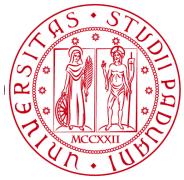


UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Università degli Studi di Padova

Dipartimento di SCIENZE DEL FARMACO

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE FARMACOLOGICHE

Indirizzo: Farmacologia, Tossicologia e Terapia

CICLO XXV

TITOLO TESI

TAMOXIFEN NEL TRATTAMENTO DEL CARCINOMA MAMMARIO: STUDIO DEI FATTORI PREDITTIVI DI RISPOSTA

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Pietro Giusti

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Pietro Palatini

Supervisore :Ch.mo Prof. Roberto Padrini

Supervisore esterno: Dr.ssa Milena Gusella

Dottorando : Laura Bertolaso

INDICE

RIASSUNTO **1**
ABSTRACT **3**
1. INTRODUZIONE **5**
Il tumore della mammella 5
1.1 Epidemiologia 5
1.2 Classificazione istopatologica e molecolare del tumore mammario 6
1.3 Trattamento del tumore mammario 8
1.3.1 Chirurgia 8
1.3.2 Radioterapia 9
1.3.3 Chemioterapia 10
1.3.4 Terapia anti-estrogenica 10
1.4 Tamoxifen 11
1.4.1 Meccanismo d'azione 11
1.4.2 Assorbimento e metabolismo 12
1.5 *CYP2D6* 14
1.6 UGTs 17
1.7 I recettori degli estrogeni 17
1.7.1 Recettore alpha e isoforme 19
1.7.2 Recettore beta e isoforme 24
2. SCOPO DELLO STUDIO **27**
3. MATERIALI E METODI **29**
3.1 Soggetti 29
3.2 Dosaggio su plasma di tamoxifen e dei metaboliti 29
3.3 Test di Fenotipizzazione di CYP2D6 31
3.4 Genotipizzazione di *CYP2D6* 32
3.5 Analisi in vitro dei recettori degli estrogeni (α e β) e isoforme 35
3.5.1 Linea cellulare: MCF7-βcx 35
3.5.2 Estrazione RNA dalle cellule MCF7-βcx 37
3.5.3 Analisi dell'espressione genica mediante RT-qPCR 38
3.6 Analisi statistica 39
4. RISULTATI **41**

4.1 Test di fenotipizzazione 41
4.2 Dosaggio di tamoxifen e dei metaboliti 42
4.3 Associazioni tra livelli di tamoxifen e metaboliti dopo il primo mese di terapia e allo stato stazionario 44
4.4 Associazione tra test di fenotipizzazione con destrometorfano e livelli di endoxifen 46
4.5 Associazione tra test di fenotipizzazione con destrometorfano e vie metaboliche di tamoxifen e metaboliti 48
4.6 Genotipizzazione di *CYP2D6* 49
4.7 Associazione tra test di fenotipizzazione con destrometorfano e genotipo di *CYP2D6* 50
4.8 Correlazione tra genotipo di *CYP2D6* e concentrazione plasmatiche di endoxifen 51
4.9 Analisi degli effetti collaterali in corso di trattamento con tamoxifen 52
4.10 Effetto inibitorio dell'isoforma del recettore degli estrogeni β2 sull'azione anti-estrogenica di endoxifen 53
5. DISCUSSIONE 57
6. BIBLIOGRAFIA 67

RIASSUNTO

La malattia tumorale maligna della mammella rappresenta ad oggi la neoplasia a più alta incidenza nel sesso femminile e la principale causa di mortalità nei paesi occidentali. Il tumore mammario positivo per gli estrogeni rappresenta il sottotipo più frequente (60-80%) per il cui trattamento è previsto l'impiego del modulatore estrogenico selettivo tamoxifen.

Tamoxifen ha una efficacia largamente riconosciuta nella fase adiuvante (post-chirurgica) dei tumori in stadio iniziale, tuttavia in una percentuale rilevante di pazienti la malattia si ripresenta. Il nostro studio si pone l'obiettivo di indagare i possibili fattori implicati nel fallimento terapeutico del trattamento con tamoxifen nelle pazienti affette da tumore mammario infiltrante, positivo agli estrogeni, non metastatico.

Tamoxifen è un pro-farmaco ampiamente metabolizzato dal citocromo epatico P450 CYP2D6 in metaboliti più attivi e potenti rispetto al farmaco parentale. Tra questi ha recentemente assunto particolare rilievo il metabolita attivo endoxifen, ritenuto il principale responsabile della risposta terapeutica poiché, oltre a possedere un'elevata affinità per il suo target molecolare, il recettore per gli estrogeni alpha (Erα), presenta livelli plasmatici più elevati in confronto al metabolita similmente attivo 4-idrossitamoxifen.

Numerosi studi hanno dimostrato che il gene dell'enzima *CYP2D6* è altamente polimorfico nella popolazione, a causa di variazioni nella sequenza genica che determinano alterazioni funzionali, con riduzione parziale o azzeramento della attività enzimatica. Tuttavia le differenze inter-individuali nella esposizione ad endoxifen, riscontrate clinicamente, non risultano essere spiegate unicamente dai polimorfismi del gene *CYP2D6,* poichè la sua attività risulta significativamente influenzata anche da cause cosiddette ambientali (ad esempio farmaci inibitori dell'enzima). Ne deriva la necessità di individuare altri strumenti per la determinazione della capacità delle singole pazienti di attivare il tamoxifen, mantenendo come parametro di riferimento i livelli plasmatici del metabolita attivo endoxifen. Quest'ultimo non può essere usato direttamente per predire la capacità metabolica del CYP2D6 quando maggiormente necessario, cioè prima o nelle prime fasi del trattamento farmacologico, perché, a causa dei prolungati tempi di emivita del farmaco e dei suoi derivati, il raggiungimento dei livelli

plasmatici di stato stazionario (indicativi delle concentrazioni a cui sono esposte le pazienti per i cinque anni di terapia) richiede mediamente quattro mesi.

Infine, oltre alla esposizione al metabolita attivo, un altro fattore predittivo di risposta potrebbe includere il bersaglio molecolare del farmaco, il recettore per gli estrogeni. Numerosi studi hanno confermato la co-espressione nei tessuti tumorali e sani mammari di isoforme di splicing alternativo alle due forme complete dei recettori estrogenici, Erα ed Erβ. Più recententemente, uno studio in vitro ha rivelato come la forma completa Erβ sia in grado di sensibilizzare le cellule all'azione di endoxifen.

Per la valutazione della capacità individuale di attivazione del tamoxifen, superando i limiti della genotipizzazione, abbiamo utilizzato due modalità, il test di fenotipizzazone del CYP2D6 mediante il farmaco sonda destrometorfano e la determinazione dei livelli di endoxifen al primo mese, in fase pre-stazionaria, e li abbiamo correlati ai livelli di endoxifen allo stato stazionario. Abbiamo dimostrato che i risultati del test di fenotipizzazione e i livelli di endoxifen al primo mese sono molto significativamente associati ai livelli di esposizione al metabolita attivo endoxifen allo stato stazionario e possono essere considerati informativi dello status metabolico del singolo paziente.

L'analisi genetica del *CYP2D6* condotta sui soggetti arruolati ha confermato l'influenza dei polimorfismi sui livelli plasmatici di endoxifen; la genotipizzazione è anche significativamente associata al test di fenotipizzazione.

Il possibile ruolo di una isoforma recettoriale estrogenica, Erβ2, sulla attività di endoxifen è stata valutata, *in vitro,* utilizzando l’induzione della trascrizione di due geni sensibili agli estrogeni. Mediante analisi dell'espressione di *ADORA1* ed *IL20* è emerso che, in presenza di concentrazioni di endoxifen di 40nM per intervalli di tempo prolungati (24h), l'isoforma Erβ2 co-espressa con Erα riduce l’azione inibitoria di endoxifen rispetto alla presenza di solo Erα.

ABSTRACT

Breast cancer is the tumor with highest incidence in women and the first leading cause of mortality in Western countries. The estrogen receptor positive breast cancer subtype is the most frequent (60-80%) and for its treatment the selective estrogen receptor modulator tamoxifen can be used.

Tamoxifen efficacy is widely recognized in the adjuvant setting (post-surgical) of early stages tumors, however, in a significant percentage of patients disease recurs. The aim of our study was to investigate possible factors contributing to the therapeutic failure of tamoxifen treatment in invasive non-metastatic estrogen receptor positive breast cancer patients.

Tamoxifen is a pro-drug extensively metabolized by the hepatic cytochrome P450 CYP2D6 into more active and powerful metabolites compared to the parental drug. Among these it has been recently taken into special account the active metabolite endoxifen, which is considered the main responsible for the therapeutic response because of its high affinity for the molecular target, the estrogen receptor alpha (Erα) and because it shows higher plasma levels compared to the similarly active metabolite 4-idrossitamoxifen.

Several studies have demonstrated that the gene of CYP2D6 enzyme is highly polymorphic in the population, due to variations in the gene sequence which result in functional alterations, with partial reduction or total elimination of the enzymatic activity. However, the inter-individual differences in endoxifen exposure, clinically observed, are not only explained by *CYP2D6* gene polymorphisms, as its activity is significantly influenced also by environmental causes (such as drugs that inhibit the enzyme). Hence the need to identify new ways to predict individual ability of patients to activate tamoxifen, keeping endoxifen plasma levels as a reference parameter. The latter cannot be directly used to estimate the metabolic capacity of CYP2D6 when mostly needed, thas is before or in the early phases of drug treatment, because, due to the prolonged half-life of the drug and its derivatives, the achievement of steady state plasma levels (indicative of concentrations to which patients are exposed for five years of therapy) takes an average of four months.

Finally, in addition to the exposure to the active metabolite, another predictive factor of response may include the molecular target of the drug, the estrogen

receptor. It has been confirmed by numerous studies that in tumor and healthy mammary tissue estrogen receptor splicing isoforms of Erα and Erβ are coexpressed with the full-length proteins. Recently, an in vitro study revealed that the wild-type Erβ enhanced the antiestrogenic action of endoxifen.

For the evaluation of the individual capacity in tamoxifen activation, to overcome genotyping limitations, two strategies were used: the phenotyping test of CYP2D6 by the probe drug dextromethorphan and the determination of endoxifen plasma levels at the first month (previous to the steady state).

We have shown that the results of phenotyping test and levels of endoxifen at the first month are significantly associated with endoxifen steady state levels and both can be considered as informative tools to know the metabolic status of the individual patient.

The influence of polymorphisms on endoxifen plasma levels was confirmed by genetic analysis of the *CYP2D6* in our population; the genotyping results were also significantly associated with those of phenotyping test.

The possible role of an estrogen receptor isoform, Erβ2, on the activity of endoxifen was evaluated, *in vitro*, by monitoring the transcription of two estrogens sensitive genes. Through analysis of expression of *IL20* and *ADORA1* it was found that, in the presence of concentrations of endoxifen of 40nM for prolonged time (24h), the isoform Erβ2, co-expressed with Erα, reduced the inhibitory action of endoxifen compared to the presence of only Erα.

1. INTRODUZIONE

Il tumore della mammella

1.1 Epidemiologia

Il carcinoma mammario rappresenta, nel mondo, il tumore più frequentemente diagnosticato e la principale causa di mortalità nel sesso femminile costituendo il 23% (~ 1.38 milioni) del totale dei nuovi casi di tumore ed il 14% (~ 458.400) delle cause di mortalità nell'anno 2008. La metà dei casi e circa il 60% delle morti riguardano i Paesi più economicamente sviluppati. (Jemal A et al., Ca Cancer J Clin, 2011).

Incidenza e mortalità presentano ampi margini di variabilità a livello internazionale, registrando alti tassi di incidenza tra la popolazione europea e degli Stati Uniti d'America (esclusi afro-americani ed ispanici) mentre valori più bassi si riscontrano in Africa, Asia e Sud-America.

Tra i fattori che contribuiscono a questa variabilità si ritrovano in gran parte fattori legati alla riproduzione e allo status ormonale, oltre alla disponibilità di puntuali servizi diagnostici, tra i quali la mammografia, in grado di rilevare precocemente la malattia tumorale.

I fattori riproduttivi che aumentano il rischio di cancro mammario includono un menarca precoce, nulliparità ed età avanzata alla prima gravidanza, uso recente di contraccettivi orali e terapia ormonale sostitutiva in post-menopausa. Non da ultimo anche l'assunzione di alcol, l'inattività fisica e l'obesità contribuiscono ad aumentare il rischio di tumore alla mammella (Jemal A et al., Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2010).

In Italia si registrano ogni anno 47.000 nuovi casi ed il cancro della mammella occupa circa il 29% di tutte le diagnosi tumorali classificandosi come la patologia più frequente nel sesso femminile, anche per classe d'età. (dati Airtum, Epidemiol Prev, 2011).

In circa il 60% delle pazienti con età inferiore ai 50 anni il tumore presenta positività per i recettori degli estrogeni; percentuale destinata a salire all'80% nelle donne in post-menopausa (Anderson WF et al., 2002).

1.2 Classificazione istopatologica e molecolare del tumore mammario

La malattia tumorale mammaria si presenta con un elevato grado di eterogenicità e complessità.

Dal punto di vista patologico i tumori mammari possono essere classificati in differenti sottotipi ognuno dei quali determina una diversa strategia di trattamento e una relativa prognosi. Generalmente la classificazione avviene secondo parametri indicativi dello stadio tumorale (grandezza, invasività e stato metastatico), del grado (differenziamento), dell'origine (es. duttale o lobulare) e dell'espressione recettoriale (staining immunoistochimico del recettore degli estrogeni e del recettore del progesterone e caratterizzazione dei livelli di HER2/ERBB2) (Zwart W et al., 2010).

La suddivisione macroscopica secondo istologia prevede la suddivisione dei tumori mammari in due grandi aree: carcinoma in situ e carcinoma invasivo o infiltrante. Questi poi sono soggetti ad ulteriori sub-classificazioni (Figura 1).

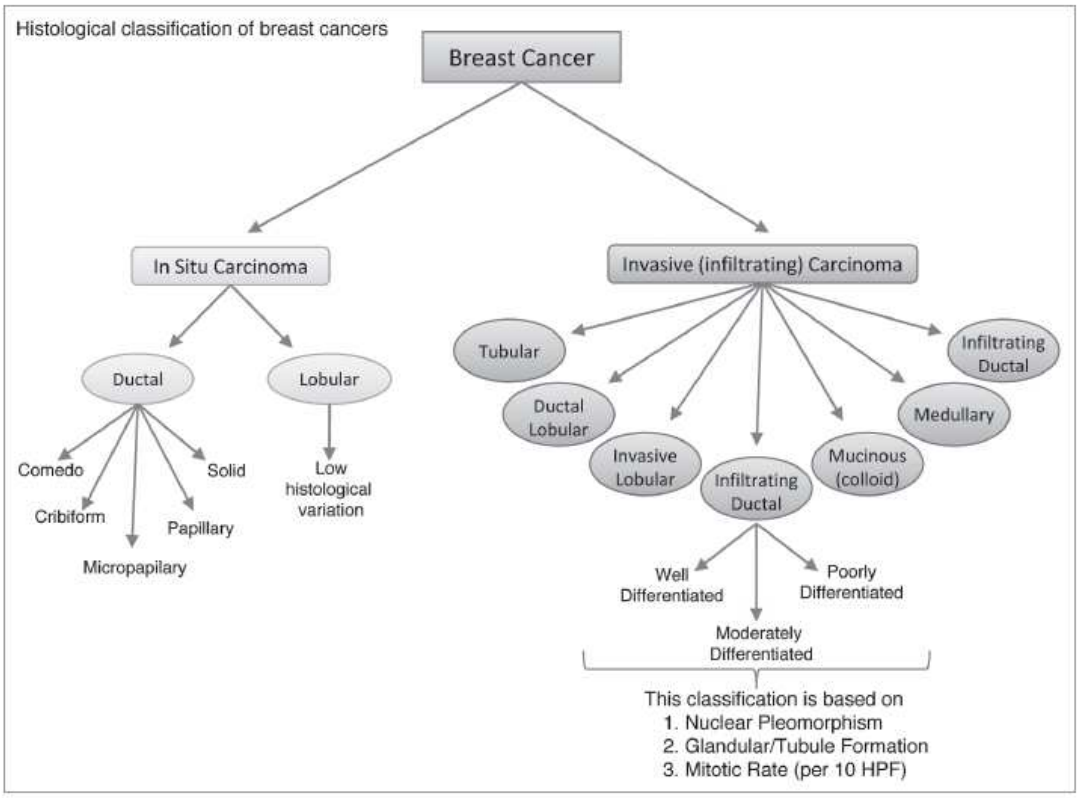


Figura 1. Classificazione istologica dei sottotipi di tumore mammario. Lo schema rappresentato, correntemente usato dai clinici, classifica l'eterogenicità riscontrata nel tumore mammario basato sulle proprietà strutturali e di crescita. (Malhotra GK et al., Cancer Biology&Therapy, 2010).

Con l'avvento della tecnologia dei microarray è stato possibile dimostrare che, in accordo ai profili di espressione genica, i differenti tumori mammari potevano essere stratificati in cinque sottotipi dalle distinte caratteristiche molecolari: normale breast-like, basale, luminale A, luminale B e tumori con aumentata espressione del recettore per il fattore di crescita epidermico HER2 (codificato dal gene *ERBB2*). Più recentemente anche un altro nuovo sottotipo classificato come a basso contenuto delle proteine denominate claudine (claudin low) è stato identificato. (Figura 2).

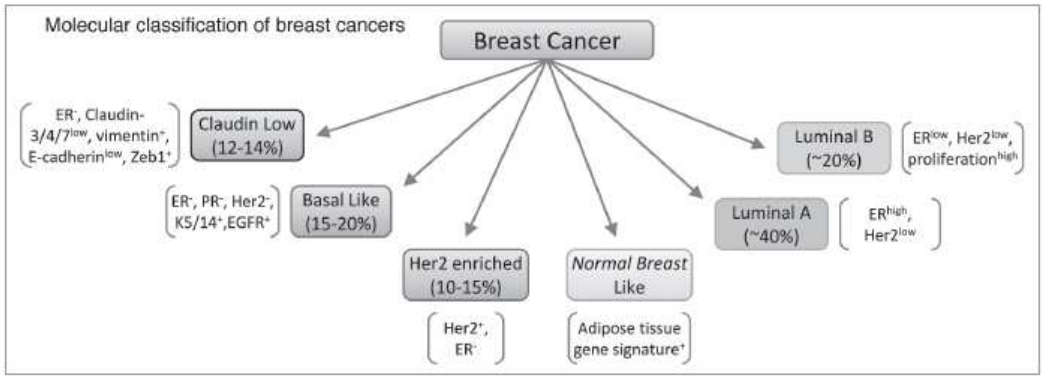


Figura 2. Classificazione molecolare del tumore mammario. Questa classificazione è basata sulle caratteristiche molecolari intrinseche di ciascun sottotipo tumorale identificato mediante analisi di microarray in campioni di tumore. (Malhotra GK et al. Cancer Biology&Therapy, 2010).

I tumori mammari classificati come luminali, comprendono il 70% della casistica e sono tipicamente tumori positivi per il recettore degli estrogeni e si presentano più frequentemente con grado G1 (ben differenziati). La classificazione molecolare ha individuato due sottotipi di tumori con positività estrogenica. Il cosiddetto luminale A mostra una prognosi migliore rispetto al luminale B che presenta un'aggressività maggiore esibendo una più marcata capacità proliferativa.

I tumori HER2/ERBB2 sono caratterizzati da un'accentuata espressione dell'oncogene *ERBB2*, solitamente dovuta all'amplificazione della regione genomica chr17q21. Questi tumori presentano tipicamente una crescita più rapida rispetto ai tumori luminali, e una minore differenziazione con una prognosi peggiore.

Il sottotipo basale, altrimenti definito triplo negativo (negativo per l'espressione dei recettori estrogenico, progestinico ed epidermico HER2) presenta molto spesso un grado G3 (scarso differenziamento) e una prognosi sfavorevole.

1.3 Trattamento del tumore mammario

Il trattamento del tumore mammario prevede due approcci di trattamento, locale e sistemico, che sono combinati fra loro in base alle caratteristiche del tumore.
L'approccio locale mira, tramite intervento chirurgico, prima, e trattamento radioterapico ove previsto in seguito, ad eliminare le cellule cancerose che sono localizzate a livello del tessuto mammario.
I trattamenti sistemici invece hanno lo scopo di colpire quelle cellule neoplastiche che hanno lasciato il distretto di origine per diffondersi a livello dell'intero organismo, coinvolgendo altri organi. Essi sono condotti tramite l'impiego di farmaci chemioterapici in associazione (polichemioterapia) o in regime monoterapico, sebbene quest'ultimo sia oggi meno frequente. Tali cure possono essere previste sia in neoadiuvante, ossia impiegate in fase preoperatoria, o in adiuvante, quando cioè il trattamento citotossico è effettuato a seguito della resezione tumorale chirurgica. Un altro trattamento considerato sistemico è quello effettuato tramite la somministrazione di farmaci anti-estrogenici, previsti in quei casi in cui la neoplasia mammaria sia istologicamente positiva per l'espressione dei recettori estrogenici.

1.3.1 Chirurgia

Il primo trattamento del tumore mammario è rappresentato dalla chirurgia, quale base di partenza per l'eradicamento della patologia maligna.
L'approccio chirurgico può essere di tipo radicale, prevedendo cioè la completa asportazione della mammella interessata dal tumore, definita tecnicamente mastectomia, o di tipo conservativo (tumorectomia o quadrantectomia), col fine di preservare il più possibile l'aspetto estetico mantenendo però gli stessi benefici terapeutici.

