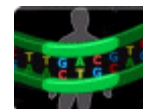




SIF - FARMACOGENETICA



Newsletter Numero 127 – Aprile 2020

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

SOMMARIO

Neuropsichiatria

- Farmacogenetica della risposta a basse dosi di aloperidolo in pazienti critici con delirio
- Associazione tra polygenic risk score e resistenza al trattamento in un campione naturalistico di pazienti con disturbi dello spettro della schizofrenia

Immunomodulazione

- Associazioni dell'antigene leucocitario umano (HLA) con danno epatico indotto da infliximab

Oncologia

- Analisi genomica integrativa rivela meccanismi di resistenza ai glucocorticoidi nella leucemia linfoblastica acuta

La metanalisi del mese

- Analisi dell'associazione tra la variante COMT Val108/158Met e la risposta agli antidepressivi: una meta-analisi

NEUROPSICHIATRIA

FARMACOGENETICA DELLA RISPOSTA A BASSE DOSI DI ALOPERIDOLO IN PAZIENTI CRITICI CON DELIRIO

A cura della Dott.ssa Lucia Gozzo

L'alooperidolo viene di frequente somministrato nei pazienti adulti in condizioni critiche per la prevenzione e/o il trattamento del delirio, nonostante le evidenze provenienti da studi clinici randomizzati controllati non ne supportino l'utilizzo (van den Boogaard M et al. *JAMA* 2018,319 (7):680–90; Al-Qadheeb NS et al.

Crit Care Med 2016,44(3):583–91; Girard TD et al. *Crit Care Med* 2010,38(2):428–37; Page VJ et al. *Lancet Respir Med* 2013,1(7):515–23; Khan BA et al. *J Am Geriatr Soc* 2018,66(12):2289–97). La mancanza di beneficio potrebbe essere dovuta alla presenza di basse concentrazioni sieriche di farmaco. L'aloperidolo è metabolizzato dal CYP2D6 e dal CYP3A4, per i quali sono comuni polimorfismi che determinano un differente fenotipo metabolizzatore (Wijnen PA et al. *Aliment Pharmacol Ther* 2007,26(Suppl.2):211–9). Studi di farmacogenetica sono stati condotti su pazienti con patologie psichiatriche trattati con aloperidolo (Ulrich S et al. *Clin Pharmacokinet* 1998,34(3):227–63), tuttavia non sono disponibili dati su pazienti critici trattati con basse dosi di farmaco per il trattamento del delirio. È importante acquisire informazioni in questi pazienti al fine di individuare le dosi ottimali da utilizzare, individualizzando la terapia. Scopo dello studio è stato quello di valutare l'influenza di varianti farmacogenetiche in pazienti critici con delirio trattati con basse dosi di aloperidolo.

Sono stati arruolati 22 pazienti adulti con delirio (55% uomini, di età pari a 67 anni, BMI 27, APACHE III score 81), ricoverati nella terapia intensiva di un singolo centro da 48 ore o più, trattati con aloperidolo ev (dose mediana di 3 mg/die). La causa di ricovero in terapia intensiva era nella maggior parte dei casi un intervento chirurgico (32%), insufficienza respiratoria (14%), sepsi (14%), aneurisma (9%). La durata media del ricovero era pari a 16 giorni. Il 50% dei pazienti sono deceduti, di cui 6 durante il ricovero in terapia intensiva, 4 dopo dimissione ed 1 dopo trasferimento in altro ospedale. Per la valutazione del fenotipo metabolizzatore è stata valutata la presenza di alleli che determinano l'attività enzimatica, individuando i seguenti gruppi: metabolizzatori lenti (*poor metabolizer*, PM, 2 alleli difettivi); metabolizzatori intermedi (*intermediate metabolizer*, IM 2 alleli con ridotta attività o 1 allele attivo ed 1 inattivo); metabolizzatori rapidi (*extensive metabolizer*, EM) e ultrarapidi (*ultra-rapid metabolizer*, UM, duplicazione di gene in assenza di alleli inattivi). I campioni ematici per la valutazione delle concentrazioni sieriche sono stati raccolti prima della somministrazione giornaliera al giorno 2, 3, 4, 5 e 6 o fino ad interruzione del trattamento. Su 81 campioni sierici la concentrazione mediana era pari a 1.9 µg/L. L'analisi del genotipo ha rivelato 12 EM (54%), 7 IM (32%) e 3 PM (14%) per il CYP2D6, 18 EM (82%) e 4 IM (18%) per il gene CYP3A4. Non è stata riscontrata associazione tra lo status di metabolizzatore e le concentrazioni sieriche (CYP2D6 IM p=0.67; PM p=0.25; CYP3A4 IM p=0.44). L'82% ed il 59% dei pazienti ha ricevuto uno o più farmaci concomitanti noti inibitori del CYP2D6 e del CYP3A4 rispettivamente.

