati sull'assunzione di cibo con la dose. Il campionamento farmacocinetico è stato eseguito circa 1 mese dopo l'inizio della terapia.

Le concentrazioni plasmatiche di rifapentina sono state determinate con metodica LC-MS/MS. Il DNA genomico è stato estratto da sangue intero utilizzando il QIAamp DNA minikit (Qiagen, Inc., Valencia, CA). Il DNA è stato quantificato utilizzando uno spettrofotometro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE). La genotipizzazione è stata eseguita mediante PCR real-time su un sistema DNA Engine Chromo4 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). I polimorfismi studiati sono: *SLCO1B1* rs2306283, *SLCO1B1* rs4149032, *NR1I2* rs2472677, *NR1I2* rs1523130 e *AADAC* rs1803155 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

I dati relativi alla concentrazione plasmatica di rifapentina sono stati analizzati utilizzando un modello di effetti misti non lineari implementato nel software NONMEM (versione 7.4.2). L'analisi statistica è stata eseguita con il software R. La stima dei parametri farmacocinetici tipici della popolazione, insieme alla loro variabilità interindividuale casuale e variabilità interocasionale, è stata eseguita utilizzando un metodo di

stima condizionale di primo ordine con l'interazione  $\epsilon$ - $\eta$  (FOCE INTER). È stata ipotizzata una distribuzione normale per IIV e IOV ed è stato valutato un modello combinato additivo e proporzionale per la *residual unexplained variability*. L'influenza dei polimorfismi genetici sulla farmacocinetica del rifapentina per i pazienti con un genotipo sconosciuto è stata identificata mediante *mixture model*. L'effetto del genotipo è stato testato per la prima volta utilizzando il metodo EXTRA, che non solo stima l'associazione per pazienti con informazioni genetiche disponibili, ma stima anche un ulteriore effetto covariata per i pazienti con genotipo sconosciuto. Successivamente, è stato applicato il metodo MIX per imputare valori usando il *mixture model*, per includere il paziente con genotipo sconosciuto. La selezione del modello si basava sui cambiamenti nel valore della funzione NONMEM ( $\Delta$ OFV) e sull'ispezione visiva dei *conditional weighted residuals* in funzione del tempo, dei controlli predittivi visivi e dei grafici di base *goodness-of-fit*. I parametri del modello finale sono stati valutati per la loro precisione utilizzando il metodo di campionamento *sampling importance resampling*.

Il ridimensionamento allometrico è stato applicato alla clearance e al volume di distribuzione per adattarsi all'effetto della dimensione corporea. La massa magra e la massa grassa sono state testate come predittori delle dimensioni.

Nello studio sono stati inclusi 326 pazienti. Il peso corporeo medio e l'età media dei partecipanti allo studio erano rispettivamente di 56 Kg e 32 anni. Solo per 162 pazienti erano disponibili dati di farmacogenetica. Le varianti *SLCO1B1* rs2306283 e *AADAC* rs1803155 sono state trovate nell'82% dei pazienti, mentre *NR1I2* rs2472677 e *NR1I2* rs1523130 avevano una frequenza del 33,5% e del 16,4%, rispettivamente. La frequenza allelica della variante *SLCO1B1* rs4149032 è risultata pari a 0,75.

I pazienti omozigoti AA per il polimorfismo rs1803155 hanno riscontrato una clearance inferiore del 10,4%, rispetto ai soggetti che erano rs1803155 GG o GA ( $\Delta$ OFV, 6,2; P = 0,013).

I pazienti con infezione da HIV hanno mostrato una biodisponibilità inferiore del 21,9% ( $\Delta$ OFV, 42; P <0,001). I pazienti trattati con alte dosi di rifapentina (1.200 mg) tendevano ad avere una clearance ridotta del 13,2%, rispetto agli altri pazienti ( $\Delta$ OFV, 17; P <0,001). La biodisponibilità di rifapentina nello studio Daily RPE era inferiore del 23,3%, rispetto al RIFAQUIN ( $\Delta$ OFV, 59; P <0,001).

Questo studio è stato il primo a studiare l'influenza della farmacogenetica sulla farmacocinetica della rifapentina. Gli autori hanno dimostrato che il genotipo AA del gene *AADAC* rs1803155 è associato ad un aumento dell'esposizione al farmaco, in linea con quanto riportato in studi precedenti (Shimizu M et al *Drug Metab Dispos* 2012, 40:1183–90). Inoltre, hanno osservato che i pazienti con infezione da HIV hanno una biodisponibilità di rifapentina inferiore; questo risultato è coerente con gli studi precedenti, ma richiede ulteriori indagini per valutare se le strategie di aggiustamento della dose debbano essere considerate.

I pazienti nel gruppo con dosi più alte mostravano un aumento dell'esposizione, contrariamente ai risultati di Savic et al., che descrivevano una diminuzione della biodisponibilità di rifapentina all'aumento della dose (Savic RM et al *Antimicrob Agents Chemother* 2014, 58:3035–42). La ridotta frequenza di dosaggio in questo gruppo può aver portato ad una riduzione dell'induzione automatica e, quindi, a un aumento dell'esposizione.