Nel corso degli anni sono stati fatti molteplici passi in avanti nel trattamento chirurgico grazie anche a studi di follow-up che hanno indicato come nei casi di tumori mammari agli stadi iniziali una chirurgia di tipo conservativo possa essere efficace, quanto una maggiormente demolitiva, incidendo però notevolmente sulla qualità di vita delle pazienti. Questa indicazione nasce sulla base di studi scientifici di analisi della sopravvivenza a lungo termine in cui era stato confrontato il tasso di mortalità in donne che, a parità di dimensioni e caratteristiche tumorali, avevano subìto una mastectomia piuttosto che una meno invasiva quadrantectomia. I dati emersi hanno evidenziato che non esisteva differenza in termini di sopravvivenza a lungo termine nei due gruppi (Veronesi U et al., 2002).

Un'altra valutazione ha modificato l'approccio chirurgico riguardante la dissezione completa del cavo ascellare: la ricerca e l'analisi del cosiddetto linfonodo sentinella. Il linfonodo sentinella è il primo linfonodo drenante del tumore che viene individuato mediante traccianti radioattivi o coloranti vitali in seguito ad iniezione degli stessi nel tessuto peritumorale al fine di stabilire se esso sia coinvolto da metastasi. E' stato dimostrato che laddove non vi sia positività non si rende necessaria l'asportazione completa della catena linfatica ascellare consentendo alle pazienti di continuare a beneficiare dall'azione dei linfonodi sani (Veronesi U et al., 2010).

1.3.2 Radioterapia

La terapia radiante viene prescritta in qualità di trattamento complementare alla chirurgia di tipo conservativo. Si tratta del trattamento loco-regionale mediante radiazioni ionizzanti finalizzate all'eradicazione delle micrometastasi che possono sfuggire alla resezione chirurgica. I benefici clinici di tale trattamento nelle pazienti sottoposte a radioterapia dopo chirurgia conservativa sono stati recentemente confermati dal gruppo Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) dimostrando che vi è una significativa diminuzione nel rischio di ricorrenza della malattia del 16% e un ridotto rischio di mortalità quando tale trattamento fa sèguito alla chirurgia conservativa.

1.3.3 Chemioterapia

Per il trattamento dei tumori della mammella sono disponibili svariati chemioterapici, impiegati in monoterapia o in combinazione. I più usati sono le antracicline (ad esempio epirubicina e doxorubicina), i taxani (docetaxel e paclitaxel), derivati del fluoro (5-fluorouracile e capecitabina), metotrexate, vinorelbina, gemcitabina, derivati del platino (ad esempio, cisplatino e carboplatino).

I regimi di combinazione sono caratterizzati dall'associazione di più farmaci, secondo schemi diversi. Le associazioni più adottate nella pratica clinica sono: AC (doxorubicina e ciclofosfamide), CMF (ciclofosfamide, metotrexate e 5-fluorouracile), FEC (5-fluorouracile, epirubicina e ciclofosfamide), A CMF (doxorubicina e a seguire ciclofosfamide, metotrexate e 5-fluorouracile), E-CMF (epirubicina e a seguire ciclofosfamide, metotrexate e 5-fluorouracile), AT CMF (doxorubicina/paclitaxel e a seguire ciclofosfamide, metotrexate e 5-fluorouracile), AC- paclitaxel o docetaxel (doxorubicina e ciclofosfamide e a seguire paclitaxel o docetaxel).

1.3.4 Terapia anti-estrogenica

La scoperta del coinvolgimento del sistema endocrino nella progressione della neoplasia mammaria risale alla fine dell'800, quando Beatson dimostrò che la regressione della malattia in donne in pre-menopausa affette da carcinoma mammario metastatico era dovuta all'ablazione ovarica a cui erano state sottoposte (Beatson GT, 1896).

Da quel momento in poi è stata riconosciuta la centralità del ruolo del recettore degli estrogeni nella comparsa e nella progressione del tumore mammario, dando origine allo sviluppo di farmaci relativamente sicuri ed efficaci che sono in grado di modulare negativamente la proliferazione delle cellule maligne ormono-responsive, i cosiddetti SERMs (Selective Estrogen Receptors Modulators).

1.4 Tamoxifen

Allo stato attuale il farmaco d'elezione per il trattamento e la prevenzione della malattia tumorale mammaria con positività per i recettori estrogenici nelle pazienti in pre-menopausa è il tamoxifen (TAM). Nelle pazienti in post-menopausa può essere prescritto in alternativa o in sequenza con i farmaci inibitori delle aromatasi.

Inizialmente introdotto senza successo come farmaco contraccettivo, alla fine degli anni '70 fu approvato dalla Food & Drug Administration (FDA), dapprima per la terapia antiormonale del tumore mammario positivo agli estrogeni in stadio avanzato, poi nel 1986 per il trattamento adiuvante del tumore mammario iniziale e più tardi negli anni '90 per la terapia adiuvante in donne in pre- e post-menopausa con neoplasia maligna senza coinvolgimento linfonodale (Shao W and Brown M, 2003).

Tamoxifen è un SERM non-steroideo di prima generazione usualmente prescritto in più di 120 Paesi nel mondo come componente della terapia standard in adiuvante del tumore mammario positivo per gli estrogeni, sia esso allo stadio inziale o metastatico.

È stato dimostrato che nei tumori mammari primari la terapia adiuvante con TAM ha significativamente ridotto i tassi di recidiva e di mortalità nelle pazienti in pre- e post-menopausa. È inoltre impiegato nella prevenzione del carcinoma infiltrante nelle donne in pre-menopausa ad alto rischio. (Jordan VC, 2008). Infatti secondo lo studio BCRT (Breast Cancer Prevention Trial) tamoxifen è indicato nella terapia preventiva poiché è in grado di ridurre l'incidenza del tumore mammario estrogenico positivo fino al 50% (Wolmark N and Dunn BK,2001).

1.4.1 Meccanismo d'azione

L'attività farmacologica del tamoxifen è esplicitata attraverso il delicato bilancio tra le proprietà di antagonista e di agonista che il farmaco possiede. E' stato dimostrato che esso svolge un'azione antagonista a livello del tessuto mammario mentre presenta un profilo farmacologico da agonista parziale nel tessuto osseo,

nel sistema cardio-vascolare e nel fegato, dove in quest'ultimo interviene nella modulazione dei livelli lipidici sierici (Shao W and Brown M, 2003).
Infatti TAM preserva dalla demineralizzazione le cellule ossee, e aiuta a mantenere un profilo lipidico sierico protettivo, riducendo così il rischio di eventi coronarici (Bai Z and Gust R, 2009).
Nonostante i molteplici effetti positivi di tamoxifen non è da trascurare e sottovalutare l'azione agonistica a livello uterino, la quale rappresenta l'effetto avverso più grave poiché responsabile dell'aumentata incidenza di cancro dell'endometrio come conseguenza dell'iperplasia uterina indotta da TAM (Fisher B et al., 1994; Assikis VJ and Jordan VC, 1995). L'effetto stimolatorio o inibitorio del tamoxifen è quindi strettamente correlato al tessuto su cui agisce.
In vivo, TAM, esercita la sua azione anti-estrogenica legandosi competitivamente al recettore degli estrogeni (ER), sottraendo all'estradiolo la possibilità di legarsi al recettore. In questo modo viene bloccata la proliferazione cellulare estradiolo-mediata, quale meccanismo fondamentale per la sopravvivenza e la crescita del tumore. La mediazione della risposta farmacologica avviene anche attraverso il reclutamento di co-repressori e co-attivatori che interagiscono con i promotori bersaglio.
I benefici clinici del tamoxifen continuano ad essere evidenti nelle pazienti trattate, tuttavia in una percentuale di donne in trattamento, che può arrivare fino al 50%, vi è una ripresa della malattia (Early Breast Cancer Trialist' Collaborative Group Lancet 2005).

1.4.2 Assorbimento e metabolismo

Tamoxifen viene rapidamente assorbito dopo somministrazione per via orale. A causa della prolungata emivita di TAM (5-7 giorni) e dei suoi metaboliti (14-21 giorni) le concentrazioni allo stato di equilibrio (stazionario) sono raggiunte mediamente dopo qualche mese in seguito all'assunzione giornaliera e continutiva di una dose da 20 mg. Il farmaco dimostra inoltre un elevato legame all'albumina plasmatica (>99%).
Il metabolismo di TAM coinvolge delle vie che sono comuni nei diversi individui, tuttavia la variabilità inter-individuale che si registra nella efficacia della terapia

con tamoxifen può essere parzialmente spiegata dalla diversa capacità di ciascun paziente di bio-trasformare il tamoxifen. Quest'ultimo può essere considerato come un classico pro-farmaco che a seguito della somministrazione per via orale, viene normalmente convertito, per opera di alcuni enzimi epatici, in metaboliti ad attività notevolmente superiore rispetto al TAM (Riggs BL and Hartmann LC, 2003).

Tamoxifen è ampiamente metabolizzato da enzimi di fase I e fase II presentando una debole affinità di legame per il recettore degli estrogeni (ERα), paragonabile al solo 1.8% dell'affinità del ligando fisiologico, il 17β-estradiolo.

Il metabolita maggiore N-desmetiltamoxifen è formato mediante N-demetilazione principalmente dall'azione dei citocromi CYP3A4 e CYP3A5, e in misura minore dal CYP2D6 e altri enzimi (Figura 3). Sebbene esso presenti livelli plasmatici doppi rispetto al farmaco di partenza, N-desmetiltamoxifen mostra comunque una debole affinità per ERα, molto simile a quella di TAM.

Un altro metabolita, che si forma in seguito alla reazione di 4-idrossilazione di TAM da parte di CYP2D6, è il 4-idrossitamoxifen (4OHtam). Quest'ultimo risulta avere un ruolo importante come metabolita attivo in quanto la sua affinità per ERα supera di 100 volte quella di TAM, manifestando una potenza dalle 30 alle 100 volte superiore rispetto al farmaco parentale nel sopprimere la proliferazione cellulare ormono-dipendente.

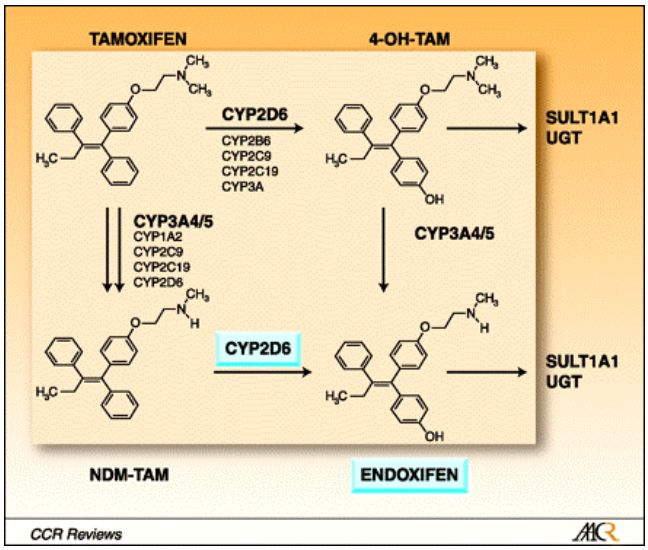


Figura. 3. Schema sintetico della bio-trasformazione di TAM. 4-OH-TAM, 4-idrossitamoxifen; CYP, citocromo P450 isoenzima; SULT1A1, sulfoniltransferase 1A1; UGT, UDP-glucoroniltransferase; NDM-TAM, N-desmetiltamoxifen (Dezentjé VO et al., 2009).

Per opera dello stesso enzima epatico viene sintetizzato il 4-idrossi-N-desmetiltamoxifen (endoxifen), il quale manifesta una potenza similare al 4OHtam raggiungendo tuttavia livelli plasmatici superiori, suggerendo quindi che l'endoxifen sia il principale metabolita da cui origina la risposta terapeutica. La formazione di endoxifen è catalizzata da multiple isoforme ma la via preponderante è quella che coinvolge la 4-idrossilazione di N-desmetiltamoxifen (NDtam) per azione dell'isoforma 2D6 (Figura 3) (Kiyotani K et al., 2012).
Il tamoxifen e i suoi derivati sono ulteriormente metabolizzati da enzimi di fase II, quali sulfotransferasi (SULTs) e UDP-glucoroniltransferasi (UGTs). L'isoforma SULTA1 si ritiene che sia la principale responsabile della reazione di solfatazione che interessa i metaboliti 4OHtam ed endoxifen.
Si ritiene però che la via di eliminazione più importante per TAM e i suoi metaboliti sia rappresentata dalla via di glucoronidazione mediata dalle UGTs. TAM è escreto principalmente attraverso la bile, processo che è facilitato quando il farmaco è coniugato ad acido glucuronico attraverso una reazione definita di glucoronidazione (Lazarus et al., 2009).

1.5 *CYP2D6*

L'isoforma 2D6 dell'enzima epatico citocromo P450 fa parte della numerosa famiglia dei citocromi coinvolti nei processi di metabolizzazione di numerosi farmaci e xenobiotici. In particolare a tale isoforma sono attribuite circa il 20% di tutte le reazioni bio-trasformative.
Il gene *CYP2D6*, che codifica per tale enzima, è situato sul cromosoma umano 22, mappato in posizione 22q13.1, ed è costituito da nove esoni, con lunghezza totale di circa 4.5kb. A monte del gene *CYP2D6* sono presenti due pseudogeni, *CYP2D7* e *CYP2D8* (Figura 4).
La sequenza di *CYP2D6* può presentare numerose varianti (polimorfismi), ne sono state scoperte più di 80 (Sachse C et al., 1997), che determinano l'attività dell'enzima.
I polimorfismi di *CYP2D6* significativi dal punto di vista funzionale interessano esoni, introni (a livello di siti donatori/accettori di splicing) e sequenze promotrici e si tratta per lo più di polimorfismi a singolo nucleotide o inserzioni/delezioni di

singole basi (Figura 4). Tuttavia una variante molto importante si presenta come una delezione dell'intero gene *CYP2D6*.

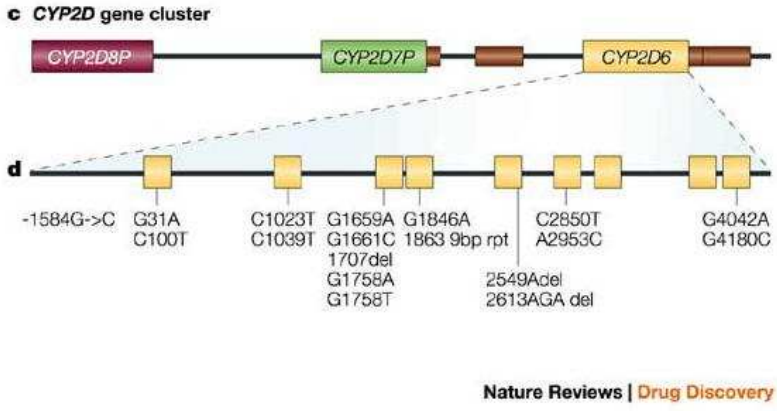


Figura 4. Rappresentazione grafica del gene *CYP2D6*, cluster *CYP2D*. Oltre alla localizzazione dei due pseudogeni, *CYP2D7* e *CYP2D8*, nello schema sono riportati i polimorfismi relativi ad ogni esone del gene *CYP2D6*. Dalla diversa combinazione dei polimorfismi indicati originano alleli con significati funzionali diversi (attività normale, ridotta o assente), (Kock WH, 2004).

Dalla combinazione dei diversi polimorfismi originano alleli con determinate caratteristiche fenotipiche che si differenziano dalla variante normo-funzionante (wild-type, denominata *1) perché presentano attività molto ridotta (es. varianti *9, *10 e *41) o addirittura assente (es. varianti *3, *4, *5 e *6). I fenotipi di CYP2D6 sono convenzionalmente suddivisi in quattro classi metaboliche: metabolizzatori lenti (*Poor Metabolizers, PM*) intermedi (*Intermediate Metabolizers, IM*), rapidi (*Estensive Metabolizers*) e ultra-rapidi (*Ultra Metabolizers, UM*) . Questi ultimi sono quegli individui che presentano più copie del gene *CYP2D6*.

Un'altra variante, denominata *2A e caratterizzata da una variazione di sequenza localizzata a livello del promotore (G-1584C), presenta invece un'attività comparabile all'enzima wild-type.

Le varianti di *CYP2D6* presentano frequenze genotipiche molto diversificate nella popolazione in relazione al gruppo etnico di appartenenza, così varianti molto diffuse nei caucasici possono essere rappresentate in misura meno rilevante o assente nelle altre etnie, asiatica o africana (Tabella 1).

Gli alleli nulli non codificano per un prodotto proteico funzionale, e nel caso del CYP2D6 non si riscontra nessun tipo di attività enzimatica. Nei caucasici, la variante nulla più frequente è determinata dall'allele *CYP2D6*4*, che è responsabile per il 70-90% di tutti i fenotipi di metabolizzatore lento. La mutazione chiave di questa variante è rappresentata da una conversione di una G in A (G1846A) *[rs3892097]* che causa un cambiamento nel sito accettore di splicing del terzo introne, alterando lo schema di lettura e provocando un prematuro codone di *stop*. Un'altra variante rappresentativa (2-7%) riguarda la completa delezione del gene *CYP2D6* (allele **5*). Vi sono poi altri alleli che presentano piccole delezioni che interrompono lo schema di lettura producendo trascritti proteici con prematuri codoni di *stop*. E' il caso degli alleli *CYP2D6*3* e **6* che presentano rispettivamente una delezione di singola base a livello dell'esone 5 (A2549del) *[rs4986774]* e una a livello dell'esone 3 (T1707del) *[rs5030655]*.

		Frequenze alleliche (%)		
Maggiori varianti alleliche	**Status funzionale**	**Caucasici**	**Asiatici**	**Neri Africani**
*CYP2D6*3*	Enzima inattivo	1-3.9	0.8-1	0-0.5
*CYP2D6*4*	Enzima inattivo	12-23	0-2.8	1.2-7
*CYP2D6*5*	No enzima	1.6-7.3	4.5-6.1	0.6-6.1
*CYP2D6*6*	Enzima inattivo	0.7-1	-	0
*CYP2D6*9*	Attività ridotta	0-2.9	3.3	0
*CYP2D6*10*	Attività ridotta	1.9-8	38-70	3.1-8.6
*CYP2D6*41*	Attività ridotta	8	-	-

Tabella 1. Frequenze alleliche per le maggiori varianti del gene *CYP2D6*. Sono riportate le frequenze relative ai diversi gruppi etnici: caucasici, asiatici e neri africani (Beverage et al., 2007).

Gli alleli associati a bassa attività enzimatica più frequenti nella popolazione di origine caucasica, sono rappresentati dalla variante *CYP2D6*9*, **10* e **41*. L'allele *CYP2D6*9* è stato caratterizzato per la mancanza di una tripletta nell'esone 5 (2615_2617delAAG) *[rs5030656]* causando l'eliminazione dell'aminoacido lisina (K281del). La mutazione caratteristica dell'allele **10* (C100T) *[rs1065852]* è stata individuata nella sostituzione aminoacidica di una

prolina a serina, a livello del primo esone, in una regione altamente conservata ricca in proline; mentre la mutazione determinante per lo **41* è costituita da un polimorfismo (G2988A) *[rs28371725]* nella regione intronica 6 (Zanger et al., 2004).

Tutte le varianti di *CYP2D6* presenti in natura sono consultabili in rete grazie all'istituzione di un sito web per opera di una Commissione ufficiale nominata per definire la nomenclatura allelica relativa alle diverse isoforme del citocromo P450 (http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp2d6.htm).

1.6 UGTs

Le UGTs sono una superfamiglia di enzimi localizzati a livello del reticolo endoplasmatico cellulare deputati alla detossificazione di uno svariato range di xenobiotici, così come di composti endogeni, attraverso la loro coniugazione con acido glucuronico. Questa reazione altera le proprietà biologiche del composto aumentando la sua escrezione attraverso le vie urinaria e biliare e determina la conversione dei substrati in molecole farmacologicamente inattive.

Nel caso della detossificazione di TAM e dei metaboliti gli enzimi di glucuronazione delle sottofamiglie 1A4, 1A10 e 1A8 sono quelle maggiormente coinvolte (Lazarus et al., 2009). Tuttavia endoxifen è per lo più convertito al corrispondente O-glucoronide dalle forme UGT1A10 e UGT1A8 (Brauch H et al., 2009).

Il gene che codifica per la famiglia di enzimi UGT della classe 1A è localizzato a livello del cromosoma 2 (2q37). Più nel dettaglio il complesso locus genico consiste di undici primi esoni alternati che, in seguito a splicing alternativo, sono combinati con i quattro esoni comuni, originando così differenti isoforme proteiche che presentano la medesima sequenza aminoacidica al C-terminale ma differente alla porzione N-terminale.

1.7 I recettori degli estrogeni

Gli estrogeni mediano i loro effetti nei tessuti target attraverso dei recettori espressi nei diversi tessuti in maniera specifica.

I recettori degli estrogeni (ERs) appartengono alla superfamiglia dei recettori ormonali nucleari. In seguito alla loro attivazione, che può avvenire in forma non esclusiva dal legame col ligando (il più importante: l'estradiolo), essi agiscono come modulatori della trascrizione e quindi della conseguente espressione di geni cosiddetti estrogeno-responsivi.