In questo studio pilota prospettico ed osservazionale è stata valutata l'influenza di varianti genetiche sull'uso di basse dosi di aloperidolo in pazienti critici con delirio, senza individuare un'associazione con il genotipo CYP2D6 e CYP3A4. Non è chiaro se la mancanza di beneficio sia il risultato delle concentrazioni sub-terapeutiche di aloperidolo o di una mancanza intrinseca di risposta. I risultati di due recenti studi clinici in pazienti critici con delirio trattati con basse dosi di aloperidolo suggeriscono una mancanza di efficacia probabilmente conseguente al riscontro di concentrazioni sub-terapeutiche (van den Boogaard M et al. *JAMA* 2018,319 (7):680–90; Page VJ et al. *Lancet Respir Med* 2013,1(7):515–23). Gli studi MIND e MIND-USA hanno mostrato mancanza di efficacia nonostante l'utilizzo di dosi maggiori ed il riscontro di concentrazioni plasmatiche fino a 3 volte più elevate (Girard TD et al. *Crit Care Med* 2010,38(2):428–37; Girard TD et al. *N Engl J Med* 2018,379(26):2506–16). Questo suggerirebbe una mancanza intrinseca di effetto nei pazienti con delirio, indipendentemente dalla dose somministrata o dalle concentrazioni sieriche.

In conclusione, questo studio ha valutato gli effetti di varianti genetiche sulle concentrazioni di aloperidolo utilizzato nel trattamento del delirio in pazienti adulti critici. I risultati non hanno identificato specifici fattori farmacocinetici o farmacogenetici correlati con la mancanza di risposta al trattamento.

Limiti dello studio sono rappresentati dal numero ridotto di pazienti e dalla mancanza di gruppo di controllo. Inoltre, la popolazione di pazienti in terapia intensiva presenta caratteristiche molto eterogenee, con conseguenti fattori di confondimento per l'interpretazione dei risultati.

Parole chiave: delirio, CYP2D6/CYP3A4, aloperidolo

Riferimento bibliografico

[Trogrlić Z et al. J Crit Care 2020,57:203–7.](#)

ASSOCIAZIONE TRA POLYGENIC RISK SCORE E RESISTENZA AL TRATTAMENTO IN UN CAMPIONE NATURALISTICO DI PAZIENTI CON DISTURBI DELLO SPETTRO DELLA SCHIZOFRENIA

A cura della Dott.ssa Claudia Pisanu

La schizofrenia è un disturbo psichiatrico severo che provoca importante disabilità e si associa a rilevanti costi socioeconomici. Gli antipsicotici rappresentano i farmaci di prima scelta ma un terzo dei pazienti mostra resistenza al trattamento (TR). L'individuazione di marcatori in grado di predire la probabilità di risposta agli antipsicotici o di sviluppare TR sarebbe di aiuto nella realizzazione di un approccio di terapia di precisione per il trattamento dei pazienti con schizofrenia. È stato ipotizzato che la TR possa rappresentare un sottotipo di schizofrenia e che possa essere determinata, almeno in parte, da fattori genetici e in particolare dai geni coinvolti nell'aumentare la predisposizione allo sviluppo della schizofrenia. Questa ipotesi è supportata dall'osservazione che nelle famiglie dei pazienti con TR si osservano con maggiore frequenza individui affetti da schizofrenia rispetto alle famiglie dei pazienti affetti da schizofrenia che risponde al trattamento. I recenti *genome-wide association studies* (GWAS) hanno permesso di identificare svariati polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) associati con questo disturbo e di disegnare dei *polygenic risk score* (PRS) che permettono di sommare gli effetti di multiple varianti per ottenere una misura della predisposizione genetica allo sviluppo del disturbo. L'applicazione di PRS che includono varianti associate alla schizofrenia (PRS-SZ) allo studio della TR ha prodotto risultati contrastanti. In particolare, è stata riportata un'associazione tra PRS-SZ e storia di trattamento con clozapina o non-risposta agli antipsicotici, ma altri studi non hanno trovato un'associazione significativa tra PRS-SZ e TR. Questi risultati contrastanti potrebbero essere spiegati da differenze nella selezione degli SNP da includere nella composizione del PRS-SZ o dai diversi criteri utilizzati per la definizione di TR. Obiettivo dello studio è stato quello di determinare la capacità di un PRS-SZ nello spiegare la variabilità nella risposta al trattamento in un grande campione naturalistico di pazienti con disturbo dello spettro della schizofrenia.

Lo studio ha incluso 321 pazienti con disturbi dello spettro della schizofrenia reclutati nel contesto dello studio *Thematically Organized Psychosis* (TOP) presso i maggiori ospedali di Oslo. I pazienti avevano un'età compresa tra 18 e 65 anni. I criteri di esclusione comprendevano storia di patologie neurologiche severe, trauma cranico e IQ < 70. È stata effettuata una classificazione della TR in base ai criteri del gruppo di lavoro *Treatment Response and Resistance in Psychosis* (TRRIP): storia di trattamento con clozapina oppure mancata risposta ad almeno due antipsicotici assunti per almeno sei settimane a dosaggio terapeutico. Un totale di 108 pazienti (33,6%) è risultato presentare TR. Per ogni paziente il DNA genomico è stato estratto da un prelievo di sangue o di saliva. La genotipizzazione è stata effettuata mediante chip Human Omni Express-24 v.1.1 (Illumina). Il PRS-SZ è stato basato su una meta-analisi degli studi dello *Psychiatric Genomics Consortium* (PGC) *Schizophrenia Working Group*. L'associazione tra TR e PRS-SZ (utilizzando diverse soglie di *p-value* e correggendo per test multipli secondo Bonferroni) è stata analizzata tramite la costruzione di un modello di regressione logistica binaria con correzione per età, genere, stratificazione della popolazione e *batch* di genotipizzazione. Inoltre, è stata valutata la correlazione tra PRS-SZ e punteggio delle scale *Positive and Negative Syndrome Scale* (PANSS) e *Global Assessment of Functioning* (GAF).