Studi precedenti hanno dimostrato che l'esposizione alle rifamicine è ridotta nei maschi a causa di un rapporto massa magra / peso corporeo più alto. Nella presente analisi non è stato osservato alcun effetto del sesso. Per quanto riguarda la differenza osservata tra i due studi nella biodisponibilità, potrebbe essere dovuta a differenze nella concomitante assunzione di rifapentina e cibo. L'assorbimento del farmaco è infatti fortemente potenziato quando viene somministrato con il cibo. La scoperta secondo cui lo studio Daily RPE ha una biodisponibilità inferiore può derivare dal fatto che i pasti non sono stati standardizzati, al contrario, nello studio RIFAQUIN è stato fornito un pasto standard durante lo studio.

I risultati ottenuti necessitano di conferme in casistiche più ampie, eliminando le differenze nel modello alimentare tra i gruppi.

Il genotipo AA del polimorfismo AADAC rs1803155 è associato ad un aumento dell'esposizione a rifapentina.

**Parole chiave:** tubercolosi, rifapentina, AADAC

#### Riferimento bibliografico

Francis J et al. *Antimicrob Agents Chemother* 2019, 63(4)

## NEUROPSICHIATRIA

### VARIANTI FARMACOGENOMICHE E INTERAZIONI TRA XENOBIOTICI IDENTIFICATE TRAMITE L'ANALISI GENETICA DEL METABOLISMO DELLA CLOZAPINA

A cura della Dott.ssa Claudia Pisanu

La schizofrenia è un disturbo psichiatrico severo caratterizzato da un importante impatto sulla qualità e sulla durata della vita. Circa un terzo dei pazienti presenta una diagnosi di schizofrenia resistente al trattamento, una forma del disturbo nella quale i sintomi non migliorano dopo trattamento adeguato con due antipsicotici di prima linea. La clozapina è l'unico antipsicotico che presenta l'indicazione per la schizofrenia resistente al trattamento. Tuttavia, il suo utilizzo è limitato da effetti avversi potenzialmente severi, che impongono la necessità di un monitoraggio dei livelli ematici del farmaco. Si osserva un'ampia variabilità interindividuale nelle concentrazioni ematiche di clozapina a parità di dosaggio, spesso come risultato dell'effetto di terapie concomitanti. Recentemente, alcuni studi hanno iniziato ad investigare l'effetto di alcuni marker genetici sulla variabilità interindividuale nel metabolismo della clozapina e nella risposta al farmaco. Tuttavia, la maggior parte degli studi ha utilizzato un approccio di geni candidati e ha incluso un numero limitato di pazienti. Gli autori hanno condotto il primo *genome-wide association study* (GWAS) dei livelli ematici di clozapina e dei suoi metaboliti, utilizzando dati relativi a 10000 misurazioni condotte su un campione di circa 3000 pazienti con schizofrenia resistente al trattamento.

I partecipanti sono stati reclutati tramite lo studio CLOZUK2, condotto nel Regno Unito. I partecipanti di origine europea sono stati selezionati utilizzando un pannello di *ancestry-informative markers*. La genotipizzazione è stata effettuata dal consorzio deCODE Genetics utilizzando chip Illumina HumanOmniExpress-12. I livelli ematici di clozapina e del suo metabolita norclozapina sono stati misurati tramite cromatografia liquida-spettrometria di massa. Sono stati analizzati i dati di 10353 misurazioni di 2989 pazienti (range: 1-42 misurazioni per partecipante). Le diverse misurazioni relative a un singolo paziente sono state combinate in un singolo fenotipo tramite un *random-effects model*, correggendo per l'effetto di predittori noti del metabolismo della clozapina (età, dosaggio, tempo trascorso tra assunzione del farmaco e misurazione dei livelli ematici). In questo modo sono stati calcolati i coefficienti corrispondenti alla variazione dei livelli ematici del farmaco, indipendentemente dall'effetto dei fattori confondenti. I coefficienti relativi ai livelli ematici di clozapina, norclozapina e al rapporto clozapina/norclozapina sono stati utilizzati come *outcome* principali del GWAS. Poiché gli autori non avevano a disposizione informazione relative ad altri fattori che influenzano i livelli ematici di clozapina, quali peso corporeo o fumo di sigaretta, il modello ha incluso dei *polygenic risk score* (PRS) modellati su questi tratti come proxy per queste variabili. Gli autori hanno inoltre utilizzato il software gwas-pw per identificare quali marker genetici associati ai livelli ematici di clozapina o norclozapina fossero anche associati ai livelli ematici di altri metaboliti nello studio KORA/TWINSUK.

