



SIF - FARMACOGENETICA



Newsletter Numero 140 – Giugno 2021

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

SOMMARIO

Oncologia

- Studio di associazione tra un polimorfismo nel gene GATA3, i livelli di malattia residua minima ed il rischio di ricaduta in pazienti pediatrici con leucemia linfoblastica acuta
- Associazione tra polimorfismi genetici e mielosoppressione in pazienti con cancro al seno trattate con chemioterapia a base di antracicline

Neuropsichiatria

- Rischio genetico per leucopenia e neutropenia indotte da clozapina: uno studio di genome-wide association

Gastroenterologis

- L'integrazione dei dati di Omics identifica le regioni del gene ELOVL7 e MMD come nuovi loci per la risposta di adalimumab nei pazienti con malattia di Crohn

La Metanalisi del mese

- Analisi dell'associazione tra varianti genetiche e l'insorgenza di mucositi indotte da metotrexato in pazienti oncologici: uno studio di revisione sistematica e meta-analisi

ONCOLOGIA

STUDIO DI ASSOCIAZIONE TRA UN POLIMORFISMO NEL GENE GATA3, I LIVELLI DI MALATTIA RESIDUA MINIMA ED IL RISCHIO DI RICADUTA IN PAZIENTI PEDIATRICI CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA

A cura della dott.ssa Giulia Zudeh

La leucemia linfoblastica acuta (LLA) è il più frequente cancro pediatrico. Nonostante i miglioramenti terapeutici avvenuti nel corso degli anni, una parte dei pazienti va incontro a ricaduta.

I protocolli chemioterapici per questa forma di leucemia prevedono una fase iniziale di induzione della remissione di malattia, che ha lo scopo di ridurre il numero di blasti leucemici presenti nel sangue e nel

midollo del paziente. Al termine di questa prima fase di trattamento viene valutato il livello di malattia residua minima (MRD, dall'inglese *minimal residual disease*), che risulta essere un marcatore prognostico associato all'esito della terapia a lungo termine e viene utilizzato per stratificare i pazienti in base al loro livello di rischio di fallimento terapeutico. Inoltre, sulla base della presenza di alcune alterazioni geniche nei blasti leucemici, la patologia può venire classificata in sottotipi molecolari. Le forme di LLA caratterizzate dalla presenza del cromosoma Philadelphia e quelle di tipo Philadelphia-like, sono caratterizzate da una scarsa risposta alla terapia e sono associate a positività alla MRD alla fine della fase d'induzione della remissione, mentre la presenza della fusione *ETV6-RUNX1*, l'iperdiploidia e le trisomie nei cromosomi 4 e 10 conferiscono un esito favorevole e negatività alla MRD. Inoltre, sono stati identificati dei polimorfismi che influenzano il metabolismo degli agenti chemioterapici, come la presenza di varianti genetiche nel gene della tiopurina metiltransferasi, che ne riducono l'attività, con conseguente aumento di metaboliti attivi e maggior rischio di tossicità da farmaco. Un precedente studio *genome wide* (GWAS) aveva identificato un polimorfismo nel gene dell'interleuchina 15 associato ai livelli di MRD ed ulteriori studi di tipo meccanicistico avevano dimostrato che la presenza di questa variante impatti sul microambiente leucemico alterando la sensibilità dei blasti agli agenti chemioterapici.

In questo lavoro è stata fatta un'analisi GWAS su 2597 campioni di pazienti pediatrici con LLA di tipo B (LLA-B) ad alto rischio appena diagnosticata e trattati secondo il protocollo del Children's Oncology Group (COG) AALL0232 (clinicaltrials.gov ID NCT00075725), con lo scopo d'identificare nuove varianti geniche associate alla MRD. I polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) emersi come maggiormente significativi da questa analisi sono stati validati in una coorte indipendente composta da 491 pazienti pediatrici di LLA-B presentanti caratteristiche simili a quelli della coorte di studio ed arruolati nei trial clinici COG P9905 (NCT00005596) e P9906 (NCT00005603). I pazienti della coorte di studio sono stati suddivisi in due gruppi sulla base del trattamento ricevuto: prednisone o desametasone durante l'induzione e metotressato (MTX) più peg-asparagasi o MTX ad alte dosi (HD-MTX) durante il mantenimento. In maniera simile, i pazienti della coorte di validazione sono stati suddivisi sulla base del trattamento ricevuto, che variava per quanto riguarda l'intensità di MTX somministrato.

In questo studio i livelli di MRD sono stati valutati mediante analisi di citometria a flusso e livelli di 0,1% (1 cellula leucemica ogni 1000 cellule sane) o superiori sono stati considerati come positivi. Il DNA germinale è stato estratto dal sangue periferico dei pazienti durante la fase di remissione del trattamento.

Per valutare l'associazione tra MRD ed i vari SNP, nelle analisi statistiche la MRD è stata trattata inizialmente come una variabile dicotomica (cioè, MRD $\geq 0,1\%$ o $< 0,1\%$) ed è stata fatta una regressione logistica utilizzando gli SNP come predittori e aggiustando l'analisi per il protocollo di trattamento. In secondo luogo, la MRD è stata trattata come una variabile ordinale ($< 0,1\%$, $\geq 0,1\%$ - $< 1\%$, $\geq 1\%$) e la sua associazione con gli SNP è stata analizzata tramite la correlazione di Spearman. Per quanto riguarda lo SNP rs3824662 nel gene *GATA3*, la sua associazione è stata anche testata usando la MRD come variabile dicotomica tramite un'analisi di regressione multivariata, in cui sono state prese in considerazione l'età alla diagnosi (< 10 anni oppure ≥ 10 anni), la conta leucocitaria alla diagnosi ($< 50 \times 10^9/L$ oppure $\geq 50 \times 10^9/L$) ed i livelli del DNA ($< 1,16$ oppure $\geq 1,16$).