Un PRS-SZ più alto, calcolato utilizzando una soglia di *p-value* = 0,01, è risultato associato allo stato di TR ($p = 0,003$, *odds ratio* = 1,5). Il modello ha presentato una sensibilità del 29,6% e una specificità del 90,6%. La varianza totale spiegata dal modello che includeva PRS-SZ, età, genere, popolazione e *batch* era del 14,6%, mentre la varianza spiegata da un modello che includeva gli stessi predittori ad eccezione del PRS-SZ è risultata dell'1,7%. L'associazione è rimasta significativa escludendo i pazienti trattati con clozapina o i

pazienti con diagnosi diverse dalla schizofrenia. Il PRS-SZ non è risultato associato con gli score PANSS e GAF. I PRS-SZ calcolati utilizzando altre soglie di *p-value* non sono risultati significativamente associati con la TR.

I risultati supportano il possibile utilizzo di un PRS-SZ come marker biologico di TR e l'ipotesi dell'esistenza di fattori genetici predisponenti condivisi tra la schizofrenia e la TR. I limiti dello studio includono il disegno *cross-sectional* e la mancanza di dati su misurazioni dei livelli sierici di antipsicotici per escludere una mancanza di aderenza nei pazienti con TR.

In conclusione, lo studio suggerisce un'associazione tra un *polygenic risk score* per la schizofrenia e la resistenza al trattamento nei pazienti con disturbi dello spettro della schizofrenia.

Parole chiave: antipsicotici, schizofrenia, polygenic risk score

Riferimento bibliografico

[Werner MCF](#) et al. *Schizophr Res* 2020 Mar 11 [Epub ahead of print]

IMMUNOMODULAZIONE

ASSOCIAZIONI DELL'ANTIGENE LEUCOCITARIO UMANO (HLA) CON DANNO EPATICO INDOTTO DA INFILIXIMAB

A cura della Dott.ssa Oksana Montecchini

Infliximab è un anticorpo monoclonale chimerico di tipo topo-umano (mAb) specifico per il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF-alfa) indicato principalmente per il trattamento di: malattia di Crohn, colite ulcerosa, artrite reumatoide, artrite psoriasica, psoriasi e diverse altre condizioni autoimmuni.

È stato evidenziato dopo diversi anni dalla sua approvazione nella pratica clinica, un rischio di danno epatico indotto (DILI) proprio da infliximab, costringendo l'FDA ad aggiungere un avviso di epatotossicità all'etichetta del farmaco. A seguito di una collaborazione tra l'Istituto nazionale per il diabete e le malattie digestive e renali (NIDDK) e la National Library of Medicine (NLM), è stato assegnato all'infliximab un punteggio di probabilità DILI di "A" per indicare "una causa consolidata di danno epatico clinicamente evidente". Vi sono già prove evidenti di specifici polimorfismi dell'antigene leucocitario umano (HLA) associati a DILI e con l'ausilio del biorepository BioVU del Vanderbilt University Medical Center (VUMC) per identificare retrospettivamente casi di epatotossicità indotta da infliximab, questo studio farmacogenetico mirava a identificare la prima associazione nota tra varianti di HLA e DILI indotta da infliximab, permettendo di identificare un gruppo di pazienti particolarmente sensibile, per i quali verrebbe richiesto un monitoraggio mirato o terapie alternative.

Per questo studio sono stati selezionati 11 pazienti causatici in conformità con le politiche sull'utilizzo dei dati presso BioVU (i soggetti hanno tutti firmato il consenso previa inclusione in BioVU). I casi studio sono stati identificati selezionando i pazienti sottoposti a terapia con infliximab che presentavano alanina aminotransferasi (ALT) sierica >3 volte l'ULN (*upper limit of normal*), fosfatasi alcalina (ALP) sierica > 2 volte l'ULN o valori bilirubina totale (BILI) sierici > 2 volte l'ULN nel corso trattamento. Inoltre, sono stati inclusi solo i casi che presentavano valori di ALT, ALP e BILI entro i limiti normali prima dell'esposizione a infliximab. Sono stati invece esclusi i pazienti che presentavano cause concorrenti di danno epatico o assumevano in concomitanza con l'infliximab farmaci già noti per causare tali effetti collaterali. Allo studio sono stati poi aggiunti altri 7 pazienti, conformi ai criteri sopra citati, forniti dall'*International Drug-Induced Liver Injury Consortium* (iDILIC). Al fine di conferire potenza sufficiente allo studio, sono stati, infine, raccolti