Il GWAS avente come *outcome* i livelli di clozapina ha individuato un polimorfismo a singolo nucleotide (SNP) con significatività *genome-wide*: rs2472297, una variante intergenica localizzata tra i geni *CYP1A1* e

*CYP1A2*. Nello specifico, l'allele minore di questa variante è stato associato con una riduzione dei livelli ematici di clozapina (varianza spiegata: 1,47%). Questa variante era stata precedentemente associata con l'attività dell'enzima *CYP1A2* sulla base del suo effetto sui livelli dei metaboliti della caffeina.

Due locus sono stati associati con significatività *genome-wide* con i livelli ematici di norclozapina: rs72846859 (una variante intergenica localizzata in prossimità del gene *UGT2B10*) e rs2011425 (una variante missenso localizzata nel gene *UGT1A4*). Per entrambi gli SNP l'allele minore è risultato associato con una riduzione dei livelli ematici di norclozapina (varianza spiegata 2,32 e 1,15%, rispettivamente).

Il GWAS avente come *outcome* il rapporto clozapina/norclozapina ha individuato due loci associati con significatività *genome-wide*: un locus identificato dagli SNP rs10023464 e rs7668556, che include sette geni della famiglia *UGT2*, e un locus rappresentato dallo SNP rs12767583, localizzato nel gene *CYP2C19*.

L'analisi di co-localizzazione effettuata per capire se gli SNP implicati nella regolazione dei livelli ematici di clozapina fossero coinvolti anche nella regolazione dei livelli di altri metaboliti ha mostrato che il locus nel gene *CYP1A2*, rappresentato dallo SNP rs2472297, è risultato associato con i livelli di cinque xenobiotici e metaboliti: caffeina, teofillina, 7-metilxantina, paraxantina e Leu-Pro ciclopeptide. Tutti e cinque rappresentano dei potenziali biomarker di consumo di caffè.

Lo studio suggerisce che varianti di specifici geni della famiglia *CYP* e *UGT* influenzino la farmacocinetica della clozapina. Lo studio suggerisce inoltre che la caffeina potrebbe competere con la clozapina, causando livelli ematici del farmaco superiori nei forti bevitori di caffè. Tuttavia, dal momento che gli autori non avevano accesso a dati relativi al consumo di caffè per il proprio campione, non hanno potuto investigare il grado con il quale la caffeina potrebbe mediare o moderare le associazioni di tali varianti con i livelli ematici dei metaboliti della clozapina.

Le limitazioni principali dello studio includono la mancanza di dati relativi ad alcuni fattori che influenzano i livelli ematici di clozapina (quali peso corporeo e fumo di sigaretta) e la mancanza di informazioni relativamente alle terapie concomitanti, e in particolare ai farmaci che possono interagire con la clozapina.

Lo studio suggerisce un'associazione tra alcune varianti geniche localizzate in geni appartenenti alle famiglie *CYP* e *UGT* e i livelli ematici di clozapina e norclozapina nei pazienti affetti da schizofrenia resistente al trattamento.

**Parole chiave:** clozapina, schizofrenia, *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP2C19*, *UGT2B10*, *UGT1A4*

#### Riferimento bibliografico

Pardiñas AF et al. *Am J Psychiatry* 2019 Mar 29 [Epub ahead of print]

### GASTROENETROLOGIA

#### STUDIO DI ASSOCIAZIONE TRA LE VARIANTI GENETICHE DI *NUDT15* E LA MIELOSOPPRESSIONE INDOTTA DA TIOPURINE IN PAZIENTI CON MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI

A cura delle Dott.sse Giulia Zudeh e Raffaella Franca

Le tiopurine (come l'azatioprina e la mercaptopurina) sono immunomodulatori comunemente utilizzati nel trattamento delle malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI). Circa il 15% dei pazienti trattati sviluppa reazioni avverse legate a questi farmaci, con conseguente riduzione del loro dosaggio o in certi casi sospensione del trattamento. La mielosoppressione indotta da tiopurine (TIM) avviene in circa il 7% dei pazienti trattati e si sviluppa entro poche settimane dall'inizio della cura. Essa può portare all'insorgenza di infezioni opportuniste, in certi casi anche letali (1%).

Una delle cause della TIM è la presenza di varianti nel gene codificante per l'enzima tiopurina-metiltransferasi (TPMT), che ne riducono l'attività, con conseguente accumulo di metaboliti attivi del farmaco tali da indurre mielotossicità. Di conseguenza tutti i pazienti a cui vengono somministrate le tiopurine devono essere genotipizzati per *TPMT* prima dell'inizio del trattamento farmacologico, in modo da adeguare il dosaggio in coloro che presentano delle varianti in questo enzima. Siccome la presenza di varianti geniche in *TPMT* è riscontrabile in soltanto il 25% dei pazienti europei presentanti la TIM, si deduce che altre varianti geniche o ambientali contribuiscano all'insorgenza di questa condizione. Studi recenti hanno identificato la presenza di varianti nel gene per l'idrolasi nudix 15 (*NUDT15*) come fattore di rischio per la TIM nella popolazione asiatica orientale. *NUDT15* è una pirofosfatasi che idrolizza i metaboliti attivi delle tiopurine, inattivandoli. Moriyama e collaboratori hanno riscontrato la presenza della variante rs746071566 (che causa la delezione p.Gly17\_Val18del) di *NUDT15* nella popolazione asiatica orientale ed hanno identificato la sua presenza anche in un paziente pediatrico europeo affetto da TIM. Al giorno d'oggi, però non ci sono studi che valutano la presenza di varianti di *NUDT15* nelle popolazioni caucasiche. Gli autori di questo lavoro hanno quindi deciso di svolgere uno studio mirato a valutare l'effetto di numerose varianti, tra quelle di *NUDT15*, negli europei.