Nella coorte di studio sono state valutate 863.370 varianti.

Dopo l'aggiustamento per l'etnia ed il trattamento (desametasone oppure prednisolone), è stato identificato come maggiormente significativo lo SNP rs3824662 nel gene *GATA3* (frequenza allelica di rischio (RAF, dall'inglese "risk allele frequency") 41,4% in MRD positivo vs. 30,5% in MRD negativo; odds ratio [OR] = 1,58; intervallo di confidenza al 95% [CI] = 1,35 - 1,84; $P = 1,15 \times 10^{-8}$; RAF 30,5% in MRD $< 0,1\%$, 40,4% in MRD $\geq 0,1\%$ - $< 1\%$, 42,5% in MRD $\geq 1\%$; $P = 2,49 \times 10^{-8}$ considerando la MRD come una variabile ordinale); la positività alla MRD variava sulla base del genotipo ed aumentava in presenza dell'allele variante (8,1%, 14,3%, e 17,3% nei pazienti con genotipo CC, CA e AA), comportandosi secondo un modello genetico di tipo additivo. Inoltre, è emerso che la presenza dell'allele A aumentasse la probabilità di sviluppare livelli intermedi ($\geq 0,1\%$ - $< 1\%$) o alti ($\geq 1\%$) di MRD.

Oltre a questo SNP, dallo studio GWAS sono emerse altre due varianti nel gene *GATA3* associate alla MRD in modo significativo (rs3781093, OR = 1,50; CI = 1,28 - 1,75; $P = 3,85 \times 10^{-7}$ e rs477461, OR = 1,48; CI = 1,25 - 1,76; $P = 6,95 \times 10^{-6}$) ed altri 19 SNP in altri geni, associati alla MRD con valori di significatività $P \leq 1 \times 10^{-5}$.

Inoltre, è stato visto che le due varianti rs3781093 e rs3824662 nel gene *GATA3* risultavano essere in *linkage disequilibrium* (LD) tra loro ($r^2 = 0,84$, $D' = 0,95$ in HapMap CEU).

Dalle analisi svolte nella coorte di validazione è stata confermata l'associazione dello SNP rs3824662 nel gene *GATA3* con la MRD, sia trattandola come variabile dicotomica che come variabile ordinale ($P = 0,003$ e $P = 0,01$ rispettivamente). Questa associazione è rimasta significativa anche in seguito all'aggiustamento delle analisi sulla base delle variabili cliniche, come l'età, la conta dei globuli bianchi ed i livelli di DNA, sia nella coorte di studio ($OR = 1,55$; $CI = 1,28-1,87$; $P < 0,001$) che in quella di validazione ($OR = 1,51$; $CI = 1,02 - 2,25$; $P = 0,04$). In seguito all'aggiustamento dell'analisi statistica sulla base dell'etnia e del trattamento, è emerso che l'allele variante A sia più frequente nei pazienti di etnia ispanica e sia associato ad un rischio di ricaduta maggiore (hazard ratio [HR] = 1,34; $CI = 1,11 - 1,61$; $P = 0,002$). Questo SNP è risultato essere un fattore prognostico alla fine della terapia di induzione nei pazienti con MRD $< 0,1\%$ ($HR = 1,35$; $CI = 1,09 - 1,68$; $P = 0,007$). In seguito all'aggiustamento dell'analisi per l'età e la conta dei globuli bianchi, questa variante è rimasta significativamente associata ad un maggior rischio di ricaduta sia nell'intera coorte ($HR = 1,22$; $CI = 1,01 - 1,47$; $P = 0,04$) che nei pazienti con MRD $< 0,1\%$ ($HR = 1,27$; $CI = 1,02 - 1,59$; $P = 0,04$). Questo risultato è stato successivamente confermato nella coorte di validazione, dove è emerso che la presenza dell'allele A aumenti il rischio di ricaduta sia nell'intera coorte ($HR = 1,40$; $CI = 1,08 - 1,81$; $P = 0,01$) che nei pazienti con MRD $< 0,1\%$ ($HR = 1,45$; $CI = 1,02 - 2,07$; $P = 0,04$). Anche in questa coorte di pazienti il valore prognostico dello SNP rs3824662 nel gene *GATA3* è rimasto significativo in seguito all'aggiunta delle variabili cliniche dell'età alla diagnosi, la conta dei globuli bianchi e l'indice del DNA all'analisi sia tenendo conto della coorte intera ($HR = 1,43$; $CI = 1,10-1,85$; $P = 0,007$) sia il sottoinsieme dei pazienti con MRD $< 0,1\%$ ($HR = 1,51$; $CI = 1,05 - 2,18$; $P = 0,03$).

Infine, all'analisi sono stati aggiunti i sottotipi molecolari di LLA (ad es. *ETV6-RUNX1*, riarrangiamento in *MLL*, *E2A-PBX1*, B-others), i quali hanno ridotto leggermente, il significato prognostico dello SNP rs3824662 nel gene *GATA3*, suggerendo che i suoi potenziali effetti prognostici sull'esito del trattamento siano indipendenti da questi ulteriori fattori genetici.

Sulla base di questi risultati, gli autori hanno suggerito di integrare la presenza di varianti genetiche germinali del paziente, come lo SNP rs3824662 nel gene *GATA3*, agli altri fattori clinici e prognostici usati per la stratificazione del trattamento iniziale dei pazienti pediatrici con LLA.