60 casi controllo, ovvero pazienti sottoposti ad infliximab per almeno 12 mesi e che non hanno presentato valori di ALT o ALP > 1,5 × ULN o BILI > 1 × ULN entro 6 mesi prima e dopo l'esposizione ad infliximab. La genotipizzazione (*genome-wide genotyping association studies (GWAS)*) è stata eseguita da *Vanderbilt Technologies for Advanced Genomics (VANTAGE, Nashville, Tennessee)* utilizzando la piattaforma Illumina Human MEGA Ex Vanderbilt (N = 18 casi, N = 60 controlli). 528.683 polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) hanno superato il controllo di qualità (QC) e solo un campione tra i controlli aveva DNA insufficiente per una genotipizzazione accurata. Accanto al GWAS, è stato possibile eseguire la tipizzazione di HLA per un totale di 71 campioni (N = 11 casi, N = 60 controlli) presso l'*Institute for Immunology & Infectious Diseases (niiD, Perth, Australia)*. Usando la tecnologia NGS per gli esoni 2 e 3 è stato possibile discriminare gli alleli HLA con una risoluzione a 4 cifre per gli HLA di classe I e II. Per i casi in cui la quantità di DNA era inadeguata per tipizzare gli HLA, è stato usato HIBAG (versione 1.4) per imputare i profili degli HLA da studi GWAS, mentre i calcoli di Potenza statistica sono stati eseguiti con il software Quanto (versione 1.2.4). La struttura della popolazione e l'identificazione degli outlier sono stati determinati usando la principal component analysis (PCA). Le etnie riportate sono state verificate combinando lo studio della popolazione con il Thousand Genome Project e dimostrando i clustering con la PCA. Per valutare l'associazione di varianti dell'HLA nello studio caso controllo è stato usato il software R (versione 3.0) con cui sono state calcolate gli odds ratio (OR) e gli intervalli di confidenza usando il test esatto di Fisher. In questo studio non è stata eseguita una correzione per le comparazioni multiple a causa della ridotta dimensione campionaria e tutti i p-value sotto 0.05 sono stati considerati significativi. Sono state inoltre analizzate associazioni GWAS usando il software PLINK ed il test esatto di Fisher con un limite di significatività di 5.0×10^{-8} . Differenze nelle caratteristiche cliniche tra casi e controlli sono state verificate in R usando il test esatto di Fisher per variabili discrete e il test di Wilcoxon-Mann-Whitney per variabili continue.

Due dei 18 casi studio sono stati eliminati perché considerati "valori anomali". Tra i 16 pazienti in studio che hanno sviluppato DILI durante il trattamento con infliximab, è stata osservata una forte associazione con HLA-B * 39: 01 (circa 25% dei casi), ancora più marcata tra i casi con ALT >5x ULN (30% e OR 56,5), assente invece nei controlli. Considerando che la frequenza di HLA-B * 39: 01 è di circa il 2,3% nell'intera popolazione caucasica si stima che un minimo di 6 pazienti portatori dell'allele HLA-B * 39: 01 dovrebbero evitare il trattamento con infliximab per prevenire un caso DILI. Questo studio ha anche identificato molteplici possibili aplotipi associati a DILI indotto da infliximab, è interessante infatti notare che tutti i casi DILI che presentavano HLA-B * 39: 01 portavano anche HLA-C * 12: 03, mentre se presente nei controlli, nessuno di questi presentava anche HLA-B * 39: 01. Nelle popolazioni caucasiche, l'aplotipo HLA-B * 39: 01-C * 12: 03 appare con una frequenza dell'1,3% e con una frequenza del 25% nei casi DILI indotto da infliximab. Un'altra possibile associazione di aplotipi è stata osservata tra i cinque alleli HLA B * 08: 01, C * 07: 01, DRB1 * 03: 01, DQA1 * 05: 01 e DQB1 * 02: 01, tre dei quali sono risultati significativamente associati ai casi DILI indotto da infliximab. A conferma dei dati presenti in questo studio, altri studi riportano associazioni tra gli aplotipi di HLA e lo sviluppo di DILI indotto da infliximab, rendendo quindi la ricerca di queste associazioni importante anche in studi futuri.

Sebbene preliminari e limitati da un piccolo numero di casi DILI indotti da infliximab, sembra esserci una forte associazione tra i portatori di HLA-B * 39: 01 e lo sviluppo di DILI.

Parole chiave: infliximab, HLA, DILI, GWAS

Riferimento bibliografico

Bruno CD et al. *Pharmacogenomics J* 2020 Feb 06 [Epub ahead of print]

ONCOLOGIA**ANALISI GENOMICA INTEGRATIVA RIVELA MECCANISMI DI RESISTENZA AI GLUCOCORTICOIDI NELLA LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA**

A cura del Dott. Davide Selvestrel e della Dott.ssa Marianna Lucafò

La resistenza ai farmaci è la principale causa di fallimento terapeutico in numerose tipologie di cancro, tra cui la leucemia linfoblastica acuta (LLA). I glucocorticoidi come prednisone e desametasone sono componenti essenziali della terapia chemioterapica impiegata sia nel trattamento di pazienti adulti che nei bambini affetti da LLA. Sebbene siano stati identificati diversi meccanismi cellulari di resistenza ai glucocorticoidi nella leucemia, i determinanti genomici ed epigenetici della resistenza *de novo* ai glucocorticoidi rimangono ancora poco chiari. In questo studio sono state integrate, a livello *genomewide*, informazioni di tipo genomico, incluse le caratteristiche epigenetiche, di cellule leucemiche primarie al fine di identificare geni associati con la resistenza ai glucocorticoidi. Questo ha permesso di confermare direttamente più del 78% dei geni e il 100% dei *pathway* già precedentemente associate con la resistenza ai glucocorticoidi e ha inoltre permesso di individuare altri 14 nuovi geni associati alla resistenza ai glucocorticoidi.