Questo studio caso-controllo di associazione è stato condotto in modo retrospettivo: le varianti geniche per lo studio di associazione *genome-wide* (GWAS) sono state analizzate mediante Illumina Infinium G4L, mentre quelle per lo studio di associazione dell'esoma (EWAS) mediante l'impiego della piattaforma Illumina HiSeq e le reads ottenute sono state successivamente mappate sul genoma umano versione 37 tramite l'algoritmo Burrows-Wheeler Alignment MEM. Sono stati reclutati 1077 pazienti affetti da MICI (602 di questi pazienti presentavano morbo di Crohn, 457 colite ulcerosa e 18 altri tipi di MICI, età mediana alla diagnosi 31 anni) arruolati tra marzo 2012 e novembre 2015 in 82 centri del Regno Unito e 7 centri non britannici. Alcuni pazienti sono stati esclusi dagli studi sulla base di un *genetic quality* control oppure a causa di problemi nella genotipizzazione. In particolare allo studio GWAS hanno preso parte 919 pazienti (470 femmine e 449 maschi) di cui 311 affetti da TIM e 608 non presentanti questo effetto collaterale, mentre nello studio EWAS sono stati inclusi 961 pazienti, di cui 328 affetti da TIM e 633 senza mielodepressione (491 femmine e 470 maschi). Come coorte di replicazione dello studio sono stati valutati 840 pazienti non mielodepressi e 73 affetti da TIM arruolati in 5 centri e presentanti le stesse caratteristiche della coorte di studio. Come criteri d'inclusione nello studio sono stati presi in considerazione i seguenti parametri: la diagnosi di MICI, l'esposizione a tiopurine nei 7 giorni precedenti alla comparsa della TIM, la quantità di neutrofili (tra  $2.5 \times 10^9/L$  e  $1.0 \times 10^9/L$  o meno). Sia le associazioni GWAS che EWAS sono state analizzate mediante test esatto di Fisher e PLINK versione 1.9 con il test di associazione kernel. I grafici Manhattan sono stati generati utilizzando il programma R in cui il limite di significatività è stato impostato a  $P < 5 \times 10^{-8}$ .

Dalle analisi condotte, non sono emerse differenze tra le caratteristiche demografiche del paziente (sesso) o il tipo di MICI e l'insorgenza della TIM. È stato inoltre visto che tra i pazienti che presentavano questo effetto avverso, l'insorgenza di TIM avveniva precocemente (entro le prime 8 settimane di trattamento) nel 36% dei casi. Dall'analisi GWAS è emersa come significativa la correlazione tra la variante di *TPMT* rs11969064 (causante la transizione C>T) e la TIM: 30,5% dei pazienti affetti da TIM presentava questa variante contro il 16,4% dei non mielodepressi (OR: 2,3 [95% CI, 1,7 to 3,1],  $P = 5,2 \times 10^{-9}$ ); inoltre nei casi di TIM l'associazione è risultata particolarmente importante in coloro che hanno avuto una TIM ad insorgenza precoce (meno di 8 settimane dall'inizio del trattamento; OR: 4,0 [95% CI, 2,8 to 5,8],  $P = 1,8 \times 10^{-15}$ ). L'analisi EWAS ha rilevato come significativa l'associazione di *NUDT15* rs746071566 (p.Gly17\_Val18del) con la TIM; la variante era presente nel 5,8% dei pazienti mielodepressi e nel 0,2% dei pazienti privi di questo effetto avverso (OR: 38,2 [95% CI: 5,1 to 286,1],  $P = 1,3 \times 10^{-8}$ ). Anche in questo caso, i pazienti con insorgenza precoce di TIM presentavano un rischio maggiore (OR: 3,6 [95% CI, 1,4 to 9,2],  $P = ,005$ ). Questo polimorfismo è risultato significativamente associato alla TIM anche nella coorte di replicazione (2,7% degli affetti e 0,2% dei non affetti; OR: 11,8 [95% CI: 1,6 to 85,0],  $P = ,03$ ). L'analisi EWAS ha rilevato significativa anche l'associazione tra la variante *missense* codificata dallo SNP *TPMT* rs1800460 e l'insorgenza della TIM (OR: 3,0 [95% CI: 2,0 to 4,3],  $P = 2,0 \times 10^{-8}$ ). Comparando genotipi e fenotipi è emerso che il tempo medio per la comparsa della TIM nei pazienti portatori delle varianti di *NUDT15* è minore rispetto ai pazienti senza