Il limite di questo studio è stato la scarsa disponibilità di pazienti di cui si dispone di sia di dati genomici somatici che germinali completi (~ 25%); questa ridotta dimensione del campione non permette di trarre conclusioni definitive, che necessitano ulteriori studi futuri su coorti più ampie.

Questo studio GWAS identifica la variante rs3824662 nel gene *GATA3* come un fattore prognostico associato ad elevati livelli di MRD in pazienti pediatrici di LLA-B.

Parole chiave: leucemia linfoblastica acuta, malattia residua minima, GWAS

Riferimento bibliografico

[Zhang H](#) et al. *J Natl Cancer Inst* 2021,113(4):408-17

ASSOCIAZIONE TRA POLIMORFISMI GENETICI E MIELOSOPPRESSIONE IN PAZIENTI CON CANCRO AL SENO TRATTATE CON CHEMIOTERAPIA A BASE DI ANTRACICLINE

A cura delle Dott.sse Francesca Gorini e Gloria Ravegnini

Il cancro alla mammella è il tumore con più elevato tasso di incidenza globale nelle donne con 2,10 milioni di casi diagnosticati ogni anno. La terapia standard è costituita da una chemioterapia a base di antracicline tra cui doxorubicina, daunorubicina, epirubicina. Gli effetti collaterali della chemioterapia sono le principali cause che spingono le pazienti a ridurre le dosi di chemioterapico o ad interrompere la terapia con conseguente diminuzione o annullamento dell'effetto antitumorale. In particolare, gli effetti avversi causati

dalle antracicline sono mielosoppressione, cardiotoxicità, nausea, vomito e alopecia. La mielosoppressione è l'effetto tossico acuto più comune nelle pazienti trattate con antracicline e consiste in una riduzione della conta dei neutrofili e dei leucociti e nella comparsa di anemia. L'efficacia e la tossicità del trattamento sono determinate principalmente dalla concentrazione del farmaco nel sangue che, a sua volta, dipende dai processi farmacocinetici, altamente influenzati dal patrimonio genetico individuale. In questo contesto, i polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) rivestono un ruolo molto importante nel determinare l'*outcome* clinico finale. La farmacocinetica delle antracicline prevede, inizialmente, l'ingresso del farmaco nella cellula mediato dal trasportatore SLC22A16, successivamente metabolizzazione da parte di CBR1 e AKR1; infine, espulsione dalla cellula ad opera della famiglia dei trasportatori ABC. Tuttavia, fino ad oggi, il ruolo degli SNP a carico di questi geni quali mediatori della risposta alla chemioterapia a base di antracicline non è stato approfonditamente studiato.

In questo contesto si inserisce il presente studio, in cui sono stati analizzati 4 polimorfismi sui geni implicati nella farmacocinetica delle antracicline (AKR1A1 rs2088102, CBR1 rs20572, ABCG2 rs2231142, SLC22A16 rs6907567) in 194 pazienti affette da cancro alla mammella in trattamento chemioterapico con antracicline, ed è stata analizzata la loro correlazione con l'effetto tossico di mielosoppressione. Le pazienti sono state trattate con terapia adiuvante secondo il protocollo antraciclina 60 mg/m² + ciclofosfamide 600 mg/m²; i test ematologici su tali pazienti sono stati eseguiti al termine del primo ciclo di trattamento, mediante valutazione ematica di anemia, neutropenia, trombocitopenia e leucopenia.

I risultati hanno permesso di osservare che, delle 194 donne, 116 mostravano leucopenia di grado 1-4 con incidenza del 59,8%, 100 pazienti mostravano neutropenia di grado 1-4 (incidenza 51,6%), mentre 109 pazienti avevano anemia di grado 1-4 (incidenza 56,2%), di cui 11 hanno manifestato anemia severa di grado 3-4. Per quanto riguarda l'associazione con gli SNP analizzati, i soggetti omozigoti TT per la variante CBR1 rs20572 presentavano una riduzione del rischio di sviluppare leucopenia causata da antracicline ($p=0,043$) rispetto al genotipo *Wild Type* (WT); analogamente i soggetti eterozigoti (GT) per ABCG2 rs2231142 avevano un rischio ridotto di leucopenia rispetto alle pazienti portatrici del genotipo WT ($p=0,042$). Gli individui eterozigoti (GT) per la variante ABCG2 rs2231142 avevano, invece, mostrato una riduzione del rischio di neutropenia causata associata a chemioterapia ($p=0,025$) rispetto ai soggetti WT. Infine, la variante sul gene AKR1A1 è risultata essere associata alla comparsa di anemia severa durante il trattamento; in particolare, la presenza di almeno un allele mutato per AKR1A1 rs2088102 (genotipo TC o CC) era significativamente correlata con la comparsa di anemia severa nelle pazienti (rispettivamente $p=0,014$ e $p=0,008$).

Il tumore alla mammella è estremamente diffuso nel Mondo e la terapia con antracicline è, ad oggi, il gold standard per questo tipo di tumore. I polimorfismi a carico di geni implicati in processi farmacocinetici individuati in questo studio potrebbero rivelarsi utili nel predire la comparsa di effetti avversi causati dalle antracicline. Data l'incidenza elevata di questo specifico tumore, la coorte in studio non risulta sufficientemente grande per trarre delle conclusioni solide. Sono quindi necessari ulteriori studi su una coorte di pazienti più numerosa ed indipendente al fine di comprendere l'effettiva diminuzione del rischio di mielosoppressione nei pazienti in trattamento con antracicline, tenendo in considerazione anche altri fattori di rischio per la manifestazione di questo effetto avverso come l'età, la malnutrizione, l'eventuale presenza di patologie epatiche, renali o cardiovascolari.