In questo studio è stata inizialmente valutata in vitro la sensibilità al prednisolone mediante esposizione per 96 ore di cellule primarie di leucemia, ottenute da aspirati midollari di 225 nuove diagnosi di LLA di sottotipo B a diverse concentrazioni di farmaco. I pazienti con LC50 <0.1 µM sono stati classificati come sensibili, quelli con valori > di 64µM come resistenti mentre tutti i pazienti rimanenti sono stati catalogati come a risposta intermedia.

È stata inizialmente condotta un'analisi poligenomica nella quale sono state analizzate 6 caratteristiche genomiche ed epigenetiche distinte a livello *genomewide* (mRNA, miRNA, metilazione del DNA, SNP, *copy number alterations* (CNA) e SNVs/*indels* tramite *whole-exome sequencing*, WES)) e la loro associazione con la resistenza al prednisolone in cellule primarie di leucemia in due coorti indipendenti di pazienti. Queste analisi hanno identificato 254 mRNA (permutazione $P < 8.2 \times 10^{-5}$), 203 siti CpG ($P < 1 \times 10^{-5}$), 49 miRNA ($P < 1 \times 10^{-5}$), 380 SNP ($P < 1 \times 10^{-5}$), 25 CNA ($P < 4.5 \times 10^{-4}$) e 227 varianti WES ($P < 1 \times 10^{-5}$) che discriminano tra pazienti sensibili con LLA sensibili e resistenti ai glucocorticoidi. La relazione tra queste caratteristiche genomiche è stata inizialmente valutata sulla base di una interazione significativa con l'espressione genica, rivelando che l'espressione del 94% degli mRNA era significativamente associata con almeno una delle altre caratteristiche genomiche mentre cinque geni sono risultati collegati sotto tutti i profili genomici analizzati (*IDI1*, *ITPR3*, *PTPRF*, *WNK1* e *PAX5*).

In secondo luogo, è stata condotta una TAP-analisi (*truncated aggregation of P values*), per verificare l'influenza di ogni gene nella resistenza ai glucocorticoidi. In questa analisi sono stati aggregati i *p-value* relativi a tutte le caratteristiche genomiche presenti 50.000 basi a monte ed a valle della zona codificante di ogni gene umano ($n = 19.725$), al fine di ottenere un *p-value* unico relativo a tutta la zona considerata e che tenga in considerazione tutti le variabili genomiche d'interesse. Con questo metodo sono stati identificati 903 geni associati con la resistenza al prednisolone ($P < 5.38 \times 10^{-4}$), alcuni dei quali già noti in letteratura come *NLRP3* e *SMARCA4*, mentre *CELSR2* e *PTTG1IP* sono risultati i due nuovi principali geni candidati emersi da questo studio.

La terza analisi di questo studio è stata uno *screening genomewide* condotto su cellule NALM-6, utilizzando la tecnologia CRISPR/Cas9 per il silenziamento genico, sfruttando la libreria GeCKO v.2 contenente degli RNA guida specifici per ogni gene umano. Queste cellule, dopo essere state trasfettate e selezionate con antibiotico, sono state trattate con 100 µM di prednisolone per 72 ore al fine di selezionare solo le cellule resistenti al prednisolone. In seguito a sequenziamento del genoma (con piattaforma HiSeq 2500), sono stati identificati 1024 geni silenziati (*false discovery rate* (FDR) $< 5.2 \times 10^{-7}$) potenzialmente coinvolti nella

resistenza al prednisolone. Il gene *NR3C1* che codifica per il recettore dei glucocorticoidi (GR) è risultato il gene maggiormente significativo in questa analisi ($P = 4.6 \times 10^{-78}$).