varianti (7,7 settimane [range interquartile IQR 5,7-20,0 settimane] vs 20,0 settimane [IQR, 7,6-48,3 settimane], rispettivamente;  $P = ,009$ ). Ciò vale anche per i pazienti portatori di almeno 2 varianti in *TPMT* rispetto ai soggetti privi di varianti (6,1 settimane [IQR, 4,2-7 settimane] vs 20,0 settimane [IQR, 7,6-48,3 settimane], rispettivamente;  $P = ,002$ ). Inoltre il tempo medio d'insorgenza della TIM è risultato minore in pazienti presentanti varianti in entrambi i geni *NUDT15* e *TPMT* comparati a pazienti senza varianti (2,5 settimane [IQR, 1,5-4,1 settimane] vs 20,0 settimane [IQR, 7,6-48,3 settimane], rispettivamente,  $P < ,001$ ). Inoltre i pazienti presentanti delle varianti in uno dei geni citati presentano meno neutrofili rispetto a pazienti privi di varianti ( $0,8 \times 10^9/L$  [IQR,  $0,4-1,1 \times 10^9/L$ ] vs  $1,0 \times 10^9/L$  [IQR,  $0,7-1,2 \times 10^9/L$ ], rispettivamente  $P < 0,001$ ).

All'interno della popolazione europea analizzata in questo studio la presenza di varianti in *NUDT15* è minore rispetto a quella riscontrata in *TPMT*. La presenza di varianti all'interno di questi geni è associata a TIM, la quale risulta essere più severa in soggetti con varianti sia in *TPMT* che in *NUDT15*.

**Parole chiave:** NUDT15, MICI, tiopurine, europei, varianti, mielosoppressione

#### Riferimento bibliografico

Walker GJ et al. *JAMA* 2019, 321(8): 773-85.

## CARDIOVASCOLARE

### DOSAGGIO DEL WARFARIN IN PAZIENTI CON TROMBOSI SEVERA O TROMBOFILIA

A cura della Dott.ssa Lucia Gozzo

Gli antagonisti della vitamina K (AVK) alterano la sintesi dei fattori della coagulazione (II, VII, IX e X) inibendo il complesso della vitamina K epossido-riduttasi (VKOR). La dose media del warfarin per tutte le indicazioni è approssimativamente di 5 mg/die, ma diversi fattori, inclusa la presenza di determinate varianti genetiche, influenzano la scelta del dosaggio (Holbrook AM et al. *Arch Intern Med* 2005,165:1095-106; Nathisuwan S et al. *Chest* 2011,139:1130-9). Per raggiungere un livello efficiente e sicuro di anticoagulazione il dosaggio deve essere, inoltre, aggiustato individualmente con ripetuti e regolari *follow-up* dei valori di INR, ed è pratica comune quella di iniziare con una dose fissa del farmaco da aggiustare a seguito del monitoraggio. Questo approccio può rallentare il raggiungimento del target terapeutico in pazienti che richiedono dosaggi estremi, pertanto l'uso di algoritmi in grado di predire la dose richiesta possono facilitare la gestione della terapia (Kimmel SE et al. *N Engl J Med* 2013,369:2283-93). Molti algoritmi comprendono la valutazione delle varianti genetiche coinvolte nella risposta al warfarin, in particolare dei geni *CYP2C9* e *VKORC1* (International Warfarin Pharmacogenetics Consortium et al. *N Engl J Med* 2009,360:753-64; Daly AK et al. *Br J Clin Pharmacol* 2002,53:408-9; Wadelius M et al. *Blood* 2009,113:784-92; Owen RP et al. *Pharmacogenet Genomics* 2010,20:642-4; Rieder MJ et al. *N Engl J Med* 2005,352:2285-93; Solus JF et al. *Pharmacogenomics* 2004,5:895-931; Gage BF et al. *Clin Pharmacol Ther* 2008,84:326-31).

Scopo di questo studio è stato quello di valutare l'accuratezza delle stime del dosaggio di warfarin effettuate grazie ad algoritmi e test genetici in pazienti con storia di trombosi severa e/o trombofilia.

Lo studio è stato condotto retrospettivamente su pazienti affetti da trombosi severa e/o trombofilia trattati a lungo termine con warfarin e seguiti dal 2009 al 2018 presso l'Ospedale Universitario di Helsinki. La genotipizzazione dei polimorfismi coinvolti nella risposta al warfarin è stata eseguita come esame di *routine* nei pazienti da sottoporre a trattamento prolungato con il farmaco. Sono stati inclusi pazienti con almeno

uno dei seguenti criteri: trombosi in giovane età (< 50 anni), storia familiare di trombosi, diagnosi di trombofilia grave agli esami di screening, sito di trombosi inusuale, trombosi spontanee multiple o aborti, trombosi arteriosa e venosa, trombosi in presenza di neoplasia, sostituzione di valvola o altre patologie cardiache a rischio di trombosi. In totale 50 pazienti rispettavano almeno un criterio di inclusione, di cui 31 (62%) presentavano due o più criteri. L'età media era di 47 anni, con il 48% dei pazienti affetti da trombosi al di sotto dei 50 anni.