Il legame degli estrogeni al recettore dà il via ad una cascata di eventi, definita "via classica", che inizia con la traslocazione dal citosol al nucleo dello stesso recettore occupato inducendone la dimerizzazione. Tale riorganizzazione molecolare facilita l'interazione diretta del nuovo complesso dimerico con le regioni promotrici (Estrogen Responsive Elements, EREs) presenti nelle sequenza nucleotidica di geni target, determinando negli stessi una modulazione della trascrizione.

Più nel dettaglio, i recettori degli estrogeni, dopo interazione col ligando, subiscono importanti modifiche conformazionali determinate dalla natura stessa del ligando. Nel complesso recettore-estrogeno, l'elica 12 contenuta nel dominio di legame del ligando di ER viene riposizionata sopra la cavità del legame ligando-recettore al fine di bloccare lo stesso nella posizione di interazione. Questo cambio conformazionale di ER fa in modo che siano esposti alcuni aminoacidi che sono critici per il legame di specifiche proteine co-attivatorie. La modifica conformazionale è invece prevenuta quando il ligando è rappresentato dal tamoxifen, antagonizzando selettivamente il legame di co-attivatori alla isoforma alpha del recettore estrogenico reclutando al loro posto altre molecole proteiche che fungono da co-repressori (Osborne CK et al., 2000).

L'attivazione della trascrizione da parte di ER può avvenire anche attraverso vie alternative, ligando-indipendente, definite "non classiche", che non richiedono l'attivazione mediante ligando e non comportano la dimerizzazione del complesso recettoriale. Le vie "non classiche" sono sostenute dall'intervento di altre proteine (es. IGFR, EGFR) che possono esse stesse promuovere la trascrizione dei geni target attivando il recettore. Alternativamente si assiste al reclutamento di altri fattori trascrizionali (SP-1, AP-1) che interagendo con ER legano direttamente i siti sul DNA dei geni target, dando inizio alla trascrizione (Figura 5).

Gli ERs esistono in due distinte isoforme alpha (α) e beta (β), codificati da due geni distinti, rispettivamente *ESR1* (cromosoma 6q25.1) ed *ESR2* (cromosoma 14q23.2), che condividono delle caratteristiche funzionali e strutturali.

Tuttavia essi posseggono differenti affinità di ligando e sono differenzialmente espressi nei tessuti con la possibilità di agire in maniera antagonista (Taylor SE et al., 2010)

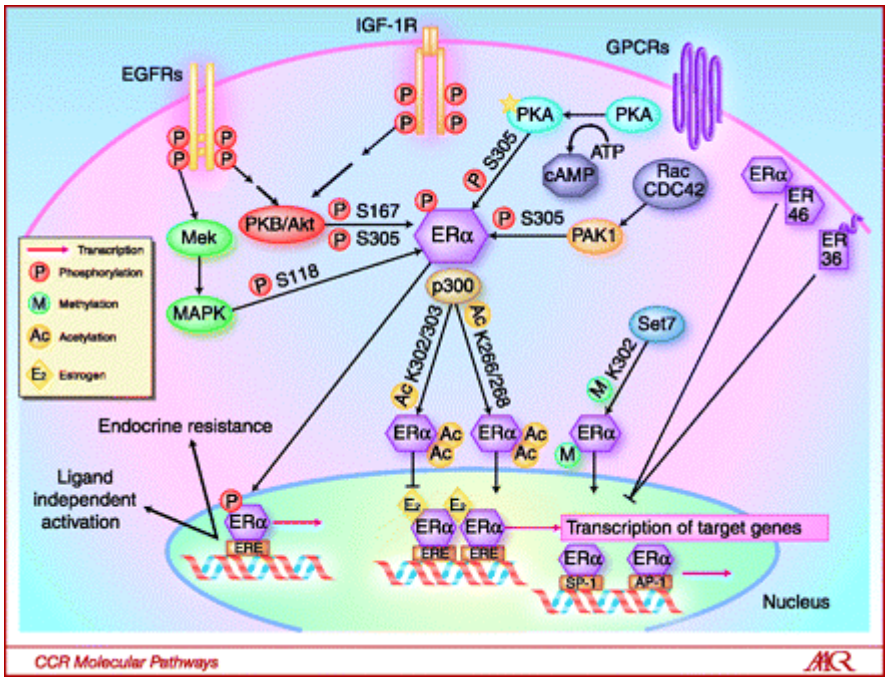


Figura 5. Rappresentazione schematica delle vie di attivazione "classiche" e "non classiche" di ERα. ERα è in grado di mediare la trascrizione di geni target attraverso due meccanismi, identificati come via "classica" e via "non classica". Il primo meccanismo origina dall'interazione dell'estrogeno con ERα, causando il conseguente legame diretto del complesso ligando-recettore alle regioni di DNA denominate EREs, localizzate a livello di siti di inizio della trascrizione, modulandone l'espressione. Per la via "non classica" esistono molteplici fattori che possono essere coinvolti per l'attivazione del recettore mediante il reclutamento di molecole segnale (è il caso dei fattori di crescita, IGFR e EGFR o recettori accoppiati a proteina G) o attraverso il legame diretto a ERα da parte di fattori di trascrizione, inducendo il legame di ERα agli EREs; questi ultimi meccanismi di attivazione presentano la caratteristica comune di poter modificare lo stato post-trascrizionale di ERα e quindi la sua attività in maniera ligando-indipendente. Da qui la possibilità di instaurarsi di endocrino resistenze. Inoltre è stato visto che l'attivazione del signaling può avvenire anche attraverso forme troncate di ERα localizzate a livello della membrana cellulare (Barone et al., 2010).

1.7.1 Recettore alpha e isoforme

ERα, codificato dal gene *ESR1*, è costituto da 8 esoni, che danno origine ad una sequenza codificante di ca. 1.8kb. ERα esiste sottoforma di molteplici isoforme che differiscono fra loro esclusivamente per la lunghezza della sequenza nella regione 5'-UTR. Esse vengono quindi trascritte utilizzando promotori diversi, fino

ad oggi identificati nel numero pari a 7, sei denominati da A a F, e un ultimo T. In queste diverse regioni 5'-UTR sono stati identificati numerosi codoni di *start* (AUG). In un modello suggerito da Kos e collaboratori (2002) si ritiene che la funzione principale di tali codoni sia quella di controllare l'espressione della proteina full-lenght Erα. In tale studio si afferma che la subunità 40S del ribosoma, una volta ancoratasi al cappuccio della molecola di mRNA da tradurre, inizi la sua scansione del filamento di mRNA fino a raggiungere il primo codone AUG e iniziare quindi la traduzione. Se il primo AUG non è riconosciuto la subunità ribosomiale può proseguire fino a trovare un altro codone di *start* più a valle (reiniziazione), distaccarsi oppure terminare la traduzione della sequenza codificante (ORF, Open Reading Frame). L'efficienza di reiniziazione dipende anche dalla distanza tra la fine della ORF a monte e il nuovo codone AUG a valle. Quando la distanza è corta (meno di 79 nucleotidi) è meno probabile che il ribosoma possa reclutare i necessari fattori di iniziazione prima che abbia raggiunto la nuova AUG, con conseguente fallimento di un nuovo inizio della traduzione.

I diversi promotori presentano inoltre una specificità tessutale: promotori entro le 2-kb dal sito accettore di splicing, denominati A, B, C, sono per lo più utilizzati in linee cellulari ed in tessuti che esprimono alti livelli di ERα, mentre promotori più distali, denominati E ed F, sono stati trovati in tessuti dove l'espressione di ERα è meno abbondante, come per esempio nel fegato e negli osteoblasti (Herynk MH and Fuqua SAW, 2004).

La proteina Erα full-lenght (ERα-66, peso molecolare di 66 kDa) è caratterizzata da 595 aminoacidi e contiene: una regione amino-terminale che alloca al suo interno il dominio funzionale di attivazione ligando-indipendente (AF-1); nella parte centrale, un dominio di legame al DNA (DNA Binding Domain, DBD) e all'estremità carbossi-terminale un dominio di legame per l'ormone (Hormone Binding Domain, HBD o Ligand Binding Domain LBD), che ospita quindi il dominio funzionale di attivazione ligando-dipendente (AF-2), (Figura 6).

A partire dagli anni '90 numerosi gruppi di ricerca hanno iniziato a identificare anche delle forme di splicing alternativo di Erα in diversi tessuti sia normali che tumorali. Nella vasta maggioranza dei casi queste forme di splicing alternativo sono co-espresse alla forma wild-type del recettore, e sono in grado quindi di conferire sia effetti positivo-dominanti che negativo-dominanti sulle cellule

tumorali, ed inoltre è stato ipotizzato che contribuiscano al fenotipo ormono-indipendente in certi tumori della mammella (Barone et al., 2010).

Le varianti di splicing di ERα sono per lo più originate dallo skipping degli esoni a partire dal singolo filamento di pre-mRNA trascritto; le isoforme mature di mRNA sono quindi tradotte in proteine che, in relazione all'esone escluso, presentano regioni parziali della forma completa di ERα.

Le varianti originate dalla delezione completa di uno o più esoni sono indicate con il numero dell'esone deleto preceduto dal simbolo delta (Δ), per es. ERαΔ5, ERαΔ7.

Le varianti di splicing più diffuse sono: per le varianti di singola delezione esonica ERαΔ3, ERαΔ4, ERαΔ5, ERαΔ7 e per le varianti a delezione multipla ERαΔ2-4, ERαΔ3-7, ERαΔ4-7.

La variante di splicing mancante dell'esone 3 (ERαΔ3) resta "in frame" dall'esone 4 fino all'esone 8 e dà origine quindi a una proteina che manca del dominio di legame al DNA (DBD). Il grado di complessità nel comprendere il ruolo delle differenti varianti di splicing è ben rappresentato da questa variante, che pur mancando del dominio di legame al DNA mantiene una sorta di integrità funzionale. A livello teorico il recettore così modificato è in grado di legare l'estrogeno con un'affinità molto simile al recettore full-lenght, di traslocare nel nucleo e di dimerizzare con un'altra molecola di ERα wild-type. Mancando della possibilità di legarsi direttamente al DNA non è in grado di inibire l'attività di Erα-66 quando è presente a concentrazione equimolari. Dato il suo effetto dominante-negativo sembra logico ipotizzare che alti livelli di questa variante potrebbero rallentare la crescita di un tumore estrogeno-dipendente. Tuttavia concentrazioni maggiori di ERαΔ3 sono state riscontrate nei sottogruppi di pazienti colpiti da carcinoma della mammella con prognosi peggiore. Questa apparente contraddizione può essere spiegata dal fatto che ERαΔ3 sembra essere in grado di stimolare la trascrizione del fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF) con una potenza di tre volte superiore rispetto a ERα full-lenght. VEGF, promuovendo la neoangiogenesi, sostiene la crescita del tumore e presumibilmente la sua azione compensa qualsiasi riduzione della stimolazione trascrizionale a livello degli EREs in seguito ad attivazione estrogenica. (Taylor SE et al., 2010).

La variante ERαΔ4, in cui viene escluso l'esone 4, è costituita da una proteina che non presenta il segnale di localizzazione nucleare, ossia il dominio di attivazione AF-2, e parte del dominio di legame dell'ormone. La proteina potenzialmente risultante (53.7 kDa) potrebbe avere una distribuzione cellulare differente e un'affinità di legame diversa rispetto a quella di ERα-66. E' stato riportato che questa variante non sembra interferire con l'attività di ERα wild-type e la sua espressione è stata associata ad una miglior prognosi nel tumore mammario, in quanto correlata ad un basso grado istologico e ad alti livelli di recettore per il progesterone.

La proteina da 40 kDa originata dallo skipping dell'esone 5 (variante ERαΔ5) manca della maggior parte del dominio di legame del ligando (viene introdotto un codone di *stop* a livello di HBD), mantenendo tuttavia l'abilità di legare il DNA e la capacità di attivare la trascrizione secondo modalità ligando-indipendente.

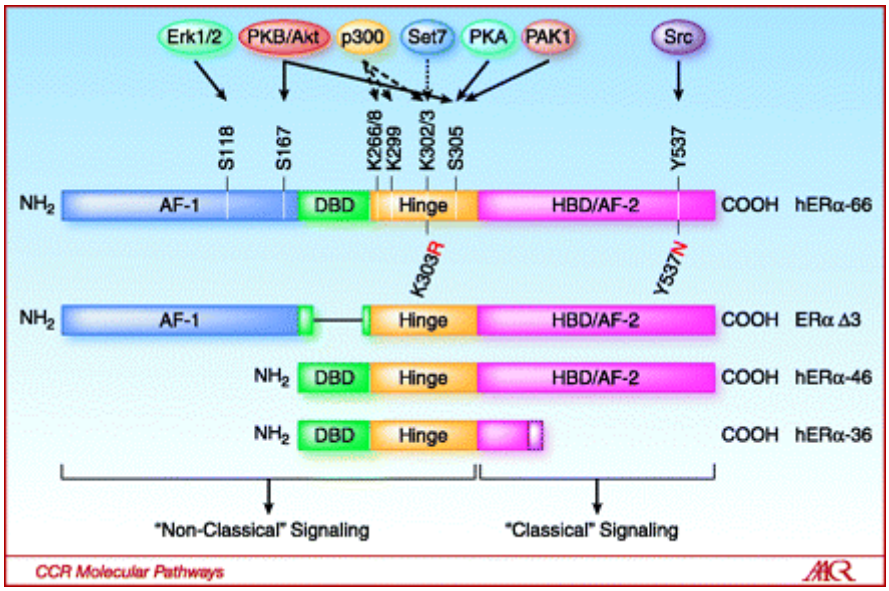


Figura 6. Rappresentazione schematica dei domini strutturali di ERα. La proteina full-lenght (hER-α66) presenta: una regione amino-terminale dove si trova il dominio funzionale di attivazione ligando-indipendente (AF-1); nella parte centrale, un dominio di legame al DNA (DNA Binding Domain, DBD) e all'estremità carbossi-terminale un dominio di legame per l'ormone (Hormone Binding Domain, HBD), che ospita quindi il dominio funzionale di attivazione ligando-dipendente (AF-2). ERα può essere modificato mediante splicing alternativo a livello del DNA, dando origine talvolta a proteine tronche con conseguenti funzioni alterate. In figura sono riportate le varianti: ERαΔ3, mancante del dominio DBD a causa dello skipping dell'esone 3; hERα-46, priva del dominio AF-1 e localizzata a livello della membrana plasmatica, la quale agisce come un inibitore competitivo di hERα-66; hERα-36, costituita dal dominio DBD e HBD e da una sequenza esclusiva codificante per 27 aminoacidi aggiunti all'estremità carbossi-terminale. Anche quest'ultima agisce come soppressore della forma full-lenght localizzandosi sulla membrana plasmatica (Barone et al., 2010).

La variante con una delezione dell'esone 7 (ERαΔ7) è la variante maggiormente osservata nel carcinoma mammario. Potenzialmente codifica per una proteina di 51 kDa nella quale è assente il dominio AF-2 e una porzione del dominio HBD.
È stato dimostrato che, nonostante sia priva di una attività trascrizionale, agisca come una potente isoforma negativo-dominante sia per ERα che per ERβ. Tuttavia la sua comune espressione nel tumore mammario non sembra correlare significativamente con l'instaurarsi di resistenza alla terapia anti-estrogenica del tamoxifen, anche se per il suo effetto negativo-dominante sembra sia possibile ipotizzare un ruolo nella progressione della malattia tumorale mammaria.
Oltre alle varianti originate dall'esclusione di singoli esoni, sono state identificate, in tessuti normali ma per lo più in quelli neoplastici, delle varianti mancanti di esoni multipli, spesso potenzialmente codificanti per proteine tronche. In uno studio di Leygue *et al.* (1996) è stato dimostrato che mRNA mancanti degli esoni 2-4 e 3-7 erano espressi ad alti livelli in tessuti tumorali ad alto grado che presentavano anche alti profili di espressione di ER. In più è stato riportato che la variante di splicing, valutata sempre come mRNA di ER, caratterizzata per l'assenza degli esoni 4 e 7, fosse la più espressa nei tumori (Hopp TA and Fuqua SAW, 1998). Nonostante tutti questi dati, allo stato attuale, il significato clinico delle diverse varianti e isoforme di ERα resta ancora tutto da chiarire.
Nei primi anni 2000, poi, la scoperta di altre due nuove isoforme di ERα ha ulteriormente complicato lo scenario, suggerendo che queste isoforme potrebbero essere rilevanti negli eventi di signaling controllati da ERα wild-type. La loro identificazione è avvenuta mediante esperimenti di immunoblots nei quali erano stati impiegati anticorpi anti-Erα che reagivano contro la porzione del dominio HBD, individuando tre bande predominanti del peso molecolare di 66 kDa, 46 kDa e 36 kDa.
L'isoforma Erα-46 risulta priva dei primi 173 aminoacidi posizionati all'estremità amino-terminale nel dominio AF-1, quale risultato di un evento di splicing alternativo che coinvolge l'esone 1 (Figura 6). E' stato dimostrato poi che questa isoforma si localizzi a livello della membrana plasmatica conferendo alla cellula una sorta di stato più attivo, in cui gli eventi di signaling, scaturiti in risposta agli estrogeni, si verificano con maggiore rapidità. Erα-46 inoltre forma eterodimeri con la forma Erα-66 agendo come un forte inibitore competitivo nelle cellule ER-

positive, promuovendo l'attivazione dei sistemi genomici di modulazione trascrizionale in tessuti ER-negativi.

ERα-36 è l'isoforma presente fisiologicamente che è stata ritrovata in tumori mammari sia estrogeno-positivi che –negativi. La sequenza di questa isoforma è costituita da un promotore localizzato a livello dell'introne 1 del gene di ERα-66, seguita dal dominio DBD, da una parte di HBD mancando invece dei domini AF-1 e AF-2. La caratteristica principale è rappresentata dal fatto che possiede un dominio extra rappresentato da 27 aminoacidi unici per questa isoforma che rimpiazzano gli ultimi 138 aminoacidi codificati dagli esoni 7 e 8 del gene di ERα wild-type. Si tratta di un'isoforma che manca di un'attività trascrizionale intrinseca ma che è in grado di sopprimere efficientemente l'azione modulatoria trascrizionale che avviene per opera della forma full-lenght di ERα, suggerendo possa rivestire un chiaro ruolo di forte inibitore del signaling genomico mediato dagli estrogeni. Inoltre in campioni clinici alti livelli di espressione di ERα-36 sono stati associati con intervalli di tempo libero da malattia minori, identificando un sottogruppo di pazienti che probabilmente beneficiano in misura minore del trattamento con tamoxifen (Barone et al., 2010).

1.7.2 Recettore beta e isoforme

L'espressione di una isoforma recettoriale diversa da ERα nel tessuto tumorale mammario umano fu identificata per la prima volta nel 1997, quando in campioni di biopsie tumorali sono stati rilevati trascritti di RNA codificanti per l'isoforma beta (Dotzlaw H et al., 1997).

Il recettore beta (ERβ) si presenta come una proteina di 530 amminoacidi, prodotta a partire da un trascritto di 8 esoni, con un peso molecolare di 59.2 kDa, originata da una sequenza specifica sul gene *ESR2*. In più vi sono due esoni, denominati 0N e 0K, nella regione 5'-UTR e un esone alla regione 3'-UTR che unitamente all'esone 7, possono essere oggetto di splicing per produrre un'isoforma alternativa di Erβ, ERβ2 (o ERβcx) (Zhao C et al., 2010).

La sequenza codificante per ERβ condivide una modesta identità globale con ERα calcolata attorno al 47%.

Nell'isoforma β è possibile riscontrare gli stessi domini funzionali dell'isoforma α anche se un alto grado di omologia (96%, solo tre differenti aminoacidi nella

sequenza) si riscontra solo nel dominio DBD, a differenza del dominio di legame del ligando che possiede solo un 53% di omologia (Figura 7), divergendo considerevolmente nella porzione amino-terminale (Bai Z and Gust R, 2009). Non è motivo di sorpresa il fatto che entrambe le isoforme interagiscano con gli stessi elementi responsivi del DNA anche se non è da dimenticare che mostrano caratteristiche di legame al ligando similari ma non identiche (Hall JM and McDonnell DP, 1999).

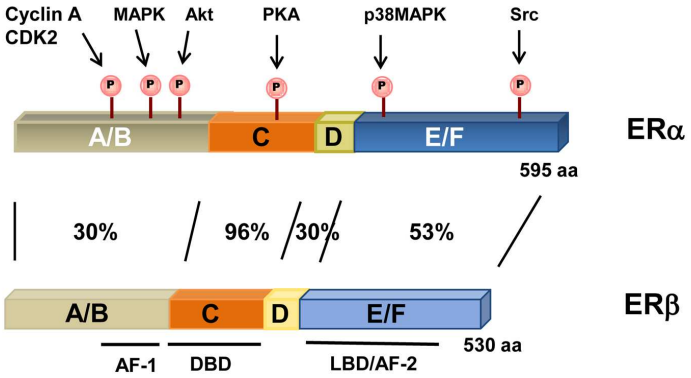


Figura 7. Composizione strutturale in domini delle isoforme di ERs (α e β). Entrambi i recettori presentano i seguenti domini funzionali: DNA Binding Domain (DBD), Ligand Binding Domain (LBD), e due domini strutturali di attivatori trascrizionali (AF-1 e AF-2). La percentuale di omologia tra Erα e Erβ è indicata, così come i siti di fosforilazione in Erα. Attraverso di essi Erα è attivato da importanti chinasi che modulano un'ampia varietà di eventi cellulari. aa: amminoacidi; Akt: specifica famiglia delle protein chinasi serina/treonina codificata dai geni *AKT*. CDK2 : chinasi ciclina 2-dipendente; MAPK: protein chinasi mitogeno-attivata; PKA: protein chinasi A; Src: coattivatore del recettore steroideo. (Roman-Blas et al., 2009)

Il ruolo di ERβ nel tumore mammario è ancora da definire, tuttavia dai vari studi condotti è emerso che esso svolga un ruolo oppositore alle azioni di ERα relative alla proliferazione cellulare, attraverso la modulazione dell'espressione di molti geni regolati da Erα. Inoltre esibisce proprietà anti-migratorie e anti-invasive nelle cellule tumorali.