In conclusione, questo studio ha permesso di identificare SNPs a carico dei geni CBR1, ABCG2, AKR1A1 associati con il rischio di sviluppare mielosoppressione nelle pazienti affette da cancro alla mammella in trattamento con chemioterapia a base di antracicline.

Parole chiave: cancro alla mammella, chemioterapia a base di antracicline, CBR1, ABCG2, AKR1A1, SLC22A16.

Riferimento bibliografico

[Cui L](#) et al. *Life Sci* 2021, 276:119392

NEUROPSICHIATRIA**RISCHIO GENETICO PER LEUCOPENIA E NEUTROPENIA INDOTTE DA CLOZAPINA: UNO STUDIO DI GENOME-WIDE ASSOCIATION**

A cura della Dott.ssa Claudia Pisanu

La schizofrenia è un disturbo psichiatrico severo che colpisce circa l'1% della popolazione mondiale. Sebbene il trattamento con farmaci antipsicotici giochi un ruolo fondamentale nella gestione di questo disturbo, molti pazienti non rispondono alla terapia. La clozapina è l'unico antipsicotico con indicazione per la schizofrenia resistente al trattamento. Tuttavia, il suo utilizzo richiede uno stretto monitoraggio e può essere associato allo sviluppo di effetti avversi quali aumento di peso, disfunzione metabolica, patologie cardiovascolari e leucopenia. La leucopenia è definita come una riduzione del numero di globuli bianchi circolanti al di sotto di 4000 cellule per microlitro. Neutropenia e agranulocitosi rappresentano tipi diversi di leucopenia caratterizzati, rispettivamente, da un numero assoluto di neutrofili inferiore a 1500 e 500 cellule per millimetro cubo. L'agranulocitosi associata a clozapina è una forma di leucopenia severa e potenzialmente fatale. Tra i pazienti che assumono clozapina, il rischio cumulativo di neutropenia è del 3,8% e quello di agranulocitosi dello 0,9%.

È stato suggerito che allo sviluppo di leucopenia, neutropenia o agranulocitosi associate a clozapina, possano contribuire i fattori genetici. In particolare, è stato suggerito un potenziale ruolo del sistema dell'antigene leucocitario umano (HLA), localizzato nella regione del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), e dei geni *SLCO1B3*, *SLCO1B7*, *UBAP2* e *STARD9*. La maggior parte degli studi disponibili hanno incluso partecipanti di origine Europea. Tuttavia, potrebbero esservi differenze nelle frequenze degli alleli implicati tra gruppi con diversa origine etnica. Gli autori del presente studio hanno condotto il primo *genome-wide association study* (GWAS) sulla leucopenia indotta da clozapina in una popolazione di origine Cinese.

Lo studio ha incluso pazienti con diagnosi di schizofrenia, in accordo con i criteri del DSM-IV, reclutati presso il Wuhu Fourth People's Hospital e il Guangxi Longquan Mountain Hospital dal 2007 al 2012. Nello specifico, sono stati inclusi 1983 pazienti con una diagnosi di schizofrenia resistente al trattamento che assumevano clozapina. Tra questi, 242 pazienti hanno sviluppato una leucopenia indotta da clozapina durante il trattamento (globuli bianchi < 4000 mm⁻³), dei quali 46 hanno sviluppato anche neutropenia indotta da clozapina (conta assoluta di neutrofili < 1500 mm⁻³). Gli autori hanno inoltre condotto una meta-analisi tra l'attuale GWAS e quello condotto su pazienti di origine europea dal Clozapine-Induced Agranulocytosis Consortium (CIAC). La genotipizzazione *genome-wide* su DNA genomico è stata condotta tramite Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0. Dopo il controllo di qualità, l'associazione tra le varianti e la leucopenia indotta da clozapina è stata analizzata tramite la costruzione di un modello di regressione logistica. Il potenziale ruolo funzionale delle varianti associate alla leucopenia indotta da clozapina è stato valutato tramite il *tool* online GWAVA. Su tali varianti sono stati condotti studi funzionali tramite saggi basati sulla luciferasi, su una linea di cellule renali embrionali umane (HEK293), per valutare l'impatto delle varianti sull'attività trascrizionale.

Dopo il controllo di qualità, le analisi sono state condotte su 225 casi di leucopenia indotta da clozapina (dei quali 43 avevano anche neutropenia indotta da clozapina) e 1654 controlli (pazienti con schizofrenia, in trattamento con clozapina, che non hanno sviluppato leucopenia).

Tra le varianti comuni [frequenza dell'allele minore (MAF) > 1%], un locus in prossimità del gene *TRAC*, sul cromosoma 14, è stato associato in maniera significativa con la leucopenia indotta da clozapina (cinque varianti con $p < 5 \times 10^{-8}$). Tale gene codifica per la regione costante della catena alfa del recettore delle cellule T (TCR). Inoltre, due varianti rare hanno mostrato un'associazione significativa con la leucopenia:

rs4773794 (*DCT*) nel cromosoma 13 [MAF = 0,18%, odds ratio (OR) = 12,79, $p = 3,01 \times 10^{-10}$] e rs10512698 (*EEFSEC*) nel cromosoma 3 (MAF = 0,88%, OR = 4,79, $p = 1,09 \times 10^{-8}$).