Nella maggior parte dei pazienti il target terapeutico era rappresentato da un valore di INR pari a 2-3, mentre per i tre pazienti con sostituzione valvolare (6%) il target era 2.5-3.5. I pazienti sono stati genotipizzati per i polimorfismi del *CYP2C9* e *VKORC1* e la dose è stata stimata secondo l'algoritmo di *Wadelius et al.* (Wadelius M et al. *Hum Genet* 2007,121:23-34). Il 28% dei pazienti presentava i genotipi *CYP2C9*\*1/\*1 e *VKORC1* c.-1639GG, mentre il 40% era portatore del *CYP2C9*\*2, \*3 o di entrambi ed il 54% della variante c.-1639G>A del *VKORC1*.

Al controllo clinico, se il paziente presentava l'INR target con una dose stabile utilizzata per diverse settimane la dose veniva confermata. Nel caso in cui il target dell'INR non fosse stato raggiunto, la dose successiva veniva stabilita sulla base di una combinazione di fattori, compresi genotipo e valori di INR. Il paziente veniva monitorato finché non fosse stata raggiunta una dose stabile, confermata dopo diversi mesi di mantenimento. Successivamente, gli algoritmi *Gage* e *International Warfarin Pharmacogenetics Consortium* (IWPC) sono stati utilizzati per stimare la dose sulla base del genotipo e dei dati clinici, da confrontare con la dose raggiunta in *real-life*.

La dose stimata dagli algoritmi *Gage* e IWPC (valore medio di 5,4 e 5,2 mg rispettivamente) era significativamente più bassa rispetto a quella osservata in *real-life* (media 6,9 mg; p=0.005 e p=0.001 rispettivamente), in particolare nei pazienti con più di un criterio di inclusione a maggior rischio trombotico. La correlazione tra la dose realmente utilizzata e quella calcolata con i vari algoritmi era scarsa.

In questo studio, gli algoritmi *Gage* e IWPC hanno sottostimato la dose reale utilizzata in pazienti giovani ad alto rischio trombotico. In studi precedenti su pazienti affetti da fibrillazione atriale la stima della dose tramite genotipizzazione ha consentito di raggiungere rapidamente livelli terapeutici di warfarin, con riduzione del rischio di sanguinamento rispetto al dosaggio convenzionale (*International Warfarin Pharmacogenetics Consortium et al. N Engl J Med* 2009,360:753-64; *Gage BF et al. JAMA* 2017,318:1115-24; *Tse G et al. Br J Clin Pharmacol* 2018,84:1868-82). I dati di questo studio sono in accordo con una recente metanalisi che riporta come in caso di utilizzo di dosi di warfarin sopra i 7 mg/die la dose di mantenimento viene sottostimata dagli algoritmi predittivi (*Saffian SM et al. Clin Pharmacol Ther* 2017,102:297-304).

In conclusione, gli algoritmi predittivi più utilizzati, che includono varianti farmacogenetiche, sottostimano la dose di warfarin ottimale per raggiungere il target terapeutico in pazienti giovani ad alto rischio trombotico.

Limiti dello studio sono rappresentati dal basso numero di pazienti arruolati e dal disegno in aperto. Pertanto i risultati dovranno essere confermati in una popolazione più ampia.

**Parole chiave:** trombosi, *CYP2C9*, *VKORC1*, warfarin

#### Riferimento bibliografico

Helin TA et al. *Br J Clin Pharmacol*. 2019 Apr 1 [Epub ahead of print]

## IMPATTO DI POLIMORFISMI A CARICO DI GENI IMPLICATI NELLA REGOLAZIONE DELLA METILAZIONE DEL DNA SULLA PROGNOSI DI PAZIENTI AFFETTI DA CARCINOMA METASTATICO AL COLON-RETTO: UNA META-ANALISI DEGLI STUDI CLINICI RANDOMIZZATI IN APERTO TRIBE, MAVERICC E FIRE-3