Anche per l'isoforma β sono state identificate delle varianti di splicing (ERβ2, ERβ3, ERβ4, ERβ5) molte delle quali identificate nei tessuti tumorali.

E' stato riportato che le isoforme ERβ2 ed ERβ5 siano in grado di antagonizzare ERα e di modulare l'attività trascrizionale della forma wild-type di ERβ mediante formazione di eterodimeri. Gli effetti antiproliferativi di ERβ1 (wild-type) e della sua variante di splicing βcx sono stati associati all'abilità di tali molecole

proteiche di prevenire l'attivazione trascrizionale di geni target di ERα deputati alla progressione del ciclo cellulare (Thomas C and Gustafsson JA, 2011).

Recentemente è stato riportato che nell'azione anti-estrogenica esercitata da endoxifen possa avere un ruolo importante la presenza concomitante di isoforme di ERβ con la forma full-lenght di ERα. Lo studio condotto da Wu *et al.* (2011) ha dimostrato infatti che endoxifen, interferendo sul complesso eterodimerico composto da ERα/ERβ, inibisce marcatamente la proliferazione cellulare indotta dagli estrogeni anche a basse concentrazioni, mentre si rendono necessarie concentrazioni maggiori quando ERβ non è espresso.

2. SCOPO DELLO STUDIO

Il carcinoma mammario rappresenta la patologia neoplastica a più alta incidenza nel sesso femminile sebbene nel corso degli ultimi decenni si sia potuto assistere ad una significativa diminuzione della mortalità, grazie anche all'intervento di programmi di screening che hanno permesso di individuare lesioni neoplastiche in stadi precoci.

Il tumore mammario positivo per gli estrogeni rappresenta il sottotipo tumorale più frequente (60-80%) per il cui trattamento è previsto l'impiego del modulatore estrogenico tamoxifen.

Nonostante gli elevati benefici terapeutici derivati dall'impiego in clinica del tamoxifen essi non sono sufficienti a prevenire l'insorgenza di malattia recidivante in una percentuale rilevante di pazienti. In questo contesto appare fondamentale poter individuare dei parametri indicativi dei livelli di esposizione al farmaco e ai metaboliti attivi ancor prima dell'inizio del trattamento, in modo da poter individuare un trattamento efficace e individualizzato nel più breve tempo possibile. Il tamoxifen è un pro-farmaco e il tempo per raggiungere lo stato stazionario è di circa quattro mesi.

Uno degli obiettivi primari dello studio è quello di valutare la possibilità di prevedere i livelli di attivazione di tamoxifen: a. prima dell'inizio trattamento tramite test di fenotipizzazione; b. dopo un mese di terapia mediante dosaggio plasmatico di tamoxifen e metaboliti.

Tamoxifen è un farmaco generalmente ben tollerato, tra gli effetti collaterali maggiormente riscontrati si ritrovano le cosiddette "hot-flashes" o vampate di calore, e altri sintomi a livello degli apparati circolatorio e genito-urinario.

In relazione a questo aspetto un altro scopo dello studio è individuare se esiste una relazione tra le concentrazioni plasmatiche dei metaboliti attivi del tamoxifen (in particolare endoxifen) con la tossicità del trattamento, al fine di poter individuare un range di concentrazione al di sopra del quale non si registra un guadagno terapeutico ma solo un incremento degli effetti collaterali.

Un altro fattore di particolare rilievo nella valutazione della risposta farmacologica è rappresentato dal target molecolare di tamoxifen, il recettore per gli estrogeni alpha (Erα). E' noto che a livello del tessuto tumorale mammario sono espresse anche altre isoforme dei recettori estrogenici, originate dallo

splicing alternativo delle due forme complete, Erα ed Erβ, le quali si ipotizza possano rivestire un ruolo non marginale nella determinazione della risposta terapeutica.

A tal proposito tra gli obiettivi del nostro studio vi è anche quello di indagare, mediante un modello *in vitro*, l'eventuale azione influente su Erα della isoforma recettoriale Erβ2 (βcx) nella risposta anti-estrogenica esercitata dal metabolita attivo endoxifen.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Soggetti

Nella ricerca sono state arruolate donne operate di carcinoma invasivo della mammella, candidate a trattamento adiuvante con tamoxifen 20 mg/die; sono state considerate includibili anche le pazienti che abbiano eseguito chemioterapia neoadiuvante o adiuvante, in premenopausa (con o senza contemporanea soppressione ovarica) o postmenopausa; sono state escluse invece le pazienti in trattamento concomitante con Trastuzumab o farmaci antitumorali sperimentali; le pazienti al momento dell'arruolamento potevano essere naïve o in stato stazionario perché in trattamento da almeno quattro mesi con TAM. Non sono stati ritenuti eleggibili pazienti maschi e casi di neoplasie in situ.
Le pazienti in cui il trattamento sia stato interrotto prima dei tre mesi sono state considerate non valutabili.
Per le pazienti naïve venivano raccolti, ai tempi 1, 4 e 8 mesi dall'inizio della terapia, 15mL di sangue intero, previo consenso informato scritto. Nelle pazienti arruolate in stato stazionario venivano raccolti due prelievi alla distanza di 4/6 mesi l'uno dall'altro.

3.2 Dosaggio su plasma di tamoxifen e dei metaboliti

Per mettere a punto il metodo di dosaggio del tamoxifen e dei suoi metaboliti nel plasma dei pazienti si è fatto riferimento alla letteratura recente (Lim HS et al., 2007; Lee KH et al., 2003; Desta Z et al., 2004), apportando parziali adattamenti.
I campioni sono analizzati con un sistema HPLC (Waters®); è stato inserito in serie dopo la colonna un fotoreattore costituito da una lampada UV a 254 nm, che converte il tamoxifen ed i suoi metaboliti in derivati fenantrenici fluorescenti; il rivelatore a fluorescenza viene utilizzato con lunghezza d'onda (λ) di eccitazione di 256 nm e di emissione di 380 nm. Per la separazione sono impiegate colonne C18; la fase mobile isocratica è composta di acetonitrile e tampone fosfato 20mM a pH 3.0; il flusso è di 1ml/min.

Le curve di calibrazione sono state eseguite con plasma di volontari sani aggiungendo concentrazioni note di ogni metabolita, del tamoxifen e di due farmaci, il propranololo e il verapamil, usati come standard interni. I range delle concentrazioni di ciascun metabolita sono riportati di seguito: endoxifen (2.5-40 ng/ml), 4-idrossitamoxifen (0.62-10 ng/ml), N-desmetiltamoxifen (25-400 ng/ml), tamoxifen (25-400 ng/ml). Per gli standard interni, propranololo e verapamil, le concentrazioni finali sono di 0.5 μg/ml. Le curve di calibrazione permettevano di ottenere $R^2 \geq 0.99$.

La ripetibilità della metodica di dosaggio è stata valutata eseguendo analisi multiple del medesimo campione preparato con concentrazioni note degli standards. Nel dettaglio si è testata la ripetibilità dell'analisi in due diversi livelli di concentrazioni, come di seguito riportato: endoxifen (2.5 e 20 ng/ml), 4-idrossitamoxifen (0.62 e 10 ng/ml), N-desmetiltamoxifen (25 e 250 ng/ml), tamoxifen (25 e 250 ng/ml). I coefficienti di variazione (CV%) sono stati calcolati mediante la seguente equazione:

$$CV\% = 100 * \frac{\text{deviazione standard sulle concentrazioni osservate}}{\text{media delle concentrazioni osservate}}$$

L' estrazione del farmaco e dei metaboliti (endoxifen, 4OHtam, NDtam) avviene in provette di vetro a partire da 1ml di plasma a cui si aggiungono 50 μl di ogni soluzione di standard interno (10 μg/ml: propranololo; 10 μg/ml: verapamil). Quindi la mix viene resa alcalina dall'aggiunta di 1ml di NaOH-tampone glicina (pH 11.3) 1 M. A questo punto 6ml di Esano:Isopropanolo (95:5 vol/vol) sono aggiunti ad ogni campione. Si pongono in agitazione per 20 min e a seguire si centrifugano a 4000rpm per 10 min, a temperatura ambiente. La fase superiore, che contiene il farmaco, viene trasferita in un'altra provetta e portata a secco mediante azoto insufflato. I campioni sono quindi risospesi in 120 μl di fase mobile, centrifugati per 5 min a 14.000 rpm e 50 μl vengono iniettati nel sistema HPLC. La separazione del tamoxifen e dei metaboliti prevede intervalli di corsa della durata di 60 min per ciascun campione in analisi.

3.3 Test di Fenotipizzazione di CYP2D6

Il test di fenotipizzazione è stato condotto sulle pazienti che non avevano ancora iniziato la terapia con tamoxifen. Il test si avvale di un farmaco sonda, il destrometorfano (DMT), metabolizzato in destrorfano dal CYP2D6. Il dosaggio del farmaco e del metabolita destrorfano è eseguito su campioni di urine dopo la somministrazione di una dose di 15mg di destrometorfano bromidrato (2 compresse masticabili di Bronchetab_GlaxoSmithKline da 7,5 mg ciascuna), raccolte per le successive 8 ore.

I campioni sono analizzati con un sistema HPLC (Waters®) e rivelatore a fluorescenza, impostato con λ di eccitazione a 275nm e di emissione a 310 nm. Per la separazione sono utilizzate colonne feniliche; la fase mobile isocratica è composta di acetonitrile, acido acetico e trietilammina. Il flusso è di 1ml/min.

L'estrazione del farmaco e del metabolita destrorfano (DEX) da analizzare, viene eseguita in provette di vetro. Le urine, mescolate ad una soluzione di β-glucoronidasi (in tampone acetato 0.1 M pH 5.0) con un rapporto di 1:1 (vol/vol), vengono incubate per 18 ore a 37°C. Quindi ad ogni campione sono aggiunti 25 µl di una soluzione di levallorfano 100 µg/ml (standard interno). Si aggiungono poi 500 µl di tampone carbonato a pH 9.2 e 3.5 mL di Esano-Butanolo (95:5 vol/vol). Successivamente i campioni sono vortexati e messi ad agitare per 10 min. A seguire centrifugazione di 5 min a 3000rpm a temperatura ambiente. La fase organica viene trasferita in una nuova provetta e portata a secco sotto flusso d'aria a 55°C. Quindi i campioni sono risospesi in 1 ml di fase mobile, vortexati e iniettati nel sistema HPLC.

L'attività del citocromo CYP2D6 è calcolata con la formula che identifica il rapporto metabolico (MR) tra la concentrazione molare del farmaco e quella del metabolita prodotto, espressa su scala logaritmica: log[DMT]/[DEX].

3.4 Genotipizzazione di *CYP2D6*

L'estrazione del DNA finalizzata alla caratterizzazione genotipica del *CYP2D6* è stata eseguita da campioni di sangue intero congelato.

L'estrazione è stata effettuata con la seguente procedura: mediante il Wizard® Genomic DNA purification Kit (Promega) il DNA genomico veniva estratto da 450µl di sangue tramite incubazione con 1200µl di una soluzione di lisi specifica per i globuli rossi, per circa 10 min a temperatura ambiente. I campioni venivano quindi centrifugati a 13.000g per 20 sec e dopo l'eliminazione del surnatante, si procedeva con un nuovo lavaggio in soluzione lisante (600µl), seguito da centrifugazione a 13.000g per 1 min per scartare il sovranatante; quindi il pellet di globuli bianchi veniva trattato con 300µl di una soluzione di lisi nucleare osservando, come verifica del corretto procedimento, la trasformazione della soluzione in un composto vischioso. Dopo una incubazione a 37°C per 15 minuti con RNasi si aggiungevano 100µl di una soluzione specifica per la precipitazione proteica. Ulteriore centrifugazione per 3 min a 13.000 g e trasferimento del surnatante in una nuova provetta contenente 300µl di isopropanolo 100%. Si agitava quindi delicatamente per inversione e si osservava la formazione della testa di medusa di DNA, che veniva prelevata mediante ansa batteriologica. Il DNA era quindi lavato in etanolo 70%, lasciato asciugare all'aria, e risospeso in 30-100µl di soluzione reidratante (Tris-EDTA). I campioni venivano conservati a 4°C fino all'esecuzione dell'analisi genetica.

Per l'analisi genetica sono stati considerate le varianti di *CYP2D6* con una frequenza significativa nella popolazione caucasica: *CYP2D6**1, *3, *4, *5, *6, *9,*10, *41.

La ricerca della sequenza genomica è stata eseguita nel database UCSC Human Genome Browser, con verifica dell'allineamento proteico della sequenza in BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) *(gi: AY545216)*. Il disegno dei primers per l'identificazione dei polimorfismi relativi per ogni variante di interesse è stata eseguita con il supporto di un programma disponibile in rete, *Primer3* (Krawetz S, Misener S. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386). Una prima verifica della specificità dei primers è stata effettuata mediante PCR in silico, nel database di Human Genome Browser.

Per la standardizzazione dei protocolli di analisi sono state prodotte sperimentalmente le varianti in studio mediante clonaggio e successiva mutagenesi sito-diretta. Quest'ultima è stata eseguita utilizzando il kit QuikChange® Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies) che permette di mutagenizzare DNA a doppio filamento quando esso è inserito in un vettore plasmidico. La reazione di mutagenesi prevede una rapida procedura che si esplica tramite sintesi di nuovo DNA plasmidico mutato grazie alla replicazione altamente fedele della PfuTurbo® DNA polimerasi che estende e incorpora i primers mutagenizzanti formando un nuovo plasmide circolare a doppio filamento non chiuso, successivamente selezionato mediante trasformazione batterica.

Il successo della reazione di mutagenesi è stato verificato mediante sequenziamento diretto con sequenziatore ad elettroforesi capillare CEQ® 2000 (Beckman Coulter), secondo metodo Sanger.

Per la caratterizzazione delle varianti *9 (2615_2617delAAG) e *41 (G2988A), si è utilizzata l'apparecchiatura DHPLC (Denaturing High-Performance Liquid Chromatography, TransGenomic® & Co.): i frammenti di sequenza specifici per le varianti da indagare sono state amplificate tramite PCR e visualizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio. Le reazioni di PCR sono state condotte con le condizioni di temperatura descritte dall'eteroterma seguente: 10 min a 94°C, seguito da 38-40 cicli a 94°C per 30-45 sec, uno step di annealing a 57-60°C per 30-45 sec e 72°C per 30-45 sec, a seguire un'elongazione finale di 7 min a 72°C. I volumi di reazione impiegati sono stati di 50µl, a partire da ~50-100ng di DNA genomico in presenza di 1U di Hot Start AmpliTaq Gold® DNA polimerase (Applied Biosystem®). Le coppie di primers impiegate sono riportate in tabella 2.

Per l'analisi al DHPLC sono state individuate sperimentalmente le temperature di corsa ottimali che permettevano di discriminare tra alleli wild-type e mutati. Gli alleli wild-type e quelli mutati erano eluiti dapprima come singolo picco e successivamente mescolati in modo da consentire la formazione di molecole heteroduplex, ottenute previo trattamento di denaturazione degli amplificati per 5 min a 94°C e progressivo e graduale re-annealing degli stessi a temperatura ambiente. I tempi di ritenzione per ciascuna corsa sono stati stabiliti, ogni corsa cromatografia durava 8 min con l'impiego di un gradiente di fase mobile costituito da Buffer A (trietilammonio acetato) e da Buffer B (trietilammonio acetato e acetonitrile) al flusso di 0.9ml/min.

Per la rilevazione della delezione genica (*5) è stata messa a punto una multiplex *long*PCR mediante il kit DyNAzyme EXT DNA Polymerase® (ThermoScientifc) impiegando tre primers riportati in letteratura (Sistonen J et al., 2005), che permettevano l'amplificazione del gene CYP2D6, se presente, e l'amplificazione di una sequenza di controllo (CTRL) per evitare i falsi negativi. Il profilo eterotermico prevedeva 10 cicli così costituiti: 94°C 30sec, 62°C 1min, 70°C 10 min. Seguivano 20 cicli che differivano dai precedenti per un progressivo allungamento della fase di estensione (20sec ogni ciclo).
Per l'identificazione delle varianti *3 (2549delA), *4 (G1846A), *6 (T1707del) e *10 (C100T) si è utilizzata la metodica RFLP.

Sequenza	**Amplificato (bp)**
*CYP2D6**3-Fw 5'- GATGAGCTGCTAACTGAGCCC – 3' *CYP2D6**3-Rv 5'- CCGAGAGCATACTCGGGAC – 3'	270
*CYP2D6**4-Fw 5'- AAAGCGGGAACTGGGAAG – 3' *CYP2D6**4-Rv 5'- GTCTCTCGCTCCGCACCT – 3'	355
*CYP2D6**6-Fw 5'- GTGGGGCTAATGCCTTCAT – 3' *CYP2D6**6-Rv 5'- CTTCCCAGTTCCCGCTTT – 3'	244
*CYP2D6**9-Fw 5'- CAAGGTCCTACGCTTCCAAA – 3' *CYP2D6**9-Rv 5'- AGCATACTCGGGACAGAACG – 3'	305
*CYP2D6**10-Fw 5'- CAGAGGAGCCCATTTGGTAG – 3' *CYP2D6**10-Rv 5'- ACCTGGTCGAAGCAGTATGG – 3'	212
*CYP2D6**41-Fw 5'- GAGCCCATCTGGGAAACAGT – 3' *CYP2D6**41-Rv 5'- CCTCCTATGTTGGAGGAGGTCAGGCTTACAG – 3'	273
*CYP2D6**5-Fw 5'- CCCTCAGCCTCGTCACCTCAC – 3' *CYP2D6**5-CTRL-Fw 5'- ACCAGGCACCTGTACTCCTCA – 3' *CYP2D6**5-Rv 5'- GCATGAGCTAAGGCACCCAGAC – 3'	3000 (CTRL) 3500 (del)

Tabella 2: Sequenze dei primers impiegati nella genotipizzazione di *CYP2D6* e rispettivi ampliconi indicati come lunghezza in paia di basi (bp).

Tutte le varianti oggetto di indagine nella fase di amplificazione tramite PCR prevedevano un profilo eterotermico comune con una fase iniziale di denaturazione a 94°C per 10 min, poi a seguire 35-36 cicli a 94°C per 30 sec, 30 sec alla specifica temperatura di annealing (57-60°C) e 72°C per 30 sec per

concludere con uno step di elongazione finale di 7 min a 72°C. Le coppie di primers impiegate sono riportate in tabella 2.

Per l'identificazione della variante *3 è stato appositamente disegnato un primer modificandone la sequenza di riferimento in modo tale da inserire un sito di riconoscimento per l'enzima di restrizione *MspI*. La reazione enzimatica avviene in un intervallo di 2 ore alla temperatura di 37°C.

L'analisi della variante *4 veniva effettuata impiegando l'enzima *BstNI* allestendo una reazione alla temperatura di 60°C per 1.5 ore.

Il polimorfismo T1707del, caratteristico dell'allele *6, è stato indagato impiegando come enzima di restrizione *BtsI*, il quale agiva ad una temperatura di 55°C in un intervallo di tempo di 1.5 ore.

Per l'individuazione dell'allele *10 i prodotti di amplificazione erano trattati con l'endonucleasi *Hph I* over-night a 37°C.

In tutti i casi per la analisi degli amplificati prima e dei frammenti di digestione poi si sono eseguite delle elettroforesi su gel di agarosio contenente GelRed® (Biotium) come marcatore di acidi nucleici, seguita da visualizzazione con ultravioletti tramite GelDoc® (BioRad).

3.5 Analisi in vitro dei recettori degli estrogeni (α e β) e isoforme

3.5.1 Linea cellulare: MCF7-βcx

Per l'analisi in vitro della risposta al trattamento con endoxifen del recettore degli estrogeni α anche in presenza di altre isoforme recettoriali è stata impiegata una linea cellulare di carcinoma mammario (Michigan Cancer Foundation, MCF7), che presenta costitutivamente il recettore per gli estrogeni alpha, in grado di esprimere stabilmente l'isoforma 2 del recettore beta (denominato anche βcx). La linea in esame è stata gentilmente fornita dal gruppo "Estrogen Signaling Research" diretto dalla Prof.ssa Dahlman-Wright, presso il Karolinska Institutet di Stoccolma.

La linea cellulare è dotata di un sistema di espressione denominato *tet-off* (tetraciclina-off) che è in grado di comandare l'espressione di tale isoforma. Più nel dettaglio l'espressione del gene ha inizio in assenza del farmaco tetraciclina

(Tet), o di suoi derivati (per esempio doxiciclina, Dox), nel terreno di coltura (Figura 8).

Il sistema *tet-off* è stato ideato prendendo come modello l'operone del gene per la resistenza alla tetraciclina di *Escherichia Coli*. In questo organismo il gene regolatore *TetR* produce una proteina (TetR) che blocca la trascrizione dei geni per la resistenza alla tetraciclina mediante il legame all'operatore tetO. Tale blocco avviene in assenza di tetraciclina, mentre quando l'antibiotico è presente, si lega a TetR inducendo un cambio conformazionale nella proteina e impedendole il legame con tetO (Hillen et al., 1982).