Combinando i risultati di tutti e 3 gli approcci usati (analisi poligenomica, TAP e CRISPR/Cas9), *CELSR2* è risultato il principale gene candidato, con un'espressione ridotta associata alla resistenza ai glucocorticoidi nella prima coorte di pazienti analizzata ($P = 3.3 \times 10^{-10}$). Una ridotta espressione di tale gene nei pazienti con LLA resistenti ai glucocorticoidi è stata successivamente validata in due coorti di indipendenti, una composta da 320 pazienti con LLA (bambini e adulti) ($P = 8.3 \times 10^{-8}$), l'altra composta da 145 bambini con LLA ($P < 9.5 \times 10^{-6}$). Inoltre, è emerso che cellule primarie di leucemia di pazienti con una bassa espressione di *CELSR2* presentavano anche una riduzione significativa dell'espressione di *NR3C1* ($P = 1.7 \times 10^{-4}$). In vitro, è stato riscontrato un incremento di 12.7 volte nel LC50 in cellule NALM-6 ($0.026 \pm 0.033 \mu\text{M}$ contro $0.37 \pm 0.1 \mu\text{M}$ (media \pm s.e.), $P = 7.8 \times 10^{-5}$) silenziate per il gene *CELSR2* e una riduzione significativa dei livelli basali di espressione del GR (riduzione di 1.8 volte, $P = 1.34 \times 10^{-7}$). In seguito ad attivazione del GR dopo 24h di trattamento con prednisolone, molti geni sono risultati differenzialmente espressi nelle NALM-6 silenziate per *CELSR2* confrontate con NALM-6 di controllo. In particolare, nelle cellule silenziate è emersa una forte up-regolazione di *BCL2* sia a livello trascrizionale (incremento di 2.5 volte; $P = 3.7 \times 10^{-12}$) che proteico (incremento di 1.3 volte; $P = 0.013$) mentre non è emersa nessuna differenza di espressione del gene *BCL2L11* (Bim), un gene pro-apoptotico noto per essere up-regolato dai glucocorticoidi. Ciò genera una riduzione del rapporto BIM:BCL2 nelle NALM-6 silenziate per *CELSR2* e, considerando che il gene antiapoptotico *BCL2* è fortemente indotto in questo modello in seguito a trattamento con prednisolone, è stato testato il venetoclax, un inibitore di BCL2, in grado di mitigare la resistenza ai glucocorticoidi nelle cellule di LLA resistenti ai glucocorticoidi con una bassa espressione di *CELSR2*. Queste cellule sono state trattate con prednisolone (0.954–4 mM) per 72h e diverse concentrazioni di venetoclax, evidenziando un importante meccanismo sinergico. Questa sinergia era enormemente aumentata nelle NALM-6 con il gene *CELSR2* silenziato. Inoltre, nei topi in cui sono state inoculate cellule NALM-6 con *CELSR2* silenziato si è verificato un aumento significativo della sopravvivenza in seguito a trattamento con 50 mg/kg di venetoclax più desametasone, se confrontati a quelli trattati solo con desametasone (60 giorni sopravvivenza mediana contro 69 giorni; $P = 0.0062$) o solo venetoclax (56 giorni sopravvivenza mediana contro 69 giorni; $P = 0.0046$). Successivamente è stato dimostrato che cellule primarie di leucemia, di 96 pazienti resistenti al prednisolone, erano significativamente più sensibili al venetoclax ($P = 0.014$).

Ai fini di ricostruire un interattoma specifico per cellule B leucemiche, è stato usato NetBID, sfruttando i profili di RNA-seq di 185 pazienti con LLA di tipo B, identificando il gene *CELSR2* come marcatamente downregolato ($P = 8.6 \times 10^{-8}$) nei pazienti resistenti agli steroidi. Sorprendentemente, i geni regolati da *CELSR2* dedotti da NetBID erano significativamente aumentati in cellule silenziate per il gene *CELSR2* ($P = 1 \times 10^{-4}$ nelle NALM-6). NetBID ha inoltre identificato *CELSR2* come uno dei principali target a valle del fattore di trascrizione *PAX5*, che è risultato il gene maggiormente co-espresso con *CELSR2* nelle cellule di LLA dall'analisi poligenomica. Coerentemente, una bassa espressione di *PAX5* è stata osservata nelle cellule leucemiche resistenti al prednisolone ($P = 7.47 \times 10^{-5}$). È stato successivamente costruito un modello multivariato usando i profili di espressione di tutti i miRNA associati con *CELSR2* come co-variate, assieme all'mRNA di *PAX5*, che ha dimostrato che l'espressione di *PAX5* è responsabile del 25% della variabilità nell'espressione di *CELSR2* ($P = 1.6 \times 10^{-12}$) mentre miR-31-5p è responsabile di un ulteriore 4% di variabilità ($P = 0.002$). Il silenziamento di *PAX5* nelle NALM-6 ha mostrato una riduzione statisticamente significativa dell'espressione sia di *CELSR2* ($P = 0.0003$) che di *NR3C1* ($P < 0.0001$).

Infine, è stata condotta un'analisi di *single cell* RNA-seq (scRNA-seq) su cellule primarie di LLA ottenute da un paziente sensibile al prednisolone e da uno resistente. Le cellule sono state trattate ex-vivo con $63 \mu\text{M}$ di prednisolone o incubate solamente con terreno. Il scRNA-seq ha permesso di verificare i cluster di cellule sopravvissute in base ai loro profili di espressione dopo 96 ore di trattamento, individuando un'espressione maggiore del gene *CELSR2* nel paziente sensibile prima del trattamento, rispetto al paziente resistente che presentava una espressione non rilevabile (FDR = 0.009).