Tre varianti comuni, localizzate in due locus, sono risultate associate alla neutropenia indotta da clozapina: rs116982346 (OR = 19,96, $p = 2,15 \times 10^{-8}$) sul cromosoma 3, in prossimità del gene *TRAT1*, e rs73482673 (OR = 12,05, $p = 3,30 \times 10^{-8}$) sul cromosoma 9. Inoltre, diverse varianti rare sono risultate associate alla neutropenia: rs9808117 nel gene *HECW2* sul cromosoma 2 (MAF = 0,64%, OR = 9,10, $p = 9,82 \times 10^{-9}$), rs373695 nel gene *F13A1* sul cromosoma 6 (MAF = 0,06%, OR = 74,83, $p = 1,36 \times 10^{-8}$), rs7501702 vicino al gene *MFAP4* sul cromosoma 17 (MAF = 0,33%, OR = 14,95, $p = 1,76 \times 10^{-8}$) e rs8024434 nel gene *NEO1* sul cromosoma 15 (MAF = 0,36%, OR = 19,39, $p = 4,83 \times 10^{-8}$).

La meta-analisi tra il GWAS del consorzio CIAC (161 casi e 1196 controlli) e il GWAS con *outcome* neutropenia associata a clozapina (43 casi e 1654 controlli) ha mostrato un locus con significatività prossima alla soglia *genome-wide* vicino al gene *HLA-B* sul cromosoma 6 (rs11753309, $p = 5,08 \times 10^{-8}$).

Cinque varianti sono state prioritizzate in base ai punteggi ottenuti tramite il *tool* GWAVA (rs377360 e rs4773794 per la leucopenia indotta da clozapina; rs9808117, rs8024434 e rs7501702 per la neutropenia indotta da clozapina) e il loro effetto sull'attività trascrizionale è stato valutato tramite saggio basato sulla luciferasi. È stato visto che l'allele T della variante rs377360 (associato ad aumento del rischio di leucopenia) e l'allele G della variante rs4773794 (protettivo per la leucopenia) aumentavano l'attività trascrizionale nelle cellule HEK293 rispetto all'altro allele ($p < 0,001$ per entrambi).

I limiti dello studio comprendono la mancanza di conoscenze relativamente al potenziale effetto funzionale di molte delle varianti identificate, l'assenza di informazioni relativamente ad altri fattori in grado di modificare la conta leucocitaria e l'incidenza rara della neutropenia indotta da clozapina e ancora di più dell'agranulocitosi indotta da clozapina (che non è stato possibile studiare in seguito allo sviluppo di soli sei casi).

Lo studio ha mostrato un'associazione tra diversi polimorfismi a singolo nucleotide e lo sviluppo di leucopenia o di neutropenia indotte da clozapina in pazienti di origine cinese con diagnosi di schizofrenia resistente al trattamento.

Parole chiave: clozapina, leucopenia, neutropenia, schizofrenia, GWAS

Riferimento bibliografico

[Chen J](#) et al. *Transl Psychiatry* 2021,11(1):343

GASTROENTEROLOGIA

L'INTEGRAZIONE DEI DATI DI OMICS IDENTIFICA LE REGIONI DEL GENE *ELOVL7* E *MMD* COME NUOVI LOCUS PER LA RISPOSTA DI ADALIMUMAB NEI PAZIENTI CON MALATTIA DI CROHN

A cura di Alessia Norbedo

La malattia di Crohn (MC) e la colite ulcerosa (UC) sono malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI), derivanti da una risposta infiammatoria impropria al microbiota in individui che presentano spesso una predisposizione genetica. Poiché il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF) è la citochina chiave nell'infiammazione, queste malattie sono state trattate sempre più frequentemente con agenti terapeutici anti-TNF, come adalimumab (ADA) ed infliximab (IFX). Senza dubbio gli agenti anti-TNF hanno migliorato significativamente la gestione di queste patologie croniche, ma d'altra parte, il 30% dei pazienti non risponde a tali trattamenti e, tra coloro che inizialmente ne beneficiano, fino al 40% perde la risposta. Inoltre, una terapia anti-TNF prolungata può ostacolare gravemente la qualità della vita dei

pazienti e aumentare il rischio che insorgano effetti avversi senza giustificazione clinica. Pertanto, l'identificazione dei predittori di risposta alla terapia anti-TNF è di fondamentale importanza, per identificare prontamente la terapia più idonea. Diversi studi si sono concentrati sul background genetico e sull'espressione genica come potenziali biomarcatori per la risposta al trattamento anti-TNF. Attualmente i marcatori genomici della risposta anti-TNF nel MC non sono ancora così significativi e praticamente non esiste riproducibilità tra marcatori genetici e di espressione. Inoltre i profili predittivi di risposta sono stati principalmente identificati utilizzando dati di espressione genica epiteliale per i quali è necessaria la colonscopia con biopsia, procedura altamente invasiva. Gli studi che si concentrerebbero su biomarcatori dell'espressione genica non invasiva, come l'espressione genica nelle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) per l'identificazione della risposta anti-TNF, sono scarsi e non omogenei in termini di terapia anti-TNF e classificazione della malattia. Pertanto, lo scopo del presente studio è stato quello di integrare i dati trascrittomici e genomici ottenuti dal sangue di pazienti affetti da MC, naïve rispetto al trattamento con il farmaco biologico anti-TNF adalimumab, utilizzando dati trascrittomici derivati da sangue periferico.