Il primo componente cruciale del sistema Tet è il transattivatore (tTA) controllato dalla tetraciclina, una proteina regolatrice di *E.coli*, TetR, modificata. Si tratta di una proteina di fusione in cui gli amminoacidi 1-207 di *TetR* sono legati a 127 amminoacidi della porzione C-terminale del dominio di attivazione VP16 di Herpes Simplex Virus (Triezenberg et al., 1988).

Il dominio VP16 converte TetR da repressore ad attivatore della trascrizione. Nel sistema *tet-off*, tTA è codificata dal plasmide regolatore *pTet-Off*.

Il secondo componente cruciale è rappresentato dal plasmide responsivo che esprime il gene di interesse (nel nostro caso Erβcx) sotto il controllo dell'elemento resposivo alla tetraciclina (TRE). Quest'ultimo contiene 7 ripetizioni della sequenza tetO, a monte del promotore minimo (Pmin) di CMV (*Citomegalovirus*), che manca tuttavia degli elementi enhancer, in modo che non vi sia alcuna espressione del gene di interesse in assenza di legame di tTA con TRE.

Il plasmide responsivo nel nostro caso è pBI-EGFP, nel quale TRE è bidirezionale, disegnato per co-esprimere il gene di interesse Erβcx e la EGFP (Enhanced Green Fluorecent Protein). Di conseguenza, quando TRE è attivato, entrambi i geni sono espressi, conferendo alle cellule la colorazione fluorescente verde.

Il trattamento della linea cellulare, avvenuto in presenza e non di tetraciclina, ha previsto in primis la semina delle stesse cellule ad una concentrazione di $1.5*10^5$/ml in terreno di coltura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, Life Technologies®), privo di rosso fenolo, completato con l'aggiunta di 1% di penicillina/streptomicina e 2% di FBS hormon free (Biochrom AG).

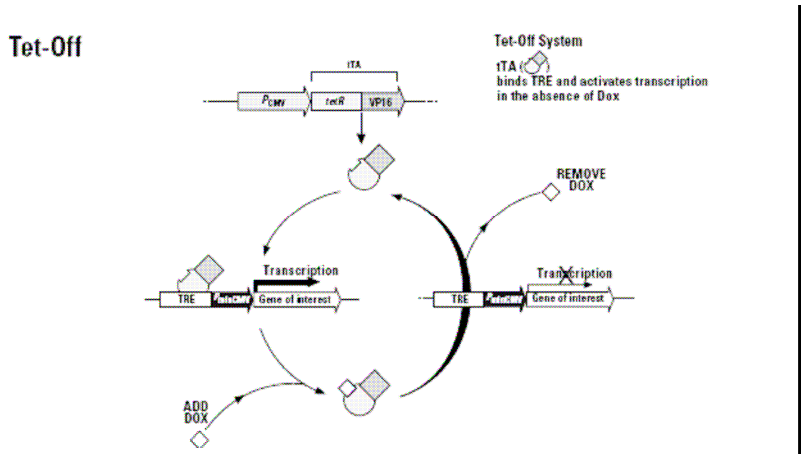


Figura 8. Rappresentazione schematica della regolazione genica nel sistema tet-off: tTA lega TRE e attiva la trascrizione in assenza di Tet o Dox. TRE è localizzato up-stream di PminCMV, il quale è silente in assenza di attivazione. TTA lega TRE, attivando la trascrizione del gene di interesse, in assenza di Tet o Dox.

Dopo 24h dalla semina le cellule che erano state private del farmaco tetraciclina sono state sottoposte a molteplici lavaggi con PBS al fine di eliminare qualsiasi residuo del farmaco tetraciclina.

A 48h dalla semina le cellule sono quindi state sottoposte ad intervalli di trattamento di 3, 6, 12 e 24h con etanolo (EtOH, veicolo), estradiolo (E2) 1nM, estradiolo 1nM in associazione a endoxifen 20nM ed estradiolo 1nM combinato a endoxifen 40nM, in triplicato.

3.5.2 Estrazione RNA dalle cellule MCF7-βcx

A seguito del trattamento, ad ogni intervallo prestabilito, le cellule sono state private del terreno di coltura e raccolte per l'estrazione dell'RNA mediante kit RNeasy® Plus Mini (Qiagen®).

In breve la procedura di estrazione prevedeva di lisare le cellule direttamente nella piastra di coltura con 350µl di buffer specifico al quale erano aggiunti, per ciascun ml di soluzione, 10µl di β-mercaptoetanolo. Il lisato era poi trasferito in colonnine deputate all'eliminazione del DNA. In seguito a centrifugazione per 30sec a 13000rpm la colonna era scartata e mantenuto il liquido "filtrato" che conteneva l'RNA da purificare. Era perciò aggiunto un pari volume di etanolo 70% e

mescolato accuratamente. Il tutto veniva trasferito in una nuova colonnina specifica per la purificazione dell'RNA. Più nel dettaglio 700µl del campione erano trasferiti nella colonna, centrifugati per 15sec a 13000rpm. L'RNA, a questo punto mantenuto a livello del filtro della colonnina, era sottoposto a lavaggi con differenti buffer contenenti etanolo a diverse concentrazioni eliminati mediante multiple centrifugate di 15sec a 13000rpm. Al fine di eliminare accuratamente tutti i residui di etanolo ciascun campione era infine centrifugato a 14000rpm per 2min. Al termine di questi passaggi l'RNA era doppiamente eluito con 30µl di acqua Rnasi-free.

L'RNA così purificato è stato quantificato mediante spettrofotometro NanoDrop 2000 (ThermoScientific) ad una lunghezza d'onda di 260nm. La purezza dell'RNA è stata verificata valutando il rapporto tra i valori di assorbanza registrati alle lunghezze d'onda di 260nm e 280nm.

3.5.3 Analisi dell'espressione genica mediante RT-qPCR

Una quantità pari a 500ng di RNA è stata sottoposta a retrotrascrizione in cDNA con random primers impiegando 200 unità di enzima MMLV-RT (Invitrogen®). Le condizioni termiche della reazione erano le seguenti: 10min a 25°C per permettere l'annealing dei primers, a seguire 50min a 37°C. L'enzima era successivamente inattivato alla temperatura di 70°C per 15min.

Per l'analisi dell'espressione genica dei vari campioni rappresentativi dei diversi tipi e intervalli di trattamento è stata impiegata la metodica di PCR quantitativa (qPCR) usando una master mix caratterizzata dalla molecola SYBR® Green (Applied Biosystem) come colorante fluorescente. Sono stati considerati nell'analisi i noti geni target di Erα, *ADORA1* e *IL20*, e come gene house-keeping di riferimento *36B4*. In tabella 3 sono indicate le sequenze delle coppie di primers impiegate.

In un volume di reazione di PCR pari a 10µl è stata allestita la mix contentente i primers Fw e Rv alla concentrazione di 200nM, 1µl di templato e 5µl di master mix. I parametri termici impostati erano i seguenti: un primo stage di 10 min a 95°C e uno successivo di 40 cicli a due step, con denaturazione di 15sec alla temperatura di 95°C e successiva fase di elongazione di 60sec a 60°C.

Sequenza
36B4-Fw 5'- GTG TTC GAC AAT GGC AGC AT – 3' 36B4-Rv 5'- GAC ACC CTC CAG GAA GCG A – 3'
ADORA1-Fw 5'- TTC CAC ACC TGC CTC ATG GT – 3' ADORA1-Rv 5'- GCG GTC CAC AGC AAT TGC – 3'
IL20-Fw 5'- TTG CCT TCA GCC TTC TCT CT – 3' IL20-Rv 5'- CTG CCC CGT ATC TCA GAA AA – 3'

Tabella 3: Sequenze dei primers impiegati per l'analisi mediante qPCR

Per la quantificazione dei prodotti di PCR è stato applicato il metodo della quantificazione relativa ad una retta standard, definita dall'equazione seguente:

$$y = mx + b,$$

dove y rappresenta il valore Ct, m il coefficiente dell'intercetta.

Il valore Ct (Cycle threshold) rappresenta il numero di cicli richiesti affinché il segnale fluorescente raggiunga una soglia definita nella fase lineare della reazione di qPCR. Il coefficiente m, pari a –3.4, rappresenta una curva con R^2 pari a 0.99 ed una efficienza del 100%, ossia ad ogni ciclo nella fase lineare corrisponde ad un raddoppiamento del prodotto di PCR.

Per normalizzare la variazione individuale dei campioni in termini di espressione quantitativa, vengono impiegati i valori di Ct del gene house-keeping. I valori di Ct del campione sono infatti espressi relativamente ai Ct registrati per il gene house-keeping di riferimento *36B4*, altamente e stabilmente espresso nella linea cellulare impiegata.

I dati di espressione genica sono poi espressi in termini di n-volte di differenza in relazione al controllo non trattato.

3.6 Analisi statistica

Le analisi statistiche sono state eseguite mediante GraphPad software versione 4.0 per Windows (GraphPad Software, San Diego, California). L'analisi descrittiva è stata inizialmente condotta per tutti parametri indagati, utilizzando medie (±DS) e mediane con range.

Per i dati del test di fenotipizzazione, la frequenza delle distribuzioni dei rapporti metabolici descritti come $\log_{10}$ [DMT/DEX] sono state rappresentate come istogrammi.

I confronti tra le variabili continue sono stati eseguiti con l'analisi della varianza (ANOVA) nel caso di più gruppi e con il test t di student (per dati appaiati e non) nel caso di due gruppi. Per tutti i test è stato considerato significativo un valore di $p<0.05$.

Per le analisi di correlazione è stato impiegato il metodo della regressione lineare indicando il coefficiente di correlazione R^2 come misura della bontà dell'addattamento delle rette stimate ai dati osservati.

4. RISULTATI

Il campione di pazienti finora disponibili per l'analisi è composto da 119 soggetti, di età compresa tra i 30 e gli 89 anni, con un valore medio di anni 60 (±11).
Tutte le pazienti avevano avuto una diagnosi di tumore mammario infiltrante positivo per i recettori estrogenici ed erano state sottoposte ad intervento chirurgico per la resezione radicale del tumore. Le pazienti arruolate avevano indicazione al trattamento adiuvante anti-estrogenico con la dose giornaliera di 20mg di tamoxifen, con la finalità di ridurre il rischio di recidiva della malattia. Una percentuale dell'80% si presentava all'arruolamento già in stato menopausale.

4.1 Test di fenotipizzazione

Il test di fenotipizzazione è stato eseguito su 96 pazienti, che al momento dell'arruolamento non avevano ancora intrapreso la terapia con tamoxifen, al fine di poter stimare l'attività metabolica del CYP2D6.
Le valutazioni sono state eseguite su campioni di urine raccolte nelle 8h successive alla somministrazione orale di una dose di 15 mg del farmaco sonda destrometorfano, commercialmente disponibile in compresse masticabili (Bronchetab_GlaxoSmithKline). Per ogni paziente sono stati dosati i livelli di destrometorfano e del suo metabolita destrorfano, derivato dalla demetilazione del farmaco parentale ad opera del CYP2D6, ed è stato calcolato il rapporto delle concentrazioni quale indicatore dell'attività dell'enzima.
Le determinazioni urinarie hanno permesso di stimare per ciascun soggetto l'attività metabolica del CYP2D6. I rapporti metabolici (MR) destrometorfano/destrorfano (DMT/DEX), espressi su scala logaritmica, erano caratterizzati da una ampia variabilità interindividuale e da una distribuzione multimodale, in un range compreso tra (–3.07) – (+1.23). Il valore mediano è stato individuato pari a –1.63.
Sulla base di cut-off derivati dalla letteratura (Gaedik A et al., 2008), sono state create quattro classi metaboliche: valori maggiormente negativi di MR individuano soggetti con metabolismo ultra-rapido (MR<-2,52), rapido (-2,52 <MR< -1,52) o intermedio (-1,52 <MR< -0,52), mentre valori superiori (MR> -

0,52) identificano i metabolizzatori lenti; i soggetti in studio sono stati classificati come segue: 1 paziente nella classe ultra-rapida (UM), 59 pazienti nella classe dei metabolizzatori rapidi (EM), 18 nella classe dei metabolizzatori intermedi (IM) e 18 nella classe con metabolismo lento (PM). La suddivisione in quattro classi è evidente anche dal grafico ad istogrammi (Figura 9), che riporta la distribuzione dei valori di MR urinari e si presenta di tipo quadrimodale.

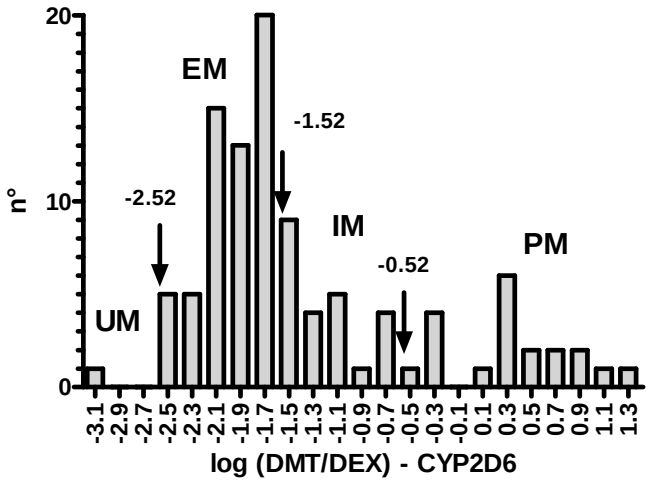


Figura 9. Distribuzione dei rapporti metabolici, espressi in logaritmo (log), di destrometorfano/destrorfano (DMT/DEX). Vengono riportati i quattro gruppi metabolici di CYP2D6 e i valori di cut-off che li individuano (frecce). **UM:** ultra-rapidi, **EM**: rapidi; **IM**: intermedi; **PM**: lenti. **n°:** numerosità assoluta .

4.2 Dosaggio di tamoxifen e dei metaboliti

Il dosaggio di tamoxifen e dei metaboliti (endoxifen, 4-idrossitamoxifen, N-desmetiltamoxifen) è stato eseguito su campioni di plasma di 93 pazienti, sottoposte al test di fenotipizzazione, dopo un mese dall'inizio del trattamento. La stessa analisi è stata eseguita in altre 18 pazienti eleggibili al trattamento con tamoxifen 20mg/die nelle quali però il test di fenotipizzazione era controindicato.

Le valutazioni plasmatiche allo stato stazionario, raggiunto dopo tre-quattro mesi di terapia, sono state eseguite per 91 pazienti.

I livelli plasmatici di tamoxifen e di endoxifen, 4-idrossitamoxifen e N-desmetiltamoxifen presentavano un'ampia variabilità tra i soggetti (Tabella 4, a e b).

Le concentrazioni plasmatiche dopo il primo mese di trattamento avevano i seguenti range, espressi in ng/ml: endoxifen tra 1.2 e 27; tamoxifen tra 38.5 e 448.78; 4-idrossitamoxifen tra 0.76 e 9.69; N-desmetiltamoxifen tra 58.6 e 556.2.

a.

	MIN [ng/ml]	MAX [ng/ml]	VALORE MEDIANO [ng/ml]
Endoxifen	1.2	27	6.9
Tamoxifen	38.5	448.78	182.97
4OHtam	0.76	9.69	2.73
NDtam	58.6	556.2	173.25

b.

	MIN [ng/ml]	MAX [ng/ml]	VALORE MEDIANO [ng/ml]
Endoxifen	2	39.2	8.6
Tamoxifen	28.,6	455	209.67
4OHtam	0.47	8.32	2.66
NDtam	44.2	513	223.52

Tabella 4. Concentrazioni plasmatiche di tamoxifen e metaboliti espresse in ng/ml, valori minimo, massimo e mediano. a: concentrazioni dopo il primo mese di terapia. **b**: concentrazioni allo stato stazionario. **4OHtam:** 4-idrossitamoxifen**; NDtam:** N-desmetiltamoxifen**.**

I range dei livelli plasmatici allo stato stazionario erano invece i seguenti (ng/ml): endoxifen tra 2 e 39.2; tamoxifen tra 28.6 e 455; 4OHtam tra 0.47 e 8.32; NDtam tra 44.2 e 513.

E' stata valutata la correlazione tra le concentrazioni plasmatiche dei diversi metaboliti allo stato stazionario ed è stato evidenziato che esistono associazioni lineari fortemente significative tra i livelli tamoxifen vs N-desmetiltamoxifen (R^2=0.63, p<0.0001) e di endoxifen vs 4-idrossitamoxifen (R^2=0.75, p<0.0001), come riportato in Figura 10.

Al contrario risultano poco o per nulla significative le associazioni tra i livelli allo stato stazionario di endoxifen vs tamoxifen (R^2=0.09, p=0.002) e di endoxifen vs N-desmetiltamoxifen (R^2=0.009, p=non significativo), (Figura10).

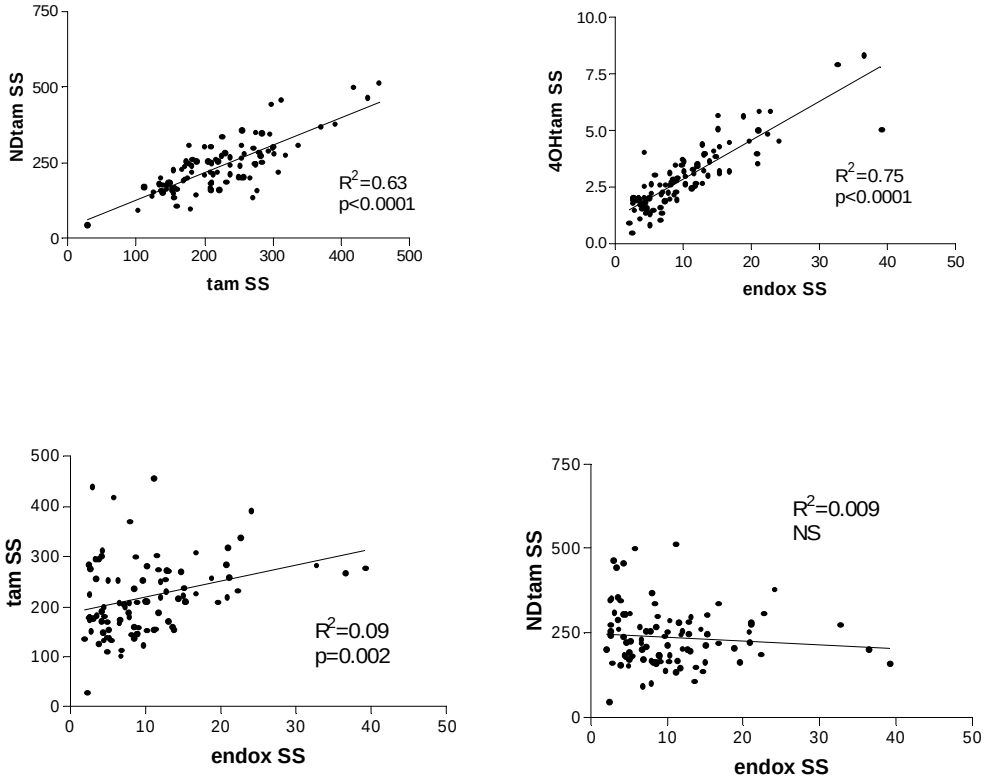


Figura 10. Correlazioni lineari tra le concentrazioni di tamoxifen e dei metaboliti rilevati allo stato stazionario (SS). In alto le correlazioni significative (p<0.0001) di N-desmetiltamoxifen vs tamoxifen e di 4-idrossitamoxifen vs endoxifen. In basso le correlazioni di endoxifen vs tamoxifen (p=0.002) e vs N-desmetiltamoxifen (p non significativo, NS). Per tutte le rette di associazione sono riportati i coefficienti R^2. **SS**: stato stazionario. **Ndtam**: N-desmetiltamoxifen; **tam**: tamoxifen; **4OHtam**: 4-idrossitamoxifen; **endox**: endoxifen.

4.3 Associazioni tra livelli di tamoxifen e metaboliti dopo il primo mese di terapia e allo stato stazionario

Allo scopo di stabilire se un mese di trattamento con tamoxifen fosse sufficiente per fornire indicazioni riguardo ai livelli di esposizione al farmaco e dei suoi metaboliti raggiunti allo stato stazionario, abbiamo analizzato le correlazioni tra le concentrazioni plasmatiche di tamoxifen e metaboliti misurate nelle prime fasi di terapia e quelle misurate allo stato stazionario, in 97 pazienti.

Dall'analisi è emerso che per tamoxifen, endoxifen, 4OHtam e NDtam esistono correlazioni positive molto significative (p<0.0001) tra rispettivamente i livelli al primo e al quarto mese (Figura 11). Particolarmente forte è risultata l'associazione

tra le concentrazioni al primo mese e allo stato stazionario per endoxifen, che presentava un coefficiente di correlazione R^2=0.76; i coefficienti delle altre correlazioni erano R^2=0.56 per tamoxifen, R^2=0.69 per 4OHtam e R^2=0.47 per NDtam.