Questo studio ha dimostrato che l'integrazione di varianti genomiche agnostiche, multidimensionali e somatiche può identificare meccanismi di resistenza ai farmaci nelle cellule di leucemia primaria. Questi risultati indicano che l'interrogazione di molteplici informazioni genomiche migliora la capacità di scoprire meccanismi di resistenza, rispetto all'analisi di un solo tipo di caratteristica genomica. Applicando questa strategia è stato identificato un meccanismo precedentemente non descritto che coinvolge una ridotta espressione di CELSR2 un gene che codifica per un recettore di membrana accoppiato a proteina G in grado di sia di alterare l'espressione genica sia di mediare interazioni cellula-cellula. CELSR2 è risultato downregolato in circa il 50% dei pazienti con LLA resistenti ai glucocorticoidi, causando una minore espressione del recettore dei glucocorticoidi e sovra espressione di BCL2, che può essere mitigata dal trattamento con l'inibitore di BCL2 venetoclax.

Parole chiave: leucemia linfoblastica acuta, glucocorticoidi, CELSR2, PAX5, venetoclax, BCL2

Riferimento bibliografico

[Autry RJ](#) et al. *Nature Cancer* 2020, 1:329–44

LA METANALISI DEL MESE

ANALISI DELL'ASSOCIAZIONE TRA LA VARIANTE COMT VAL108/158MET E LA RISPOSTA AGLI ANTIDEPRESSIVI: UNA META-ANALISI

A cura della Dott.ssa Sarah Cargnin

La depressione maggiore (DM) è un disturbo cronico dell'umore caratterizzato da umore depresso, disfunzione cognitiva, perdita di peso ed anedonia. Ad oggi, si dispone di un'ampia gamma di trattamenti, farmacologici e non, per tale disturbo, tra cui si annoverano l'uso di farmaci antidepressivi e la terapia elettroconvulsivante. Dalla pratica clinica emerge, tuttavia, una forte variabilità interindividuale nella risposta clinica ai suddetti trattamenti e la componente genetica individuale è stata ipotizzata essere, almeno in parte, responsabile di tali differenze nella risposta. Tra i geni candidati analizzati in questo contesto, spicca il gene COMT, che codifica per la catecol-O-metiltransferasi, un enzima implicato nella degradazione delle catecolamine. Tra le oltre 4000 varianti identificate in tale gene, emerge lo SNP Val108/158Met, un polimorfismo funzionale, localizzato nell'esone 4 di tale gene, che comporta la sostituzione di una metionina al posto di una valina in posizione 108 della forma solubile dell'enzima o in posizione 158 della forma proteica legata alla membrana. Tale SNP, noto anche con il nome di rs4680, risulta in una ridotta capacità funzionale dell'enzima e quindi in un aumento dei livelli di catecolamine nello spazio sinaptico. La variante rs4680, oltre ad essere riportata come associata ad un'aumentata suscettibilità allo sviluppo di DM, è stata largamente investigata come potenziale fattore predittivo della risposta clinica a diverse classi di farmaci antidepressivi, nonché alla terapia elettroconvulsivante. Essendo le evidenze riportate da tali studi farmacogenetici discordanti tra loro, obiettivo del presente studio di revisione sistematica e meta-analisi è stato quello di produrre una stima quantitativa conclusiva dell'associazione tra la variante rs4680 e la risposta clinica ai trattamenti antidepressivi (farmaci antidepressivi e terapia elettroconvulsivante) in pazienti affetti da depressione maggiore.

La ricerca bibliografica è stata condotta a dicembre del 2018 utilizzando i databases PubMed, EMBASE e Cochrane Library. Sono stati definiti includibili tutti gli studi clinici randomizzati o di coorte, pubblicati in lingua inglese, nei quali fossero esplicitati i dati di associazione farmacogenetica tra la variante rs4680 e la risposta clinica ai trattamenti antidepressivi (farmaci antidepressivi e terapia elettroconvulsivante) in pazienti affetti da DM. Per ciascuno studio eleggibile sono stati estratti i dati relativi a paese di

arruolamento o etnia, dimensione campionaria, scala diagnostica utilizzata, trattamento somministrato, metodo di genotipizzazione e distribuzione genotipica tra responsivi e non responsivi al trattamento. La qualità degli studi primari inclusi nella presente revisione sistematica è stata stimata mediante i criteri NOS (*Newcastle-Ottawa Quality Assessment Scale*) e gli studi primari con un punteggio superiore a 5 sono stati considerati lavori di buona qualità. La stima meta-analitica dell'associazione tra rs4680 e la risposta ai trattamenti antidepressivi è stata calcolata come OR e relativo intervallo di confidenza mediante meta-analisi ad effetti random, utilizzando 4 diversi modelli genetici (allelico, dominante, recessivo e additivo). L'eterogeneità è stata stimata mediante Q test e, in caso di assenza di eterogeneità, la stima meta-analitica è stata ricalcolata mediante meta-analisi ad effetti fissi. Sono state condotte delle analisi di sensibilità per valutare la robustezza delle stime meta-analitiche ottenute e sono state, inoltre, condotte delle meta-analisi per sottogruppi sulla base dell'etnia, scala diagnostica utilizzata, trattamento somministrato, e il fatto che i campioni fossero o meno in equilibrio di Hardy-Weinberg. L'eventuale presenza di bias di pubblicazione è stato stimato tramite test di Begg e di Egger.