Sono stati integrati dati omici basati su 46 geni precedentemente identificati in coorti di pazienti con MC o artrite reumatoide (RA), che sono apparsi i più significativi per differenziare i *responder* dai *non responder* alla terapia anti-TNF. Inoltre sono stati inclusi quattro geni correlati ai cambiamenti di risultati endoscopici in pazienti con UC in terapia anti-TNF e tre geni espressi in modo differenziale tra pazienti con MICI che rispondevano o meno alla terapia anti-TNF come identificato da una meta-analisi. Inoltre sono stati considerati 12 marcatori genomici ed di espressione (RNA e proteine) confermati in modo indipendente e precedentemente integrati della risposta alla terapia anti-TNF nei pazienti con MC. Il pannello genetico di indagine costruito per il presente studio si è basato complessivamente su 65 geni candidati suggeriti in precedenza come potenziali predittori per la risposta alla terapia con diversi anti-TNF (infliximab, adalimumab, golimumab), individuati da studi che hanno considerato complessivamente 2126 pazienti con MICI e 34 con RA, trattati con terapia anti-TNF. Pertanto, in questo studio, previa approvazione del Comitato nazionale sloveno per l'etica medica (KME 80/10/07, 21p / 12/07), sono stati inclusi pazienti di etnia caucasica affetti da MC idonei al trattamento con adalimumab, che si erano dimostrati refrattari alla terapia con corticosteroidi o che avevano perso la risposta al trattamento con infliximab. A questi pazienti è stata somministrata una dose di carico di adalimumab pari a 160 mg, seguita da 80 mg dopo 14 giorni e da una dose di mantenimento di 40 mg a settimane alterne. In concomitanza alcuni pazienti assumevano azatioprina, aminosalicilati, corticosteroidi o antibiotici per cicli di decontaminazione.

Di questi pazienti sono stati studiati i marcatori genomici e di espressione (RNA e proteine) confermati in modo indipendente e precedentemente integrati della risposta alla terapia anti-TNF nei pazienti con MC. In primo luogo, è stata effettuata un'analisi RNA-seq utilizzando BGISEQ-500 su 3 *responder* e 3 *non responder* all'adalimumab. Sono stati confermati i geni espressi in modo differenziale dal pannello genetico identificato in precedenza.

I risultati hanno mostrato che *MMD*, *ELOVL7*, *BMP6*, *GPR84*, *EPSTI1*, *IFI6* e *MX1* sono espressi in modo significativamente differenziale dopo la correzione per confronti multipli. Rispettivamente i primi tre geni erano down-regolati nei *responder* rispetto ai *non responder*, mentre gli altri quattro risultavano up-regolati nei *responder* rispetto ai *non responder*. Successivamente, i geni confermati sono stati ulteriormente analizzati considerando i dati genomici ottenuti da 84 pazienti con MC, che erano naïve rispetto al trattamento con adalimumab, utilizzando un *microarray* per genotipizzazione e considerando un'analisi di associazione con risposta a 12 settimane. Le varianti a singolo nucleotide sono state analizzate utilizzando un margine di ± 100 kb dai geni confermati nell'analisi RNA-seq al fine di includere varianti nelle regioni geniche regolatorie. I risultati hanno identificato due segnali significativi dopo l'applicazione della correzione per confronti multipli: uno vicino al gene *MMD*, associato alla differenziazione da monociti a macrofagi, che può modulare la produzione di TNF e protossido di azoto (NO), e uno vicino alla regione del gene *ELOVL7*, che codifica un membro di 7 isoenzimi ELOVL che catalizzano la prima fase del ciclo di allungamento degli acidi grassi a catena molto lunga; per gli altri 5 geni non sono stati osservati segnali statisticamente significativi.

La genotipizzazione è stata eseguita utilizzando Infinium Global Screening Array e in queste regioni sono stati identificati i seguenti SNP associati alla risposta alla terapia anti-TNF nella MC: rs1465352, rs4422035, rs9892429, rs9893820 e rs11656766 situati a valle di *MMD* e rs9291695 e rs78620886 situati in regioni introni che del gene *ELOVL7*. Per *MMD* rs4422035 più significativo, l'analisi ha mostrato frequenze alleliche alternative più elevate nei *non responder* (allele C: 0,69) rispetto ai *responder* (allele C: 0,45) ($p = 0,018$; OR 0,22; CI 0,09-0,55). Un'ulteriore valutazione ha dimostrato che *MMD* rs4422035 e rs1465352 sono in *linkage disequilibrium* (D' : 1,0; r^2 : 0,87; $p < 10^{-4}$). *MMD* rs9892429, rs9893820 e rs11656799 hanno dimostrato *linkage disequilibrium* con rs1465352 (D' : 1,0; r^2 : 0,96; $p < 10^{-4}$). Un effetto simile è stato osservato anche per le varianti identificate nella regione del gene *ELOVL7*. Entrambe le varianti identificate hanno mostrato la stessa tendenza delle frequenze alleliche alternative. Per il più significativo rs78620886 l'analisi ha mostrato frequenze alleliche alternative più elevate nei *non responder* (allele A: 0,26) rispetto ai *responder* (allele A: 0,03) ($p = 0,021$; OR 0,05; CI 0,01-0,27). Ulteriori analisi hanno anche mostrato che rs78620886 è in *linkage disequilibrium* con rs9291695 (D' : 1,0; r^2 : 0,95; $p < 10^{-4}$). L'OR calcolato per l'allele alternativo per tutti questi SNP indica una maggiore probabilità di non risposta alla terapia con ADA. Inoltre, l'analisi funzionale per *MMD* rs1465352 e rs4422035 e *ELOVL7* rs78620886 ha dimostrato che questi SNP sono elencati in HaploReg v4.1 come marchio epigenetico di modifica dell'istone H3K9ac_Pro nei monociti e nei linfociti, rispettivamente. Le modifiche dell'istone sono implicate nei cambiamenti di espressione genica e la modifica dell'istone H3K9ac (*Histone 3 Lysine 9 acetylation*) può interferire con elementi regolatori critici necessari per la trascrizione. H3K9 è un residuo che può essere acetilato o metilato e H3K9ac ha dimostrato di essere notevolmente ridotto durante la condensazione cromosomica. Inoltre, H3K9ac è associato a promotori attivi ed è considerato un segno distintivo delle trascrizioni attive. Poiché *MMD* ed *ELOVL7* sono entrambi up-regolati nei *non responder* ad ADA, si ipotizza che le posizioni degli SNP di rs1465352, rs4422035 e rs78620886 potrebbero svolgere un ruolo significativo nelle modifiche dell'istone in termini di acetilazione dei residui di H3K9, determinando un aumento dell'espressione genica.