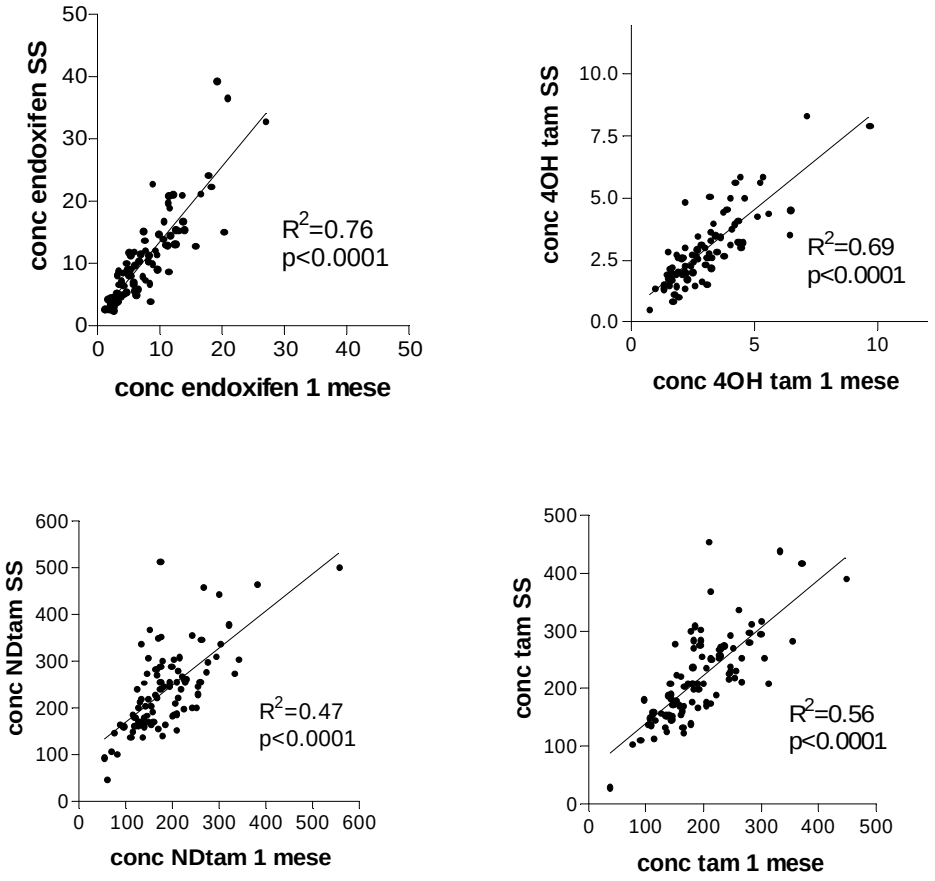


Figura 11. Rette di correlazione tra le concentrazioni plasmatiche del 1° mese verso 4° mese per tam e metaboliti. In ogni grafico la retta a linea continua è relativa alla correlazione tra livelli plasmatici, espressi in ng/ml, del primo mese e dello stato stazionario. Per tale associazione, in ciascun grafico, è indicato il coefficiente di correlazione (R^2) e l'indice di significatività p (<0.0001). **tam**: tamoxifen, **4OHtam:** 4-idrossitamoxifen; **NDtam:** N-desmetiltamoxifen.

I livelli allo stato stazionario risultavano significativamente aumentati rispetto al primo mese, in media di 24.6 ng/ml (+12.6%) per tamoxifen (p<0.0001), 52.2 ng/ml (+28.3%) per NDtam (p<0.007) e 2.8 ng/ml (+37.7%) per endoxifen (p<0.0001), mentre erano sostanzialmente uguali (-3.6%) per 4OHtam (p=NS), come riportato in Tabella 5.

	[1° mese] (ng/ml)	[SS] (ng/ml)	Variazione (ng/ml)	Variazione (%)
Endoxifen	7.51	10.35	2.84	37.70%
Tamoxifen	194.87	219.46	24.59	12.61%
4OHtam	3.04	2.,93	-0.11	-3.60%
NDtam	184.75	236.95	52.21	28.25%

Tabella 5. Variazioni medie dei livelli di tamoxifen e metaboliti dal primo mese di terapia al raggiungimento dello stato stazionario (SS). I livelli sono espressi come concentrazioni in ng/ml. Le variazioni di concentrazione sono indicate in valore assoluto (ng/ml) ed in percentuale (%). **SS**: stato stazionario. **4OHtam**: 4-idrossitamoxifen; **NDtam**: N-desmetiltamoxifen.

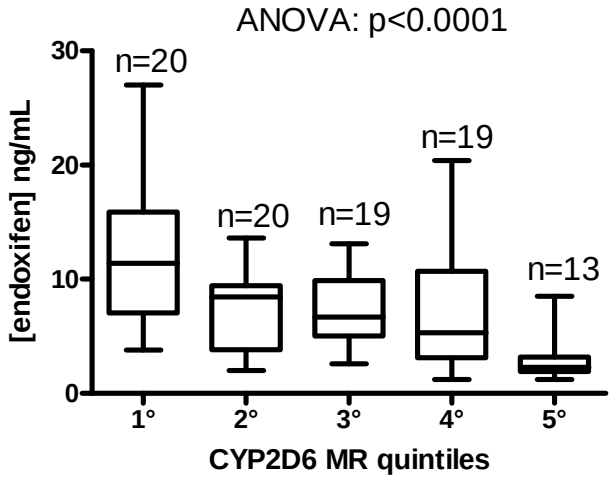
4.4 Associazione tra test di fenotipizzazione con destrometorfano e livelli di endoxifen

Al fine di individuare la capacità predittiva del test di fenotipizzazione sui livelli plasmatici di endoxifen sono state eseguite alcune analisi di associazione: inizialmente i valori dei rapporti metabolici (logMR destrometorfano/destrorfano) sono stati divisi in quintili e sono stati confrontati i livelli di endoxifen dei quintili tramite l'analisi della varianza (ANOVA): la relazione è risultata altamente significativa ($p<0.0001$), (Figura 12, A).

Proseguendo nella analisi non si evidenziavano però differenze significative tra i gruppi corrispondenti ai quintili 2°, 3° e 4°, mentre al contrario risultava significativa la differenza tra i quintili 1° e 5°, 1° e 3° e infine 3° e 5° ($p<0.001$), (Figura 12, A).

Per questo è risultato conveniente, ai fini della classificazione dei pazienti, riunire i quintili 2°, 3° e 4°, tanto che si sono ottenute differenze significative tra tutti i gruppi. I valori medi (±DS) delle concentrazioni plasmatiche di endoxifen in ng/ml erano 13.02 (±6.09), 7.40 (± 3.9) e 4.80 (± 5.04) nel 1°, 2°-4° e 5° quintile, rispettivamente. Si è così ottenuta una elevata significatività ($p<0.001$) nelle differenze delle concentrazioni di endoxifen tra i gruppi 1° vs 2°-4° e 1° vs 5° quintile, con una lieve riduzione ($p<0.01$) confrontando i quintili 2°-4° vs 5°, (Figura 12, B).

A.



B.

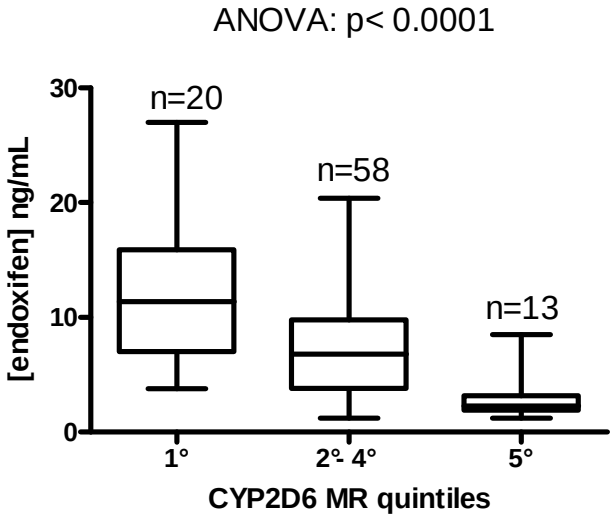


Figura 12. Livelli plasmatici di endoxifen in funzione dei rapporti metabolici di CYP2D6 (MR) individuati tramite il test di fenotipizzazione con destrometorfano . A. Le diverse classi metaboliche sono state ottenute dividendo i valori di MR in quintili. **B.** Le diverse classi metaboliche sono state ottenute accorpando i quintili 2°,3° e 4°. N= numerosità dei gruppi. La linea centrale in ciascun rettangolo indica il valore di mediana. p= significatività della analisi della varianza (ANOVA).

Infine l'analisi di regressione lineare ha dimostrato che esiste una significativa correlazione inversa tra la capacità metabolica di CYP2D6 individuata dal test di fenotipizzazione ed espressa come logMR e i livelli plasmatici di endoxifen (R^2=0.35, p<0.0001), espressi come logaritmo della concentrazione (ng/ml), (Figura 13).

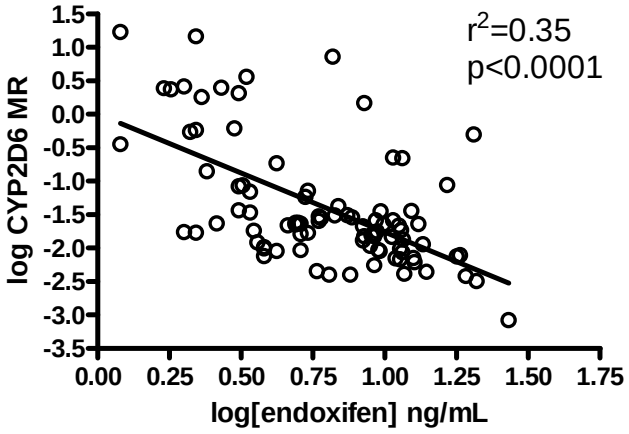


Figura 13. Retta di correlazione tra rapporti metabolici (logMR*CYP2D6*) e le concentrazioni plasmatiche di endoxifen (ng/ml). Il coefficiente di correlazione r^2 è riportato. È indicato l'indice di significatività p (<0.0001).

4.5 Associazione tra test di fenotipizzazione con destrometorfano e vie metaboliche di tamoxifen e metaboliti

Sono state valutate le associazioni tra i rapporti metabolici ottenuti tramite il test di fenotipizzazione e i rapporti delle concentrazioni plasmatiche di ogni metabolita con il proprio precursore (vedi Figura 3, sezione "Introduzione" per le vie metaboliche di tamoxifen e metaboliti precursori di endoxifen).

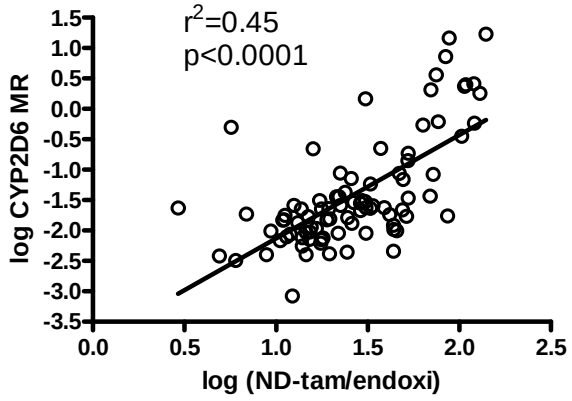


Figura 14. Correlazione tra i rapporti metabolici (logMR) ottenuti dal test di fenotipizzazione e i rapporti delle concentrazioni di N-desmetiltamoxifen/endoxifen, espressi in logaritmo. Il coefficiente di correlazione r^2 è indicato, così come il valore di significatività p. **ND-tam:** N-desmetiltamoxifen; **endoxi**: endoxifen.

L'associazione maggiormente significativa è stata riscontrata nel caso della tappa metabolica NDtam/endoxifen (r^2=0.45, p<0.0001), (Figura 14), catalizzata esclusivamente dal CYP2D6.

4.6 Genotipizzazione di *CYP2D6*

Tutte le pazienti sono state caratterizzate dal punto di vista genetico valutando otto polimorfismi del gene *CYP2D6*, scelti perché hanno un elevato impatto sulla funzionalità dell'enzima ed una significativa frequenza nella popolazione caucasica.

I polimorfismi analizzati caratterizzano gli alleli *1, *3, *4, *5, *6, *9, *10 e *41; le frequenze alleliche riscontrate nel nostro campione sono risultate in linea con le frequenze alleliche attese e in accordo con la legge di Hardy-Weinberg. Le frequenze sono riportate in tabella 5.

Allele	WT (%)	HT (%)	MUT (%)	Totale
*Cyp2d6**3 (2549delA)	112 (94.1)	5 (4.2)	2 (1.7)	119
*Cyp2d6**4 (G1846A)	75 (63)	39 (32.8)	5 (4.2)	119
*Cyp2d6**6 (T1707del)	116 (98.3)	1 (0.85)	1 (0.85)	118 (1 n.d.)
*Cyp2d6**9 (2615_2617delAAG)	111(93.3)	8 (6.7)	0	119
*Cyp2d6**10 (C100T)	85 (71.4)	34 (28.6)	0	119
*Cyp2d6**41 (G2988A)	99 (83.9)	17 (14.4)	2 (1.7)	118 (1 n.d.)
*Cyp2d6**5 (geneDel)	115 (96.6)	4 (3.4)	0	119

Tabella 5. Frequenze alleliche registrate per i polimorfismi del gene *CYP2D6* caratterizzanti gli alleli *1, *3, *4, *5, *6, *9, *10, *41. Sono riportati i numeri assoluti e fra parentesi le percentuali (%). **n.d.**=non determinato. **WT**: wild-type; **HT**: eterozigote; **MUT**: mutato.

In base ai singoli polimorfismi ad ogni soggetto è stato attribuito un genotipo, tenendo conto del significato funzionale delle diverse variazioni e combinando gli eventuali alleli mutati col seguente ordine prioritario: variazioni per *3, *4 e *5 e *6 sono state considerate essere variazioni maggiormente influenti sul fenotipo, in quanto all'origine di attività enzimatica nulla, e a seguire mutazioni negli alleli *9, *10 e *41. Nei casi in cui non fossero state riscontrate variazioni di sequenza, all'individuo era attribuito il genotipo rappresentativo della combinazione allelica wild-type, *1/*1.

Nel campione analizzato sono state ritrovate 20 combinazioni genotipiche differenti con frequenza variabile: il genotipo *1/*1, associato ad attività enzimatica normale, è risultato il più frequente, presente in 47 soggetti. A seguire, in 20 individui, il genotipo *4/*10, in 12 pazienti la combinazione genotipica *1/*41; in altri 9 è stato registrato il genotipo *1/*4, e in 4 i genotipi *3/*4 e *4/*4. I genotipi *1/*10 e *4/*9 sono stati riscontrati in 3 soggetti, mentre in 2 erano presenti i genotipi *1/*9, *4/*41, *9/*41, *1/*5 e *41/*41. Presenti in un unico paziente erano i seguenti genotipi: *1/*3, *10/*41, *3/*3, *3/*5, *4/*5, *6/*6 e *6/*9.

In seguito, in base al genotipo, le pazienti sono state divise in tre classi metaboliche, secondo i seguenti criteri:

1. soggetti con entrambi gli alleli normofunzionanti (*1) definiti metabolizzatori rapidi (EM).
2. soggetti con entrambi gli alleli ad attività nulla (*3, *4, *5, *6) definiti metabolizzatori lenti (PM).
3. tutti gli altri soggetti, con uno o due alleli ad attività ridotta (*9, *10, *41) o un solo allele ad attività nulla associato ad un allele wild type o uno ad attività ridotta, definiti metabolizzatori intermedi (IM).

Il campione è quindi risultato costituito come segue: 47 individui metabolizzatori rapidi (EM), 58 individui metabolizzatori intermedi (IM) ed 14 individui metabolizzatori lenti (PM).

4.7 Associazione tra test di fenotipizzazione con destrometorfano e genotipo di *CYP2D6*

E’ stata analizzata la relazione tra la capacità metabolica del CYP2D6, individuata dal rapporto metabolico tramite test di fenotipizzazione con destrometorfano (logMR DMT/DEX), ed il genotipo del gene *CYP2D6*, suddiviso nelle tre classi funzionali dei metabolizzatori lenti (PM), intermedi (IM) o rapidi (EM), come descritto nel paragrafo precedente.

I valori medi (±DS) dei rapporti metabolici erano 0.35(±0.49), -1.16(±0.30) e –1.91(±0.38) rispettivamente per i gruppi genotipici PM, IM e EM; le differenze erano statisticamente significative, valutate con l’analisi della varianza (ANOVA,

p<0.0001), come riportato in Figura 15. Inoltre i confronti a coppie hanno evidenziato differenze significative dei MR tra le classi PM *vs* EM e PM *vs* IM (p<0.001). Il confronto di EM *vs* IM non ha dato invece nessuna significatività (figura 15).

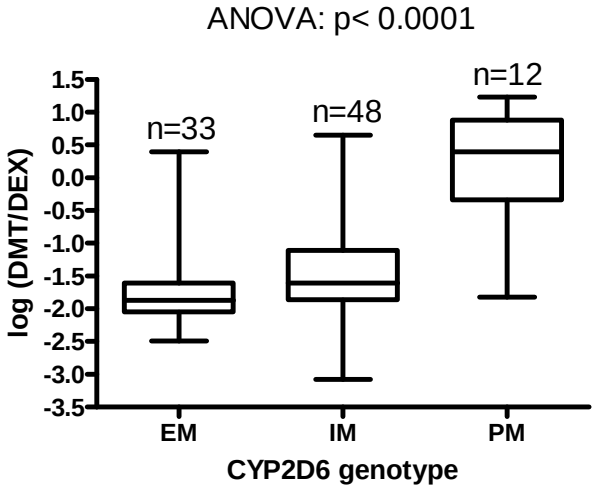


Figura 15. Rapporti metabolici destrometorfano/destrorfano, espressi in logaritmo, in funzione delle classi genotipiche di *CYP2D6*. n= numero di soggetti per gruppo Il p dell'analisi della varianza (ANOVA), è riportato. La linea centrale in ciascun rettangolo indica il valore mediano.**EM:** metabolizzatori rapidi; **IM:** metabolizzatori intermedi; **PM:** metabolizzatori lenti

4.8 Correlazione tra genotipo di *CYP2D6* e concentrazione plasmatiche di endoxifen

L'analisi della relazione tra il genotipo di *CYP2D6* e le concentrazioni plasmatiche di endoxifen è stata eseguita su 114 soggetti.

Le concentrazioni medie (±DS) di endoxifen erano 3.5 (±2.4), 6.8 (±4.7) e 9.9 (±4,6) ng/ml rispettivamente per i gruppi genotipici PM, IM e EM; i livelli erano significativamente diversi, valutati con l'analisi della varianza (ANOVA, p<0.0001), come riportato in Figura 16. I confronti a coppie hanno evidenziato differenze significative delle concentrazioni di endoxifen tra le classi EM *vs* PM, (p<0.001), EM vs IM (p<0.001) e IM vs PM (p<0.05) (Figura 16).

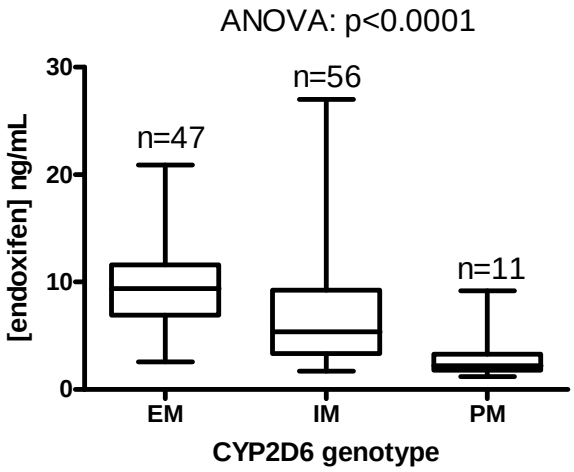


Figura 16. Concentrazioni plasmatiche di endoxifen (ng/ml) in funzione delle tre classi genotipiche di *CYP2D6*. n= numero di soggetti per gruppo. Il p dell'analisi della varianza (ANOVA), è riportato. La linea centrale in ciascun rettangolo indica il valore mediano.**EM:** metabolizzatori rapidi; **IM:** metabolizzatori intermedi; **PM:** metabolizzatori lenti.

4.9 Analisi degli effetti collaterali in corso di trattamento con tamoxifen

In occasione del prelievo ematico del primo mese di trattamento con tamoxifen e dello stato stazionario, alle pazienti era proposto un questionario riguardante i sintomi potenzialmente derivanti dal trattamento con tamoxifen. In particolare la nostra analisi si è focalizzata sulla comparsa dell'effetto collaterale più comune, ossia le vampate di calore; la paziente indicava la presenza del sintomo utilizzando una scala da 0 (=assente) a 4 (estremamente frequente).

Avevamo a disposizione dati relativi a 87 pazienti al primo mese di terapia e ad 84 pazienti in stato stazionario.

Il gruppo al primo mese aveva un'età media di 60 anni (±10), minima 44 anni e massima 89 anni. La loro concentrazione plasmatica media di endoxifen era pari a 7.9 ng/ml. Il gruppo dello stato stazionario presentava caratteristiche demografiche simili (min.45 anni, max. 89 anni, età media:61±10) ed un valore medio di concentrazione del metabolita endoxifen pari a 9.9 ng/ml.

Le pazienti sono state divise in tre fasce d'età: 45-60, 61-75, 76-90 anni.