Dalla ricerca bibliografica sono emersi 382 studi, dei quali 11 sono stati identificati come eleggibili per tale meta-analisi. Di questi, 5 studi sono stati condotti su popolazioni asiatiche, e 6 su popolazioni europee o americane. Tutti i lavori sono risultati essere di buona qualità (punteggio NOS >5). Dalla meta-analisi condotta combinando le stime di associazione farmacogenetica di tutti e 11 gli studi ($N_{\text{pazienti}}=2845$), non è emersa alcuna correlazione statisticamente significativa tra lo SNP rs4680 e la risposta clinica ai trattamenti antidepressivi (farmaci antidepressivi e terapia elettroconvulsivante), qualsiasi fosse il modello genetico analizzato. Le analisi di sensibilità hanno dimostrato la robustezza delle stime meta-analitiche ivi ottenute nei modelli genetici allelico, recessivo e additivo ma non in quello dominante, dove l'esclusione dalla meta-analisi di alcuni studi (Serretti et al 2013, Taranu et al 2017 oppure Tsai et al 2009) ha portato all'ottenimento di una stima meta-analitica statisticamente significativa per la correlazione tra rs4680 e la risposta ai trattamenti antidepressivi.

Essendo stata identificata una forte eterogeneità tra gli studi in tutti i modelli genetici utilizzati, sono state condotte delle meta-analisi per sottogruppi. Nello specifico, non è emersa alcuna associazione statisticamente significativa tra la variante in studio e la risposta ai trattamenti antidepressivi in tutte le meta-analisi per sottogruppi effettuate, ad eccezione che nel sottogruppo di pazienti sottoposti a terapia elettroconvulsivante ($N_{\text{pazienti}}=281$; modello allelico: OR 2.24, 95% CI 1.38-3.64, $P=0.001$, $I^2=0.22$; modello recessivo: OR 3.17, 95% CI 1.67-6.04, $P=0.0004$, $I^2=0.36$; modello dominante: OR 2.64, 95% CI 1.27-5.46, $P=0.009$, $I^2=0.31$; modello additivo: OR 4.98, 95% CI 2.23-11.10, $P=0.0001$, $I^2=0.71$). In tale sottogruppo non si è evinta la presenza di *bias* di pubblicazione, qualsiasi fosse il modello genetico analizzato.

Il presente lavoro di meta-analisi è il primo in letteratura ad aver meta-analizzato l'impatto di rs4680 sulla risposta ai trattamenti antidepressivi, fossero essi farmacologici o meno (terapia elettroconvulsivante). Dalla meta-analisi emerge come tale SNP non sembri essere predittivo della risposta ai trattamenti antidepressivi quando analizzati nel loro insieme. Al contrario, rs4680 sembra essere specificatamente correlato alla risposta alla terapia elettroconvulsivante. Tali risultati devono essere, tuttavia, interpretati alla luce di alcune limitazioni del presente studio, quali: i) sono stati definiti eleggibili gli studi pubblicati unicamente in lingua inglese: è quindi possibile che non siano stati inclusi nella presente meta-analisi dati rilevanti riportati da studi pubblicati in lingue differenti; ii) la ricerca bibliografica è stata condotta a dicembre 2018: sarebbe stato opportuno aggiornare la ricerca per includere eventuali studi primari pubblicati nel corso degli ultimi 15 mesi; iii) le stime meta-analitiche ivi riportate sono state calcolate su una ridotta dimensione campionaria, inclusa quella relativa alla correlazione tra rs4680 e la risposta alla terapia elettroconvulsivante che non può, quindi, essere considerata come conclusiva; iv) non è stato possibile condurre ulteriori meta-analisi per sottogruppi sulla base della specifica classe di trattamenti farmacologici antidepressivi somministrati e sulla base del sesso dei pazienti. Gli Autori riconoscono la maggior parte di tali limitazioni e suggeriscono che la conduzione di ulteriori studi primari sia necessaria al fine di confermare i risultati meta-analitici ivi ottenuti. A ciò, è possibile aggiungere il suggerimento che future meta-analisi condotte nell'ambito prevedano di adottare delle tecniche statistiche atte a determinare

quanto le stime meta-analitiche ottenute siano statisticamente robuste, e questo al fine di evitare di produrre dei potenziali risultati falsi positivi o falsi negativi.

La variante COMT rs4680 è risultata essere predittiva unicamente della risposta clinica alla terapia elettroconvulsivante in pazienti affetti da depressione maggiore.

Parole chiave: depressione maggiore, trattamenti antidepressivi, COMT

Riferimento bibliografico

[Tang Z](#) et al. *Gene* 2020, 734:144333



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

https://www.sifweb.org/la_societ%C3%A0#Gruppi_di_lavoro

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)
Hanno contribuito a questo numero:	Dott.ssa Sarah Cargnin (Università del Piemonte Orientale) Dott.ssa Lucia Gozzo (Università di Catania) Dott.ssa Marianna Lucafò (Università di Trieste) Dott.ssa Oksana Montecchini (Università di Trieste) Dott.ssa Claudia Pisanu (Università di Cagliari) Dott. Davide Selvestrel (Università di Trieste)
Web Editor	Dott. Federico Casale (Università di Torino)

Archivio SIF-Farmacogenetica

Edicola Virtuale SIF

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

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 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 con oggetto: CANCELLA.