Il presente studio ha integrato i dati trascrittomici e genomici ottenuti dalle PBMC dei pazienti con malattia di Crohn (MC) e ha identificato due nuovi loci genetici, sui cromosomi 17 e 5, associati alla risposta anti-TNF nei pazienti con MC e ha suggerito *MMD* ed *ELOVL7* come migliori candidati predittivi per la risposta agli agenti anti-TNF. L'analisi funzionale ha dimostrato che le varianti rs1465352, rs4422035 e rs78620886 sono correlati al marchio epigenetico di modifica dell'istone H3K9ac_Pro. Dunque, questo studio ha rivelato che l'implicazione delle regioni geniche *MMD* ed *ELOVL7* nella risposta adalimumab può essere parte di una complessa interazione che si estende dal livello genetico a quello epigenetico e trascrittomico. Questa conoscenza potrebbe essere ulteriormente tradotta in nuovi biomarcatori clinici non invasivi per la risposta all'adalimumab nei pazienti con MC.

Parole chiave: farmacogenetica, anti-TNF, adalimumab, Morbo di Crohn (MC), polimorfismi a singolo nucleotide (SNP)

Riferimento bibliografico

[Gorenjak M](#) et al. *Sci Rep* 2021, 11:5449

LA METANALISI DEL MESE

ANALISI DELL'ASSOCIAZIONE TRA VARIANTI GENETICHE E L'INSORGENZA DI MUCOSITI INDOTTE DA METOTREXATO IN PAZIENTI ONCOLOGICI: UNO STUDIO DI REVISIONE SISTEMATICA E META-ANALISI

A cura della Dott.ssa Sarah Cargnin

Il metotrexato (MTX) è un antagonista dell'acido folico ed è una pietra miliare nel trattamento chemioterapico antineoplastico della leucemia linfoblastica acuta, dell'osteosarcoma e del linfoma non-Hodgkin. Nonostante sia riconosciuta la sua efficacia in tali condizioni patologiche, è noto come la sua somministrazione intravenosa ad alte dosi risulti nell'insorgenza di mucositi orali o gastrointestinali nel 10-40% dei pazienti, anche a fronte dell'assunzione concomitante di acido folinico (leucovorina). Tali mucositi possono ridurre la capacità da parte del paziente di assumere cibo o liquidi e possono esitare in una riduzione della dose o, addirittura, nell'interruzione dell'uso di MTX. A fronte del fatto che non siano noti fattori clinici predittivi dell'insorgenza di tali tossicità, diversi sforzi sono stati fatti per investigare l'eventuale ruolo della variabilità genetica individuale nel modulare il rischio di insorgenza di mucositi dopo somministrazione di MTX. I geni candidati più frequentemente investigati in tale contesto sono stati quelli aventi un ruolo chiave nella farmacocinetica (ad es. SLC19A1) o farmacodinamica (ad es. MTHFR) di MTX. Grande interesse è stato riposto anche nello studio di geni codificanti per i miRNA come potenziali predittori delle mucositi indotte da MTX. I risultati prodotti da tali studi sono stati spesso contrastanti tra loro e, per tale ragione, sono state condotte nell'ambito diverse revisioni sistematiche e meta-analisi. A fronte del fatto che tali meta-analisi abbiano anch'esse prodotto risultati inconsistenti e che, oltretutto, si fossero focalizzate su un numero ridotto di polimorfismi genetici, il presente studio si è proposto come obiettivo quello di condurre la prima revisione sistematica della letteratura finalizzata a raccogliere tutte le evidenze disponibili riguardo alla farmacogenetica delle mucositi indotte da MTX e di produrre, ove possibile, le più aggiornate stime meta-analitiche dell'associazione tra varianti genetiche e mucositi indotte dalla somministrazione di MTX in pazienti oncologici.

La revisione sistematica della letteratura è stata condotta nel mese di agosto del 2019 utilizzando Medline e Embase come *database* per la ricerca. Sono stati definiti come eleggibili tutti gli studi di associazione genetica (per geni candidati o *genome-wide*), pubblicati in lingua inglese, in cui il farmaco somministrato fosse MTX e in cui le mucositi fossero tra gli effetti avversi analizzati in pazienti oncologici. Per ciascuno studio eleggibile sono stati estratti i dati relativi a: primo autore, anno di pubblicazione, disegno dello studio, regime chemioterapico (dose di MTX, somministrazione o meno di acido folinico), popolazione arruolata (numerosità, età, sesso, etnia, tipologia di tumore), mucositi sperimentate (definizione, grado di severità e scala utilizzata) e varianti genetiche analizzate. Il *bias* di pubblicazione è stato valutato tramite Funnel plot e test di Egger in caso di almeno 10 studi disponibili. La qualità degli studi primari è stata valutata tramite i criteri STREGA. La meta-analisi è stata condotta qualora fossero disponibili almeno due studi primari in cui fosse analizzata la correlazione tra la medesima variante genetica e l'*outcome* in studio. Nello specifico, è stata applicata una meta-analisi ad effetti *random* e i modelli genetici utilizzati sono stati quello recessivo, allelico, dominante e *overdominant*. È stata stimata l'eterogeneità tra gli studi tramite test di Cochrane e indice di Higgins ed è stata effettuata una correzione per test multipli mediante False Discovery Rate (FDR). Per testare la robustezza dei risultati meta-analitici è stata condotta una *leave-one-out meta-analysis* e sono state prodotte, ove possibile, meta-analisi per sottogruppi nella popolazione pediatrica, nel sottogruppo di pazienti trattati con alte dosi di MTX somministrato per via intravenosa e nei pazienti affetti da leucemia linfoblastica acuta.