Al primo mese, la comparsa delle vampate di calore era riportata con maggiore frequenza dal sottogruppo delle pazienti più giovani (40%); non si evidenziava nessuna relazione tra la comparsa degli effetti collaterali e i livelli plasmatici di

endoxifen. Allo stato stazionario la percentuale di soggetti tra i 45 e i 60 anni che riportava di vampate di calore con frequenza elevata saliva al 55.5%.
Analizzando separatamente i diversi livelli di frequenza degli effetti collaterali non si evidenziava nessuna relazione con le concentrazioni plasmatiche di endoxifen; al contrario dividendo i soggetti in due gruppi, con sintomatologia assente/lieve (0-1) o media-severa (2-4) le concentrazioni di endoxifen risultavano nettamente diverse: il valore medio del primo gruppo era di 19.79 ng/ml e saliva a 28.97 ng/ml nel gruppo di pazienti che riportava una elevata frequenza di vampate.

4.10 Effetto inibitorio dell'isoforma del recettore degli estrogeni β2 sull'azione anti-estrogenica di endoxifen

Lo studio dei possibili fattori predittivi di risposta è stato integrato con uno studio in vitro mirante ad indagare il possibile ruolo della isoforma recettoriale Erβ2 sulla risposta al trattamento col metabolita attivo endoxifen.
Le analisi sono state condotte impiegando come modello sperimentale la linea cellulare di carcinoma mammario MCF7. Tale linea cellulare, poiché dotata di un sistema di espressione *tet-off*, era in grado di esprimere stabilmente anche l'isoforma 2 del recettore estrogenico β (altrimenti detta βcx), (vedi paragrafo 3.5.1, sezione "Materiali e Metodi").
Dal momento che il recettore per gli estrogeni alpha (Erα) agisce da modulatore della trascrizione genica, per valutare quanto nella sua azione è influenzato dalla presenza di Erβcx abbiamo indagato l'espressione di due noti geni di Erα, *ADORA1* e *IL20*, dimostrati essere responsabili della progressione cellulare tumorale, in seguito al trattamento con estradiolo (E2) 1nM da solo o in combinazione con due differenti concentrazioni di endoxifen (20 e 40 nM).
La valutazione è avvenuta a quattro distinti punti temporali dopo l'inizio del trattamento (3h, 6h, 12h e 24h); in Figura 17 sono riportate le rappresentazioni grafiche riferite al punto temporale di 24h per i due geni analizzati espressi come incremento o decremento di espressione relativo al controllo non trattato.

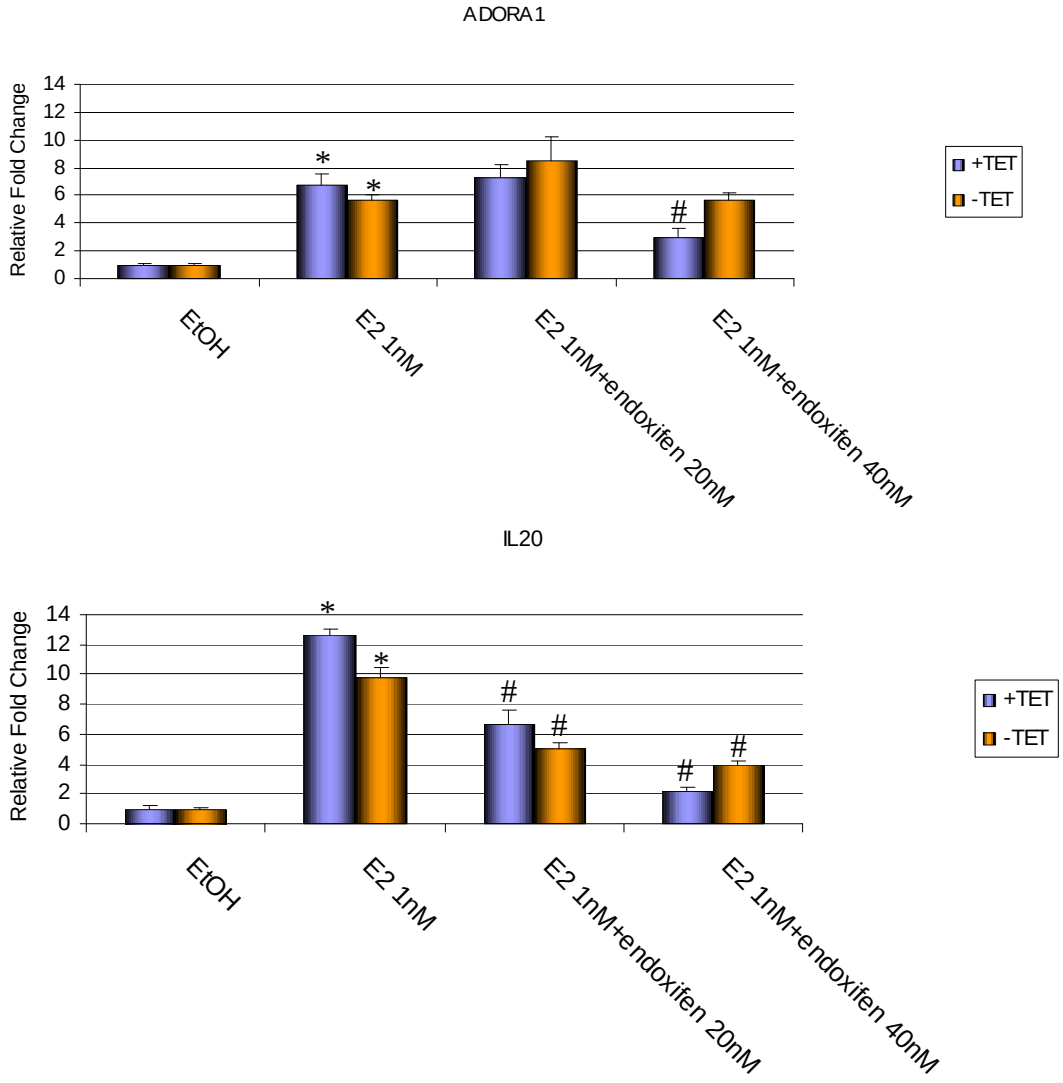


Figura 17. Rappresentazione grafica dell'espressione genica di *ADORA1* e *IL20* nella linea cellulare MCF7 dopo trattamento indicato per 24h. L'espressione dei geni è rappresentata come variazione media rispetto al controllo non trattato (veicolo, EtOH). *, indica significatività comparata al rispettivo veicolo. #, indica significatività comparato al rispettivo trattamento con estrogeno (E2) 1nM: l'errore standard è indicato per ciascun tipo di campione. **E2**: estrogeno. **+TET:** indica la presenza del farmaco tetraciclina; **-TET:** indica l'assenza del farmaco tetraciclina, con conseguente espressione dell'isoforma recettoriale βcx.

Dall'analisi complessiva dei dati riguardanti il gene *ADORA1* è emerso che differenze sostanziali fra le due linee cellulari sono apprezzabili in corrispondenza del trattamento più prolungato, ossia 24 ore e in riferimento alla concentrazione più elevata di metabolita impiegato, 40nM.

Infatti, in relazione a tale gene, in seguito a stimolazione estrogenica (E2, 1nM) si osserva che entrambe le linee rispondono in modo comparabile. Più nel dettaglio

sia in presenza che in assenza dell'isoforma βcx, in seguito a trattamento con estrogeno, Erα esprime la sua capacità di modulatore trascrizionale a livello del promotore, inducendo un'espressione significativamente aumentata in comparazione al controllo non trattato (veicolo, EtOH), ($p<0.05$). Se si considera poi la situazione in cui allo stimolo con l'agonista estrogeno di 1nM è associato il metabolita endoxifen, alla concentrazione di 20nM, è possibile osservare che tale quantità di farmaco non è in grado di ridurre in modo significativo l'espressione genica in entrambe le linee cellulari. Al contrario, alla concentrazione di 40nM di endoxifen, si può notare un significativo effetto di riduzione dell'espressione solo nella linea cellulare priva dell'isoforma ($p<0.05$), suggerendo un effetto inibitorio sull'azione di endoxifen da parte dell'isoforma βcx.

Dalla valutazione dei dati riassuntivi riferiti al gene *IL20*, si osserva un profilo leggermente differente ma alla concentrazione più elevata di endoxifen si ripresenta lo stesso evento precedentemente descritto.

Anche in questo caso la risposta alla stimolo con estrogeno (1nM) induce un'aumentata espressione genica nelle due linee cellulari ($p<0.001$) ma a differenza di *ADORA 1*, con la concentrazione di endoxifen pari a 20nM risulta una riduzione significativa dell'espressione di *IL20*. Analizzando poi i dati relativi al trattamento con endoxifen 40nM in associazione con estrogeno 1nM, si registra una riduzione dell'espressione genica maggiormente significativa ($p<0.001$ vs $p=0.007$, rispettivamente) quando si è in esclusiva presenza di Erα, a conferma dell'azione inibitoria di Erβcx su endoxifen.

5. DISCUSSIONE

Negli ultimi anni si sta affermando sempre più il concetto di personalizzazione della terapia. E' noto infatti che l'efficacia e la tollerabilità di molti farmaci presentino elevata variabilità tra gli individui. Tali differenze derivano da caratteristici fattori di ciascun soggetto come l'età, la presenza di comorbidità, l'interazione con altre sostanze (siano esse farmaci o componenti della dieta) e non ultimo la genetica.

Questo approccio sembra essere particolarmente perseguito in campo oncologico, dove l'importanza di una terapia farmacologica efficace e ben tollerata assume un peso rilevante e molto spesso determinante per la sopravvivenza e la qualità di vita dei pazienti.

E' stato stimato che la media degli individui responsivi ai trattamenti oncologici si attesti attorno al 25%, suggerendo che il 75% dei pazienti sia esposto a cure inutili e spesso gravate da pesanti reazioni avverse, talora fatali (Spear BB et al., 2001).

Il nostro progetto si è occupato del trattamento adiuvante, mediante tamoxifen, della neoplasia mammaria, focalizzando l'attenzione sui possibili fattori responsabili della variabilità nella risposta al trattamento farmacologico.

Il carcinoma mammario è il tumore a maggiore incidenza nella popolazione femminile occidentale costituendo la principale causa di morte correlata al cancro.

In larga misura (60-80% dei casi) presenta come caratteristica isto-patologica la positività per i recettori degli estrogeni.

Da circa tre decadi, per il trattamento di tali sottotipi neoplastici, si ricorre al modulatore selettivo anti-estrogenico (SERM) di prima generazione tamoxifen, che ha la capacità di bloccare la proliferazione cellulare, derivante dallo stimolo estrogenico, a livello del tessuto mammario. E' considerato il farmaco d'elezione nelle pazienti in pre-menopausa, mentre può essere impiegato nelle pazienti in post-menopausa in alternativa o in sequenza con i farmaci inibitori delle aromatasi.

La terapia con tamoxifen, standardizzata alla dose di 20 mg/die, presenta una sostanziale variabilità di efficacia, sebbene ad oggi i successi terapeutici di tale cura siano evidenti ed ancora apprezzati. Si riscontra nella pratica clinica che, nonostante la terapia attuata con finalità preventiva, una percentuale non

trascurabile delle pazienti presenta una ripresa della malattia (3% annuo), suggerendo che i benefici di questo trattamento non siano uniformi.

I dati emersi negli ultimi anni riguardo alla farmacogenetica del tamoxifen hanno permesso di spiegare in parte tali differenze, ma poiché talvolta contrastanti, rappresentano ancora oggi motivo di dibattito nella comunità scientifica internazionale (Brauch H et al., 2013).

Nello specifico tamoxifen è un pro-farmaco che è metabolizzato, per azione del citocromo P450 CYP2D6, in metaboliti maggiormente attivi e potenti rispetto al farmaco parentale. Tra questi assume una notevole importanza il metabolita endoxifen, ritenuto il principale responsabile della risposta terapeutica poiché, oltre ad esibire un'affinità con il target molecolare, dalle 40 alle 100 volte superiore rispetto al tamoxifen, presenta frequentemente livelli plasmatici più elevati, se comparati all'altrettanto attivo metabolita 4-idrossitamoxifen (Johnson MD et al., 2004). Oltre ai dati in vitro, ci sono evidenze che i livelli plasmatici di endoxifen correlino significativamente con la risposta (Madlensky L et al., 2011) e gli effetti collaterali (Lorizio W et al., 2012) del trattamento con tamoxifen; per questo motivo abbiamo considerato le concentrazioni plasmatiche allo stato stazionario di endoxifen come il marcatore surrogato della efficacia, e hanno costituito l'endpoint principale del nostro progetto.

E' noto che il gene *CYP2D6* presenta delle variazioni di sequenza, per lo più SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), dal dimostrato significato funzionale, in grado di influenzare i livelli del metabolita attivo endoxifen (Tan SH et al., 2008). Molti studi a livello internazionale hanno confermato l'importanza della valutazione del genotipo del *CYP2D6* nella predizione della risposta, anche se si è evidenziato che di per sé non è in grado di spiegare il fenomeno nella sua complessità.

Infatti la capacità bio-trasformativa di ciascun individuo può essere influenzata anche dall'interazione con altri farmaci o componenti della dieta. Alcune interazioni farmacologiche a svantaggio della terapia adiuvante con tamoxifen sono già note, come ad esempio l'assunzione concomitante di antidepressivi della categoria degli inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina (SSRI) (Stearns V et al., 2003), ma è plausibile pensare che ve ne siano delle altre non ancora individuate.

In definitiva, la caratterizzazione genetica del *CYP2D6* presenta una buona potenzialità come marker predittivo di risposta, ma il fenotipo metabolico di CYP2D6 può non essere esclusivamente determinato dal genotipo e derivare invece dalla interazione tra l'effetto funzionale delle variazioni della sequenza genica e altrettanto influenti con-cause ambientali.

Uno degli obiettivi principali del nostro studio è stato quello di stabilire se un test in vivo, che indaga la capacità metabolica effettiva di CYP2D6, o i livelli di endoxifen nelle fasi iniziali del trattamento potessero essere ritenuti metodi predittivi affidabili per avere indicazione riguardo ai livelli di esposizione al metabolita attivo endoxifen; tali test avrebbero potuto superare i limiti della genotipizzazione ed avere il vantaggio di essere informativi prima o nel breve periodo dopo l'inizio del trattamento. Dal punto di vista clinico infatti sarebbe molto importante poter prescrivere alle pazienti una terapia efficace il prima possibile, senza dover attendere la stabilizzazione dei livelli plasmatici di farmaco parentale e metaboliti, che mediamente avviene dopo tre-quattro mesi di terapia giornaliera continuativa.

Lo studio è stato svolto su un campione di circa un centinaio di soggetti, che avevano espresso parere favorevole, mediante sottoscrizione di consenso informato, per sottoporsi al test di fenotipizzazione di CYP2D6 con il farmaco sonda destrometorfano. Le analisi delle urine delle pazienti sono state effettuate prima dell'inizio del trattamento con tamoxifen e in tutti i casi è stato possibile stimare l'attività metabolica di CYP2D6: i rapporti metabolici (log destrometorfano/destrorfano) si sono dimostrati ampiamente variabili nella popolazione analizzata, con un range da (–3.07) – (+1.23) e un valore mediano di –1.63. La distribuzione era inoltre quadrimodale.

Abbiamo quindi utilizzato i cut-off dei rapporti metabolici precedentemente pubblicati da Gaedik e collaboratori (2008), individuati su una coorte di individui sani appartenenti a differenti etnie, per suddividere la nostra popolazione di studio in quattro classi a diversa capacità metabolica dell'enzima CYP2D6: la classificazione si presentava con un 1% di metabolizzatori ultrarapidi, 61% di metabolizzatori estensivi, 19% di metabolizzatori intermedi e 19% di metabolizzatori lenti.

Negli stessi soggetti fenotipizzati sono stati effettuati i dosaggi dei livelli plasmatici del farmaco e dei suoi metaboliti in corrispondenza del primo mese di terapia e dello stato stazionario. Le valutazioni plasmatiche sono state estese anche ad altre pazienti, naïve per il trattamento con tamoxifen, nelle quali però il test di fenotipizzazione era controindicato.

Allo stato stazionario le concentrazioni di tamoxifen correlavano significativamente con quelle di N-desmetiltamoxifen (R^2=0.63 e p<0.0001) e le concentrazioni di 4-idrossitamoxifen correlavano con quelle di endoxifen (R^2= 0.75 e p<0.0001): questi due passaggi metabolici sono infatti catalizzati da più enzimi, che possono compensare eventuali deficit e rendono le reazioni direttamente dipendenti dalla concentrazione dei precursori. Al contrario non esisteva nessuna correlazione tra livelli di endoxifen e il suo precursore NDtam (R^2=0.009 e p=NS): questa tappa viene catalizzata esclusivamente dal citocromo CYP2D6, le cui varianti genetiche possono influenzarne significativamente l'attività, facendone il passaggio metabolico limitante nella sintesi di endoxifen.

La debole correlazione riscontrata tra le concentrazioni di tamoxifen ed endoxifen (R^2=0.09 e p=0.002) avvallano il concetto che globalmente la via metabolica per la sintesi di endoxifen sia influenzata da fattori che non dipendono dalle concentrazioni iniziali del farmaco, tra cui le variazioni di sequenza del gene *CYP2D6*.

Infine, l'intera popolazione in studio è stata caratterizzata per il gene *CYP2D6*. Nella totalità del campione di studio sono stati considerati e indagati i polimorfismi con una frequenza superiore a 1% nella popolazione caucasica, dal momento che le varianti sono presenti con frequenze significativamente differenti nelle diverse etnie (Kurose K et al., 2012). Il genotipo *1/*1, wild-type, è stato riscontrato nel 39% dei soggetti; gli altri presentavano combinazioni di varianti alleliche che determinavano 20 genotipi differenti. Sulla base dei genotipi le pazienti sono state classificate in tre gruppi, come metabolizzatrici rapide (EM), intermedie (IM) o lente (PM).

Per valutare la possibilità di prevedere la capacità individuale di attivare il tamoxifen sono state analizzate le associazioni tra le concentrazioni di endoxifen e:

a) il rapporto metabolico ottenuto con test di fenotipizzazione al destrometorfano
b) i livelli plasmatici di endoxifen al primo mese
c) la genotipizzazione di *CYP2D6*.

L'analisi di **associazione tra rapporto metabolico (logMR) e concentrazione plasmatica di endoxifen** ha evidenziato una elevata significatività, sia che il rapporto metabolico venga utilizzato come variabile continua (R^2=0.35 e p<0.0001) oppure venga suddiviso in varie classi, in base ai quintili (ANOVA p<0.0001); poiché i quintili 2°, 3° e 4° non presentavano differenze significative tra loro sono stati accorpati in un unico gruppo e l'analisi successiva ha dimostrato che le concentrazioni plasmatiche di endoxifen dei tre gruppi costituiti da 1°, 2°-4° e 5° quintile erano significativamente diversi per tutti i confronti a coppia. I nostri dati sono in linea con due recenti pubblicazioni, che hanno mostrato che intercorre una correlazione significativa tra il fenotipo di CYP2D6, calcolato mediante test di fenotipizzazione al destrometorfano, e i livelli plasmatici di endoxifen corrispondenti allo stato stazionario (Antunes MV et al., 2012; de Graan AJ et al., 2011). In quei lavori il test di fenotipizzazione era stato eseguito su sangue, prevedendo più prelievi; il nostro approccio, che utilizza un unico campione urinario, risulta essere meno invasivo e maggiormente accettabile dai pazienti.

Abbiamo poi dimostrato che esiste una correlazione altamente significativa tra il rapporto metabolico ottenuto tramite il test di fenotipizzazione con destrometorfano e il rapporto tra le concentrazioni plasmatiche di endoxifen e il suo diretto precursore NDtam (R^2=0.45 e p<0.0001); tale osservazione conferma la capacità del test di fenotipizzazione di stimare l'attività del CYP2D6, dato che, nella via complessiva del metabolismo del tamoxifen, la trasformazione di NDtam in endoxifen è l'unico passaggio in cui l'enzima CYP2D6 opera in maniera esclusiva (vedi Figura 3, sezione "Introduzione"). In tutti gli altri passaggi metabolici l'azione di CYP2D6 riveste un ruolo marginale, o comunque potenzialmente bilanciato dall'attività di altre isoforme enzimatiche.

Infine abbiamo valutato la associazione tra il rapporto metabolico e il genotipo di *CYP2D6*; la loro relazione è risultata significativa (ANOVA, $p<0.0001$) e i confronti a coppie dei singoli gruppi hanno evidenziato differenze significative dei MR tra le classi PM *vs* EM e PM *vs* IM ($p<0.001$), mentre nessuna differenza in EM *vs* IM. Questa osservazione da un lato conferma che entrambe le metodiche stimano la attività del citocromo indipendentemente dal metabolismo del tamoxifen e, dall'altro, evidenzia la non completa corrispondenza tra il dato farmacogenetico e la corrispettiva misura del fenotipo metabolico (non esiste infatti alcuna differenza del rapporto metabolico tra EM e PM). Solamente il completamento del follow-up delle pazienti e l'acquisizione della frequenza delle recidive consentirà di stabilire quale dei due metodi è più affidabile come marcatore prognostico della malattia.

L'analisi di **associazione tra le concentrazioni plasmatiche al primo e quarto mese** è stata eseguita per stabilire se i livelli di tamoxifen e dei metaboliti, in particolare endoxifen, misurati dopo un mese di terapia continuativa potessero essere già informativi dei livelli di stato stazionario, raggiunti in media al quarto mese di assunzione. In effetti allo stato stazionario i livelli di tam, NDtam ed endoxifen erano significativamente superiori rispetto a quelli del primo mese ($p<0.0001$), mentre i livelli di 4OHtam erano simili. Dall'analisi di regressione lineare sono emerse correlazioni positive significative tra concentrazioni al primo e quarto mese per tutti i metaboliti; in particolare, la migliore correlazione si è riscontrata per endoxifen, che presentava un $R^2=0.76$. Il dato risulta essere assolutamente originale.