A cura della Dott.ssa Sarah Carginin

La metilazione del DNA costituisce l'alterazione epigenetica più studiata nel carcinoma al colon-retto (CRC) ed è riconosciuta essere uno dei principali meccanismi molecolari sottesi alla sua insorgenza. Nello specifico, è stato dimostrato come l'ipermetilazione del DNA, a livello delle isole CpG situate nel promotore, promuova l'insorgenza di CRC silenziando l'espressione di geni onco-soppressori. Inoltre, è emerso come in tale carcinoma l'ipometilazione globale del DNA risulti in un'aumentata instabilità genomica e nell'attivazione di geni proto-oncogeni. Nell'uomo, la metilazione del DNA si verifica principalmente a livello della posizione C-5 della citosina nel contesto di dinucleotidi CpG ed è effettuata ad opera degli enzimi DNA-metiltransferasi (DNMTs), deputati al trasferimento di un gruppo metilico dalla S-adenosil-L-metionina al residuo di citosina. È interessante sottolineare come sia stata evinta una correlazione tra polimorfismi del gene DNMT3A e un aumentato rischio di suscettibilità a CRC. Non di minore importanza nell'ambito dei meccanismi molecolari sottesi all'insorgenza di CRC è il ruolo svolto dalla famiglia di diossigenasi *ten-eleven translocation* (TET), enzimi noti per svolgere un ruolo chiave nella demetilazione del DNA. In tale contesto, evidenze di letteratura suggeriscono una downregolazione degli enzimi TET1, TET2 e TET3 nel CRC. Alla luce di tali evidenze, l'obiettivo del presente lavoro è stato quello di valutare se alcuni polimorfismi a carico di geni coinvolti nei meccanismi di metilazione (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, MDM2) e di demetilazione (MBD4, TET1, TET2, TET3, IDH1, IDH2) possano essere predittivi della risposta tumorale e della sopravvivenza di pazienti affetti da CRC in trattamento con diversi regimi chemioterapici antitumorali. A tale scopo, è stata condotta una meta-analisi di dati di associazione farmacogenetica di 3 coorti di pazienti affetti da CRC metastatico e arruolati in 3 differenti trials clinici randomizzati (TRIBE, MAVERICC e FIRE-3), eterogenei tra loro in termini di caratteristiche cliniche dei pazienti e trattamenti antitumorali utilizzati.

Per il presente studio di meta-analisi sono stati inclusi un totale di 884 pazienti affetti da CRC metastatico arruolati in 3 differenti trials clinici randomizzati (TRIBE: N=324, MAVERICC: N=324; FIRE3: N=236). Nello specifico, nello studio TRIBE i pazienti sono stati randomizzati al trattamento con FOLFIRI + bevacizumab o FOLFOXIRI + bevacizumab. Nello studio MAVERICC i pazienti hanno ricevuto FOLFIRI + bevacizumab o mFOLFOX6 + bevacizumab, mentre nel trial FIRE-3 sono stati trattati con FOLFIRI + bevacizumab o FOLFIRI + cetuximab. Per ciascun paziente è stato raccolto un campione di sangue intero da cui è stato estratto il DNA germinale tramite kit QIAmp DNA easy kit (Qiagen, Valencia). Il DNA è stato genotipizzato mediante OncoArray di Illumina (San Diego, CA, USA). Dei 530000 SNP analizzati, ne sono stati selezionati 14 da includere nell'analisi farmacogenetica sulla base di tali motivazioni: i) polimorfismi a carico di geni coinvolti nella metilazione (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, MDM2) o demetilazione (MBD4, TET1, TET2, TET3, IDH1, IDH2); ii) frequenza dell'allele minore  $\geq 10\%$  nei Caucasici; iii) potenziale ruolo funzionale del polimorfismo riportato in databases pubblicamente accessibili. Per ciascuna coorte di pazienti, è stata condotta una regressione di Cox per stimare la correlazione tra gli SNPs in studio e la sopravvivenza (HR, 95% IC), espressa come sopravvivenza globale (OS) o sopravvivenza libera da progressione di malattia (PFS). L'associazione tra i polimorfismi in studio e la risposta tumorale è stata valutata, sulla base dei criteri RECIST (*Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*), mediante regressione logistica multivariata (OR, 95% IC). Il modello genetico utilizzato in entrambe le analisi di associazione è stato quello additivo. Al fine di combinare i risultati di associazione farmacogenetica ottenuti nelle 3 coorti di pazienti è stata condotta una meta-analisi ad effetti fissi. L'eventuale presenza di eterogeneità tra le coorti in studio è stata stimata tramite test Q di Cochran. È stata, inoltre, applicata la False Discovery Rate (FDR) come correzione per test multipli.

Degli 884 pazienti inclusi nella presente meta-analisi, 571 (64.6%) erano di sesso maschile e presentavano un follow-up medio di 48.9 mesi. Le tre coorti di pazienti sono risultate differire tra loro in termini di sesso,