Dalla ricerca bibliografica sono emersi 259 risultati, di cui 57 sono stati inclusi nella sintesi qualitativa. Di questi 57, 26 sono stati, invece, inclusi nella meta-analisi. Tutti gli studi sono stati pubblicati dal 2005 in avanti e il disegno di studio è stato per geni candidati in tutti i lavori ad eccezione di uno, in cui è stato adottato un approccio di tipo *genome-wide*. I pazienti arruolati sono stati un totale di 7269, di cui la maggior parte di etnia caucasica o asiatica, di età pediatrica (43 studi su 57) ed affetti da leucemia linfoblastica acuta (42 studi su 57). Il regime chemioterapico adottato a base MTX variava molto da studio a studio: tuttavia, in 50 studi, MTX è stato somministrato per via intravenosa in un dosaggio variabile da 1 a 12 g/m². La scala di valutazione della severità delle mucositi adottata nei diversi studi è stata principalmente la NCI CTCAE (v 1.0-5.0). I geni analizzati negli studi primari sono risultati essere coinvolti nella farmacodinamica (n=12) e nella farmacocinetica (n=11) di MTX.

Di tutte le varianti analizzate, 7 sono state quelle per le quali è stato possibile condurre una meta-analisi. Nello specifico, la variante più estensivamente studiata nell'ambito ($N_{\text{studi}}=38$) è stata MTHFR rs1801133 (C>T) e dalla meta-analisi è emerso come i soggetti con genotipo TT risultassero avere un maggior rischio di sviluppare mucositi rispetto agli altri genotipi (OR 2.53, 95% CI 1.48-4.32, P_{FDR} : 0.011, $I^2=45\%$). Non è emerso rischio di *publication bias* per tale variante e le analisi di sensibilità hanno confermato la robustezza della stima meta-analitica. Tale risultato si è confermato come statisticamente significativo nel sottogruppo di pazienti riceventi MTX per via endovenosa (P_{FDR} : 0.023) ma non in quello dei pazienti pediatrici o di quelli affetti leucemia linfoblastica acuta. La seconda variante più studiata è stata SLC19A1 rs1051266 (G>A), analizzata in 18 studi. Dalla meta-analisi è emerso come l'essere portatori dell'allele A conferisca un rischio minore di mucositi rispetto all'allele G (OR 0.52, 95% CI 0.32-0.85, P_{FDR} : 0.0, $I^2=69\%$). Come per la variante precedente, non è emerso rischio di *publication bias*, la stima è risultata essere robusta e la significatività statistica si è confermata solo nel sottogruppo di pazienti trattati con MTX per via endovenosa (P_{FDR} : 0.036). Anche lo SNP MTRR rs1801394 (A>G) è risultato essere associato all'*outcome* in studio nel modello *overdominant* ($N_{\text{studi}}=4$, OR 2.08, 95% CI 1.16-3.73, P_{FDR} : 0.042, $I^2=11\%$). Tuttavia, le analisi di sensibilità non hanno confermato la robustezza della stima meta-analitica. Le rimanenti 4 varianti meta-analizzate (TYMS rs34743033, ABCC2 rs717620, SLC01B1 rs11045879, miR1206G>A) non hanno mostrato un'associazione statisticamente significativa con il rischio di insorgenza di mucositi indotte da MTX.

Il presente studio rappresenta la revisione sistematica e meta-analisi più completa ed aggiornata di cui si dispone ad oggi nell'ambito. Di tutte le varianti meta-analizzate, lo SNP MTHFR rs1801133 (C>T) si è dimostrato essere la variante per la quale esistono le evidenze più robuste a supporto di un suo ruolo come fattore genetico predittivo del rischio di insorgenza di mucositi indotte da MTX, soprattutto quando somministrato per via endovenosa. Per quanto riguarda le altre varianti meta-analizzate, nonostante siano emerse in alcuni casi stime di associazione statisticamente significative (SLC19A1 rs1051266, MTRR rs1801394), gli Autori sottolineano come il loro ruolo come fattori farmacogenetici in tale ambito non sia ancora del tutto elucidato e suggeriscono la conduzione di studi futuri, di idonee dimensioni campionarie, capaci di chiarirne il reale valore come fattori predittivi dell'insorgenza di mucositi indotte da MTX in pazienti oncologici.

La variante MTHFR rs1801133 è risultata essere associata nel modello recessivo al rischio di mucosite nei pazienti oncologici trattati con metotrexato.

Parole chiave: metotrexato, MTHFR, oncologia

Riferimento bibliografico

[Maagdenberg H](#) et al. *Crit Rev Oncol Hematol* 2021,161:103312



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	Dott. Salvatore Terrazzino (Università del Piemonte Orientale)
Coordinatore	Dott.ssa Valentina Boscaro (Università di Torino)
Caporedattore	Dott. Gabriele Stocco (Università di Trieste)
Hanno contribuito a questo numero:	Dott.ssa Sarah Cargnin (Università del Piemonte Orientale) Dott.ssa Francesca Gorini (Università di Bologna) Dott.ssa Alessia Norbedo (Università di Trieste) Dott.ssa Claudia Pisanu (Università di Cagliari) Dott.ssa Gloria Ravegnini (Università di Bologna) Dott.ssa Giulia Zudeh (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](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.