L'analisi di **associazione tra classe genotipica e concentrazione** plasmatica di endoxifen ha dimostrato una elevata significatività: le classi PM e IM presentavano livelli di endoxifen corrispondenti in media al 35% e al 68% rispetto alle concentrazioni dei soggetti EM. I gruppi, confrontati a due a due, erano sempre significativamente diversi. Il dato conferma l'importanza dei polimorfismi del gene *CYP2D6* nella attivazione del tamoxifen e dimostra che la presenza anche di un solo allele con attività ridotta riduce sostanzialmente la produzione di endoxifen, rispetto alla condizione di wild-type; la presenza di entrambi gli alleli ad attività nulla non azzera la sintesi di endoxifen, per la cui produzione esistono

evidentemente vie alternative, ma determina comunque i livelli più bassi riscontrabili.

In conclusione, tutti e tre gli approcci per predire l'esposizione delle pazienti ad endoxifen hanno dimostrato di essere informativi, anche se parzialmente. Rimane il problema di affinare le indagini per arrivare ad una stima ancora più precisa dello status metabolico, relativo all'enzima CYP2D6, di ciascun individuo. Saper discriminare adeguatamente tra metabolizzatori lenti, intermedi e rapidi sembra essere molto importante, dato che pubblicazioni recenti (Madlensky et al., 2011) hanno riportato l'esistenza di un valore soglia, di 5.9ng/ml, come concentrazione di endoxifen al di sopra del quale si riscontra una significativa diminuzione del 26% della comparsa di recidiva. Da notare che il gruppo costituito dal 5° percentile del test di fenotipizzazione e il gruppo PM ottenuto dalla genotipizzazione del *CYP2D6* del nostro campione presentano concentrazioni al di sotto del valore soglia, suggerendone un possibile utilizzo clinico.
Sono stati riportati anche dati di associazione tra capacità di attivare il tamoxifen e la comparsa di effetti collaterali (Henry NL et al., 2009); tamoxifen, sebbene sia un farmaco ben tollerato, presenta un'ampia gamma di effetti collaterali. Il più comune è rappresentato dalle vampate di calore, dovute ad una instabilità vascolare da deprivazione estrogenica, mentre le reazioni avverse più gravi sono costituite dalla iperplasia/cancro dell'endometrio (Cohen I, 2004) e dalla tromboembolia venosa (Hernandez RK et al., 2009). Un recente lavoro di Lorizio e collaboratori (2012) ha riportato che in una coorte di pazienti in trattamento con tamoxifen le concentrazioni plasmatiche del metabolita attivo endoxifen erano significativamente associate alla comparsa e alla gravità di effetti collaterali (vampate di calore, secchezza vaginale e disturbi del sonno).
Nel nostro campione di studio, per una porzione di soggetti, è stato possibile raccogliere informazioni riguardo alla comparsa delle vampate di calore. Le valutazioni raccolte erano state fornite in corrispondenza del primo mese di terapia e dello stato stazionario. Della nostra analisi non è risultata nessuna correlazione significativa tra i livelli di endoxifen e la gravità della sintomatologia riferita dalle pazienti. Abbiamo riscontrato però che la sintomatologia più severa (definita come comparsa frequente delle vampate) ha riguardato principalmente le pazienti più giovani. Molto probabilmente le informazioni a cui abbiamo avuto

accesso riguardano una coorte troppo limitata ed eterogenea di pazienti, dal momento che nello studio di Lorizio il gruppo indagato era di 241 soggetti con un'età media di 50 anni (nel nostro caso il campione di 84-87 soggetti, con età media di 60 anni). Inoltre è possibile che l'inclinazione a riferire tale sintomatologia dipenda anche da motivazioni psicologiche e sociologiche correlate all'età. E' plausibile ipotizzare poi che, anche a causa della più frequente presenza di co-morbidità nelle pazienti più anziane la percezione della sintomatologia correlata alle vampate di calore possa essere occultata da altri disturbi.

In ultimo nel nostro studio abbiamo considerato il possibile ruolo nella risposta terapeutica del target molecolare di tamoxifen e metaboliti attivi, il recettore per gli estrogeni alpha (Erα).

Nel 2011 Wu e collaboratori hanno dimostrato *in vitro* che nell'azione anti-estrogenica esercitata da endoxifen il recettore beta degli estrogeni (Erβ) riveste un ruolo importante, suggerendo che esso sia in grado di sensibilizzare le cellule al trattamento col metabolita attivo.

Tale studio ci ha suggerito che anche altre isoforme, originate dallo splicing alternativo delle due forme proteiche complete (Erα ed Erβ) e dimostrate essere espresse nel tessuto tumorale e sano mammario, potessero influenzare l'attività trascrizionale di Erα, determinando un effetto nella risposta al trattamento farmacologico in vivo.

E' stata perciò valutata l'espressione genica di *ADORA1* e *IL20* in un modello cellulare di carcinoma mammario nel quale poteva essere controllata l'espressione dell'isoforma 2 del recettore estrogenico beta, inducendone la copresenza con la forma completa di Erα (vedi sezione "Materiali e Metodi", paragrafo 3.5.1).

L'analisi dell'espressione genica mediante PCR quantitativa (qPCR) ha evidenziato che in presenza di concentrazioni di endoxifen di 40nM per intervalli di tempo prolungati (24h), l'isoforma Erβ2 co-espressa con Erα riduce l'azione inibitoria di endoxifen rispetto alla presenza di solo Erα.

Questa osservazione potrebbe apparentemente risultare discordante coi dati riportati da Zhao e colleghi nel 2007, secondo cui l'isoforma Erβ2 (βcx) sarebbe in grado di regolare negativamente e in maniera significativa la capacità transattivante di Erα, attraverso la formazione di eterodimeri, in presenza di una stimolazione prolungata con l'agonista di Erα, PPT [(4,4',4"-(4-Propyl-[1H]-

pyrazole-1,3,5-triyl)trisphenol]. Tuttavia la situazione in cui si ha esclusivamente uno stimolo positivo, proveniente dall'estrogeno, non può essere assimilata a quella in cui si ha la copresenza con un antagonista (endoxifen), come nel nostro caso. A sostegno di ciò, nello studio di Wu et al., (2011) si dimostra, mediante saggi di immunoprecipitazione in vitro che il metabolita endoxifen, induce la formazione di eterodimeri Erα/β, determinando poi una stabilizzazione e un accumulo della proteina Erα, in maniera dose dipendente. E' possibile che che lo stesso fenomeno sia estendibile all'isoforma Erβ2 (βcx), suggerendo che la porzione recettoriale di Erα libera possa differire in maniera significativa rispetto alla situazione in cui è presente come unica variante, e che possa quindi risultare ancora capace di modulare la trascrizione genica.

In precedenza, lo stesso gruppo di Wu (2009), aveva dimostrato che in una linea cellulare di carcinoma mammario, con esclusiva presenza di Erα, il metabolita endoxifen esercitava differentemente la sua potente azione anti-estrogenica mediando in parte la degradazione proteica del recettore, via proteasoma.

In conclusione, i nostri risultati relativi alla parte clinica dello studio dimostrano la elevata variabilità nella capacità di attivare il tamoxifen nelle pazienti in trattamento precauzionale anti-estrogenico per tumore mammario in stadio iniziale; la variabilità dei livelli di endoxifen e la loro associazione con i risultati del test di fenotipizzazione con detrometorfano e della genotipizzazione del *CYP2D6* confermano il ruolo fondamentale di questo enzima nel metabolismo del farmaco. La possibilità di impiegare il test di fenotipizzazione, la genotipizzazione e la determinazione dei livelli di endoxifen al primo mese di assunzione, da soli o in combinazione, per predire l'efficacia del trattamento con tamoxifen sarà valutata quando i dati di sopravvivenza saranno disponibili. Anche il ruolo dei livelli plasmatici di endoxifen allo stato stazionario dovrà essere confermato, dimostrando la sua azione diretta sull'outcome terapeutico (sopravvivenza globale e incidenza di recidive).

Le osservazioni emerse dallo studio in vitro avvalorano l'ipotesi secondo cui le differenti isoforme recettoriali potrebbero influenzare la risposta al trattamento anti-estrogenico. Ulteriori studi in tale direzione si rendono necessari al fine di valutare anche differenze in termini di proliferazione cellulare derivante da una minore azione inibitoria di endoxifen in presenza di questa e altre isoforme.

Sulla base di questi dati si potrà poi valutare l'espressione di tali isoforme nei tessuti tumorali delle pazienti.

6. BIBLIOGRAFIA

- Airtum, Associazione Italiana Registro Tumori. I tumori in Italia – Rapporto 2011: la sopravvivenza dei pazienti oncologici in Italia. *Epidemiol Prev.* 2011; 35(5-6).
- Anderson WF, Chatterjee N, Ershler WB, Brawley OW. Estrogen receptor breast cancer phenotypes in the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Breast Cancer Res Treat.* 2001; 76(1):27-36.
- Antunes MV, Linden R, Santos TV, Wallemacq P, Haufroid V, Classen JF, Andreolla H, Costa N, Fontanive TO, Rosa DD. Endoxifen levels and its association with *CYP2D6* genotype and phenotype: evaluation of a southern Brazilian population under tamoxifen pharmacotherapy. *The Drug Monit.* 2012; 34(4):422-431.
- Assikis VJ and Jordan VC. Gynecologic effects of tamoxifen and the association with endometrial carcinoma. *Int J Gynaecol Obstet.* 1995; 49(3):241-57.
- Bai Z and Gust R. Breast Cancer, Estrogen Receptor and Ligands. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 2009; 342, 133-149.
- Barone I, Brusco L and Fuqua SAW. Estrogen receptor mutations in downstream gene expression and signalling. *Clin Cancer Res*. 2010; 16(10):2702-708.
- Beatson GT. On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment, with illustrative cases. *The Lancet.* 1896; 148(3803):162-165.
- Beverage JN, Sissung TM, Sion AM, Danesi R, Figg WD. *CYP2D6* polymorphisms and the impact on tamoxifen therapy. *J Pharm Sci*. 2007; 96(9):2224-31.
- Brauch H, Mürdter TE, Eichelbaum M, Schwab M. Pharmacogenomics of tamoxifen therapy. *Clinical Chemistry*. 2009; 55(10):1770-82.
- Brauch H, Schroth W, Goetz MP, Mürdter TE, Winter S, Ingle JN, Schwab M, Eichelbaum M. Tamoxifen use in postmenopausal breast cancer: *CYP2D6* matters. *J Clin Oncol.* 2013; 31(2):176-180.

- Cho SH, Jeon J, Kim SI. Personalized medicine in breast cancer: a systematic review. *J Breast Cancer*. 2012; 15(3):265-272.
- Cohen I. Endometrial pathologies associated with postmenopausal tamoxifen treatment. *Gynecol Oncol.* 2004; 94(2):256-66.
- de Graan AJ, Teunissen SF, de Vos FY, Loos WJ, van Schaik RH, de Jongh FE, de Vos AI, van Alphen RJ, van der Holt B, Verweij J, Seynaeve C, Beijnen JH, Mathijssen RH. Dextrometorphan as a phenotyping test to predict endoxifen exposure in patients on tamoxifen treatment. *J Clin Onc*. 2011; 29(24):3240-6.
- Desta Z, Ward BA, Soukhova NV, Flockart DA. Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: prominent roles for CYP3A and *CYP2D6*. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004; 310(3):1062-75.
- Dezentjé VO, Guchelaar HJ, Nortier JWR, van de Velde CJH, Gelderblom H. Clinical implications of *CYP2D6* genotyping in tamoxifen treatment for breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2009; 15(1):15-21.
- Dotzlaw H, Leygue E, Watson PH, Murphy LC. Expression of estrogen receptor-beta in human breast tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82(7):2371-1.
- Early Breast Cancer Trialist' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrance and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *The Lancet.* 2005; 365(9472):1687-1717.
- Early Breast Cancer Trialists' collaborative Group (EBCTCG). Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10801 women in 17 randomized trials. *The Lancet* 2011; 378(9804):1707-16.
- Fisher B, Costantino JP, Redmund CK, Fisher ER, Wickerham DL, Cronin WM. Endometrial cancer in tamoxifen-treated breast cancer patients: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14. *J Natl Cancer Inst*. 1994; 86(7):527-37.

- Gaedik A, Simon SD, Bradford LD, Kennedy MJ, Leeder JS. The *CYP2D6* acitvity score: translating genotype information into a qualitative measure of phenotype. *Clin Pharmacol Ther*. 2008; 83(2):234-242.
- Hall JM and McDonnell DP. The estrogen receptor β-isoform (Erβ) of the human estrogen receptor modulates Erα transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology*. 1999; 140(12):5566-78.
- Henry NL, Rae JM, Li L, Azzouz F, Skaar TC, Desta Z, Sikara MJ, Philips S, Nguyen A, Storniolo AM, Hayes DF, Flockhart DA, Stearns V. Consortium on Breast Cancer Pharmacogenomics Investigators. Association between *CYP2D6* genotype and tamoxifen-induced hot flashes in a prospective cohort. *Breast Cancer Res Treat.* 2009; 117(3):571-5.
- Hernandez RK, Sørensen HAT, Pedersen L, Jacobsen J, Lash TL. Tamoxifen treatment and risk of deep venous thrombosis and pulmonary embolism: a Danish population-based cohort study. *Cancer*. 2009; 115(19):4442-9.
- Herynk MH and Fuqua SAW. Estrogen receptor mutations in human disease. *Endocrine Reviews*. 2004; 25(6):869-98.
- Hillen W, Unger B and Klock G. Analysis of tetoperator-TET repressor complexes by thermal denaturationstudies. *Nucleic Acids Res.* 1982; 10: 6085-6097.
- Hopp TA and Fuqua SAW. Estrogen receptor variants. *J Mamm Gland Biol Neoplasia.* 1998; 3(1):73-83.
- Jemal A, Center MM, De Santis C, Ward EM. Global Patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010; 19(8):1893-907.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. *Global Cancer Statistics.* Cancer J Clin. 2011; 61(2):69-90.
- Johnson MD, Zuo H, Lee KH, Trebley JP, Rae JM, Weatherman RV, Desta Z, Flockhart DA, Skaar TC. Pharmacological characterization of 4-hydroxy-N-desmethyl tamoxifen, a novel active metabolite of tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat*. 2004; 85(2):151-9.

- Jordan VC. Tamoxifen: catalyst for the change to targeted therapy. *Eur J cancer*. 2008; 44(1): 30-38.
- Kiyotani K, Mushiroda T, Nakamura Y, Zembutsu H. Pharmacogenomics of tamoxifen: roles of drug metabolising enzymes and transporters. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2012; 27(1):122-131.
- Koch WH. Technology platforms for pharmacogenomic diagnostic assays. Nature Reviews. Drug Discovery. 2004; 3(9): 749-761.
- Kos M, Denger S, Reid G, Gannon F. Upstream open reading frames regulate the translation of the multiple mRNA variants of the estrogen receptor alpha. *J Biol Chem.* 2002, 277(40):37131-8.
- Krawetz S, Misener S. *Humana Press*, *Totowa*, *NJ*, 365-386.
- Kurose K, Sugiyama E and Saito Y. Population differences in major functional polymorphisms of pharmacokinetics/pharmacodynamics-related genes in eastern Asians and Europeans: implications in the clinical trial for novel drug development. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2012, 27(1):9-54.
- Lazarus P, Blevins-Primeau AS, Zheng Y, Sun D. Potential role of UGT pharmacogenetics in cancer treatment and prevention : focus on tamoxifen. *Ann N Y Acad Sci*. 2009; 1155:99-111.
- Lee KH, Ward BA, Desta Z, Flockhart DA, Jones DR. Quantification of tamoxifen and three metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: application to a clinical trial. *J Chromatogr B Analyt Technical Biomed Life Sci.* 2003; 791:245-53.
- Leygue E, Huang A, Murphy LC, Watson PH. Prevalence of estrogen receptor variant messanger RNAs in human breast cancer. *Cancer Res.* 1996, 56(19):4324-7.
- Lim HS, Ju Lee H, Seok Lee K, Sook Lee E, Jang IJ, Ro J. Clinical implications of *CYP2D6* genotypes predictive of tamoxifen pharmacokinetics in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007; 25(25):3837-45.
- Lorizio W, Wu AHB, Beattle MS, Rugo H, Tchu S, Kerlikowske K, Ziv E. Clinical and biomarker predictors of side effects from tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat.* 2012; 132:1107-1118.

- Madlensky L, Natarajan L, Tchu S, Pu M, Mortimer J, Flatt SW, Nikoloff DM, Hillman G, Fontecha MR, Lawrence HJ, Parker BA, Wu AHB, Pierce JP. Tamoxifen metabolite concentrations, *CYP2D6* genotype, and breast cancer outcomes. *Clinical Pharmacology and Ther.* 2011; 89(5):718-725.
- Malhotra GK, Zhao X, Band H and Band V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biology & Therapy.* 2010; 10:10, 955-960.
- Osborne CK, Zhao H, Fuqua SA. Selective estrogen receptor modulators: structure, function, and clinical use. *J Clin Onc*. 2000; 18(17):3172-86.
- Riggs BL and Hartmann LC. Selective estrogen-receptor modulators – mechanism of action and application to clinical practice. *N Engl J Med.* 2003; 348(7):618-29.
- Roman-Blas JA, Castañeda S, Largo R, Herrero-Beaumont G. Osteoarthritis associated with estrogen deficency. *Arthritis Res Ther*. 2009; 11(5):241.
- Sachse C, Brockmöller J, Bauer S, Roots I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet.* 1997;60(2):284-95.
- Shao W and Brown M. Advances in estrogen receptor biology: prospects for improvements in targeted breast cancer therapy. *Breast Cancer Res.* 2004; 6:39-52.
- Sistonen J, Fuselli S, Levo A, Sajantila A. CYP2D6 genotyping by a multiplex primer extension reaction. *Clinical Chem.* 2005; 51(7):1291-1295.
- Spear BB, Chiozzi MH and Huff J. Clinical application of pharmacogenetics. *Trends Mol Med.* 2001; 7(5):201-4.
- Stearns V, Johnson MD, Rae JM, Morocho A, Novielli A, Bhargave P, Hayes DF, Desta Z, Flockhart DA. Active tamoxifen metabolite plasma concentrations after coadministration of tamoxifen and the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine. *J Natl Cancer Inst.* 2003; 95(23):1758-64.

- Tan SH, Lee SC, Goh BC, Wong J. Pharmacogenetics in breast cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2008, 14(24):8027-8041.
- Taylor SE, Martin-Hirsch PL, Martin FL. Oestrogen receptor splice variants in the pathogenesis of disease. *Cancer Letters*. 288:133-148, 2010.
- The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee: The Human cytochrome P450 (CYP) allele nomenclature database. http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp2d6.htm
- Thomas C and Gustafsson JA. The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. *Nature reviews.* 2011; 11:597-608.
- Triezenberg SJ, Kingsbury RC and McKnight SL. Functional dissection of VP16, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression. *Genes Dev.* 1988, 2:718-729.
- Triezenberg SJ, LaMarco KL and McKnight SL. Evidence of DNA: protein interactions that mediate HSV-1 immediate early gene activation by VP16. *Genes Dev*.1988, 2:730-742.
- Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, Greco M, Saccozzi R, Luini A, Aguilar M, Marubini E. Twenty-year follow-up of a randomised study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *The New England Journal of Medicine.* 2002; 347(16):1227-32.
- Veronesi U, Viale G, Paganelli G, Zurrida S, Luini A, Galimberti V, Veronesi P, Intra M, Maisonneuve PE, Zucca F, Giatti G, Mazzarol G, De Cicco C, Vezzosi D. Sentinel lymph node biopsy in breast cancer: ten-year results of a randomised controlled study. *Annals of surgery. 2010;* 251(4):595-600.
- Wolmark N and Dunn BK. The role of tamoxifen in breast cancer prevention: issues sparked by the NSABP Breast Cancer Prevention Trial (P-1). *Ann N Y Acad Sci*. 2001; 949:99-108.
- Wu X, Hawse JR, Subramaniam M, Goetz MP, Ingle JN, Spelsberg TC. The tamoxifen metabolite, endoxifen, is a potent antiestrogen that targets estrogen receptor α for degradation in breast cancer cells. *Cancer Res.* 2009, 69(5):1722-27.

- Wu X, Subramaniam M, Grygo SB, Sun Z, Negron V, Lingle WL, Goetz MP, Ingle JN, Spelsberg TC, Hawse JR. Estrogen receptor-beta sensitizes breast cancer cells to the anti-estrogenic actions of endoxifen. *Breast Cancer Research*. 2011; 13(2):R27.
- Zanger UM, Raimundo S and Eichelbaum M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacolgoy, genetics, biochemistry. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2004; 369 (1):23-37.
- Zhao C, Matthews J, Tujague M, Wan J, Ström A, Toresson G, Lam EWF, Cheng G, Gustafsson JA, Dahlman-Wright K. Estrogen receptor β2 negatively regulates the transactivation of estrogen receptor α in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 2007, 67(8):3955-3962.
- Zhao C, Dahlman-Wright, JA Gustafsson. Estrogen Signaling via Estrogen Receptor β. *Journ Biol Chem*. 2010; 285(51):39575-579.
- Zwart W, Theodorou V and Carroll JS. Estrogen receptor-positive breast cancer: a multidisciplinary challenge. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2011; 3(2):216-30.