età, scala ECOG, sito del tumore primario, numero di metastasi, resezione del tumore primario e status di RAS. Dall'analisi di associazione effettuata in ciascuna singola coorte si è evinta un'associazione nominale tra OS e: i) DNMT3A rs11681717 nel braccio FOLFIRI + bevacizumab del trial TRIBE (P=0.001); ii) DNMT3B rs2424932 nel braccio FOLFOXIRI + bevacizumab del trial TRIBE (P=0.049). Inoltre DNMT3A rs2276598 e MDM2 rs2870820 sono risultate essere correlate a PFS, rispettivamente, nel braccio FOLFIRI + bevacizumab (P=0.021) e FOLFOXIRI + bevacizumab (P=0.023) del trial TRIBE. Infine, DNMT1 rs2228611, DNMT3A rs11681717 e DNMT3A rs2276598 sono risultate essere predittive della risposta tumorale, rispettivamente, nel braccio FOLFOX6 + bevacizumab del trial MAVERICC (P=0.01), FOLFIRI + cetuximab del trial FIRE3 (P=0.037) e FOLFOXIRI + bevacizumab del trial TRIBE (P=0.012). Dalla meta-analisi delle 3 coorti in studio è, invece, emersa una correlazione tra DNMT3A rs11681717 ed una ridotta sopravvivenza espressa come OS (HR 1.26, 95% IC 1.08-1.46, P=0.002,  $P_{FDR}=0.016$ ). Due polimorfismi, TET1 rs3814177 e IDH1 rs1437410, sono risultati essere predittivi di una peggiore PFS ad un livello di significatività statistica borderline (rispettivamente, HR 1.14, 95% IC 1.01-1.30, P=0.041,  $P_{FDR}=0.14$ ; HR 1.15, 95% IC 1.01-1.31, P=0.034,  $P_{FDR}=0.14$ ). Infine, le due varianti TET1 rs3814177 e TET3 rs7560658 sono emerse essere correlate alla risposta tumorale (OR 0.76, 95% IC 0.59-0.96, P=0.025,  $P_{FDR}=0.087$ ; OR 1.44, 95% IC 1.10-1.89, P=0.009,  $P_{FDR}=0.062$ ).

Nel presente studio, per la prima volta in letteratura, è stata testata la correlazione tra varianti in geni implicati nei meccanismi di metilazione e demetilazione del DNA e la prognosi di un'ampia coorte di pazienti affetti da CRC metastatico. Nello specifico, la variante DNMT3A rs11681717 è risultata essere predittiva di una OS peggiore. In tale contesto è interessante sottolineare come l'espressione di tale gene sia nota essere un fattore predittivo indipendente di una scarsa prognosi anche in pazienti affetti da carcinoma gastrico o polmonare. Inoltre, le due varianti TET1 rs3814177 e TET3 rs7560658 sono risultate essere correlate, rispettivamente, ad una migliore e peggiore risposta tumorale ai trattamenti chemioterapici. A supporto di tale risultato si pone l'evidenza che l'espressione di TET1 sia nota per essere un evento chiave iniziale della trasformazione cellulare e che sia implicata nella crescita del tumore al colon in quanto risultante in un'attivazione del *pathway* Wnt. Nonostante i risultati ivi riscontrati siano incoraggianti, si rende necessario interpretarli alla luce di alcune limitazioni: i) la dimensione campionaria su cui sono state calcolate le stime meta-analitiche è modesta: è quindi possibile che siano stati ottenuti risultati di associazione falsi positivi o falsi negativi; ii) dalla meta-analisi è emersa forte eterogeneità tra le corti in studio: i 3 trials clinici differiscono molto tra loro in termini di caratteristiche cliniche dei pazienti arruolati e di trattamenti farmacologici somministrati; iii) i pazienti arruolati nei diversi trial erano di origine Caucasica: la validità dei dati di associazione farmacogenetica ivi ottenuti non può quindi essere estesa ad etnie differenti. Alla luce di ciò, i risultati ottenuti nel presente studio non possono essere considerati conclusivi. Ulteriori studi, di idonea dimensione campionaria, si rendono quindi utili al fine di validare le associazioni farmacogenetiche ivi riscontrate.

Le varianti DNMT3A rs11681717, TET1 rs3814177 e TET3 rs7560658 sono risultate essere predittive della prognosi di pazienti affetti da carcinoma al colon-retto metastatico trattato con differenti regimi chemioterapici antitumorali.

**Parole chiave:** carcinoma al colon-retto metastatico, DNMT3A, TET1, TET3, chemioterapici antitumorali

#### Riferimento bibliografico

[Puccini A](#) et al. *Eur J Cancer* 2019, 111:138-47



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 Carginin (Università del Piemonte Orientale) Dott.ssa Raffaella Franca (Università di Trieste) Dott.ssa Lucia Gozzo (università di Catania) Dott.ssa Claudia Pisanu (Università di Cagliari) Dott.ssa Giulia Zudeh (Università di Trieste)

---

### 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 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

La Società dichiara che i dati personali comunicati dall'utente sono trattati in conformità alle disposizioni del D. Lgs. 196/2003 ed alla normativa comunitaria secondo quanto indicato specificamente nell'informativa privacy reperibile sul sito internet della Società all'indirizzo [https://sif-website.s3.amazonaws.com/uploads/attachment/file/240/Informativa\\_Privacy\\_SIF\\_Generica.pdf](https://sif-website.s3.amazonaws.com/uploads/attachment/file/240/Informativa_Privacy_SIF_Generica.pdf) che l'utente, con la sottoscrizione del presente Contratto, dichiara di aver compiutamente visionato, compreso e accettato. 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.

---