

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA



SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE

CORSO DI LAUREA IN MEDICINA E CHIRURGIA

TESI DI LAUREA

**APPLICAZIONE DELLE RACCOMANDAZIONI AIOM-SIF PER
L'ANALISI FARMACOGENETICA DEL GENE DPYD**

Relatore

Chiar.ma Prof.ssa Francesca Mattioli

Correlatori

Chiar.ma Dott.ssa Stefania Casazza

Chir.mo Dott. Giammarco Baiardi

Candidato

Manuele Rossi

Anno Accademico 2020/2021

SOMMARIO

INTRODUZIONE	2
FLUOROPIRIMIDINE	4
STORIA E STRUTTURA CHIMICA	4
FARMACOCINETICA E FARMACODINAMICA.....	6
USI CLINICI.....	8
REAZIONI AVVERSE.....	9
FARMACOGENETICA	13
GENE DPYD	15
RACCOMANDAZIONI AIOM-SIF.....	21
ANALISI DEL POLIMORFISMO DEL DPD IN PAZIENTI CANDIDATI A TERAPIA CON FLUOROPIRIMIDINE: LO STUDIO.....	25
ANALISI DEL POLIMORFISMO DEL DPD IN PAZIENTI CANDIDATI A TERAPIA CON FLUOROPIRIMIDINE: I PAZIENTI	29
CONCLUSIONI.....	36
BIBLIOGRAFIA	38

INTRODUZIONE

La chemioterapia in ambito oncologico deve da sempre far fronte a due sfide principali: la prima è la frequente recidiva di malattia, affrontata con lo sviluppo di nuove molecole e l'allestimento di piani terapeutici basati su terapie di associazione piuttosto che sull'utilizzo di farmaci singoli, la seconda è rappresentata dall'elevata frequenza di eventi avversi che vanno a compromettere l'aderenza terapeutica del paziente e a volte ne mettono in pericolo la vita stessa, oltre che condizionarne la qualità.

Per quanto riguarda la seconda problematica, lo sviluppo di eventi avversi e la loro aumentata gravità sempre più spesso vengono correlati alla presenza di mutazioni in specifici geni; questo ha portato negli ultimi anni alla proliferazione di studi di farmacogenetica allo scopo di adottare strategie terapeutiche volte a garantire un effetto mirato, efficace ma anche sicuro, di una determinata molecola farmacologica, prevenendone gli effetti nocivi.

Il 5-fluorouracile, un antimetabolita appartenente alla classe degli analoghi pirimidinici conosciuto dal 1957 e utilizzato in terapia di associazione soprattutto per i carcinomi del colon retto e della mammella, è al centro dei dibattiti scientifici di farmacogenetica a causa di un rinnovato interesse riguardante il gene codificante per l'enzima diidropirimidina deidrogenasi (DPYD) le cui mutazioni sono state correlate allo sviluppo e ad una maggiore gravità degli eventi avversi dovuti a questo farmaco.

In realtà il gene DPYD è conosciuto dagli anni '90, ma recentemente sono stati pubblicati molteplici articoli riguardanti la necessità di attuare metodiche di screening per rilevare varianti del gene, associate a scarsa o totale assenza di attività enzimatica, prima dell'inizio della terapia poiché è stato dimostrato che, modificando la dose in relazione allo stato del gene stesso, si possono prevenire gli eventi avversi e se ne migliora l'effetto terapeutico. La dimostrazione della costo-efficacia dello screening del gene DPYD, infine, ha portato alla definizione di linee guida apposite.

Questa tesi nasce proprio in seguito alla pubblicazione delle raccomandazioni, curate dal Gruppo di Lavoro AIOM-SIF, riguardanti l'analisi farmacogenetica del gene DPYD e ha lo scopo di valutare l'impatto dell'applicazione delle stesse nel processo decisionale per la

pianificazione terapeutica e sulla prognosi di pazienti affetti da carcinoma trattati con associazioni di farmaci comprendenti analoghi pirimidinici.

FLUOROPIRIMIDINE

Le fluoropirimidine appartengono alla classe degli antimetaboliti e sono analoghi delle pirimidine la cui funzione è quella di interferire con la sintesi e il funzionamento degli acidi nucleici, RNA e/o DNA a seconda della molecola¹. In Italia sono state approvate per uso clinico le molecole 5-fluorouracile (5-FU), capecitabina, tegafur e l'antimicotico flucitosina.

Questa tesi si concentrerà maggiormente sulle molecole fluorouracile e capecitabina, analizzate brevemente nei paragrafi successivi.

STORIA E STRUTTURA CHIMICA

La storia della chemioterapia, e quindi delle fluoropirimidine, inizia intorno ai primi anni del 1900, quando si iniziarono ad elaborare dei modelli per selezionare tra le molteplici molecole farmacologiche quelle più probabilmente dotate di efficacia nei confronti soprattutto di malattie infettive e oncologiche, arrivando dopo qualche anno alla dimostrazione dell'utilità del modello animale. Questo portò all'avvio della ricerca farmacologica in generale, ma soprattutto oncologica e infettivologica, i cui studi sulla scoperta dei derivati dell'arsenico e delle mostarde azotate, queste ultime derivate dal gas mustarda (sostanza utilizzata nella Prima Guerra Mondiale come arma chimica), riempirono le riviste scientifiche per tutta la prima metà del 1900².

Dopo la scoperta del DNA, avvenuta grazie a Watson e Crick nel 1953, i ricercatori iniziarono a concentrarsi sui meccanismi di replicazione del DNA nelle cellule tumorali, fino a scoprire nel 1954 che le cellule di carcinoma epatico tendevano ad accumulare uracile radioattivo al loro interno per poi utilizzarlo per la formazione di nuove molecole di DNA, evento ovviamente anomalo dato che questo tipo di materiale genetico non contiene uracile. Queste scoperte vennero quindi riprese da Charles Heidelberger, che in quel periodo stava studiando la capacità dell'acido fluoroacetico di inibire alcuni enzimi e che iniziò a chiedersi se l'inserimento di un atomo di fluoro in una base azotata potesse avere un effetto simile³. Heidelberger iniziò quindi a fare esperimenti con derivati delle pirimidine e, nel 1957, pubblicò un articolo sull'efficacia del 5-FU nel trattamento di tumori impiantati in ratto e topo⁴.

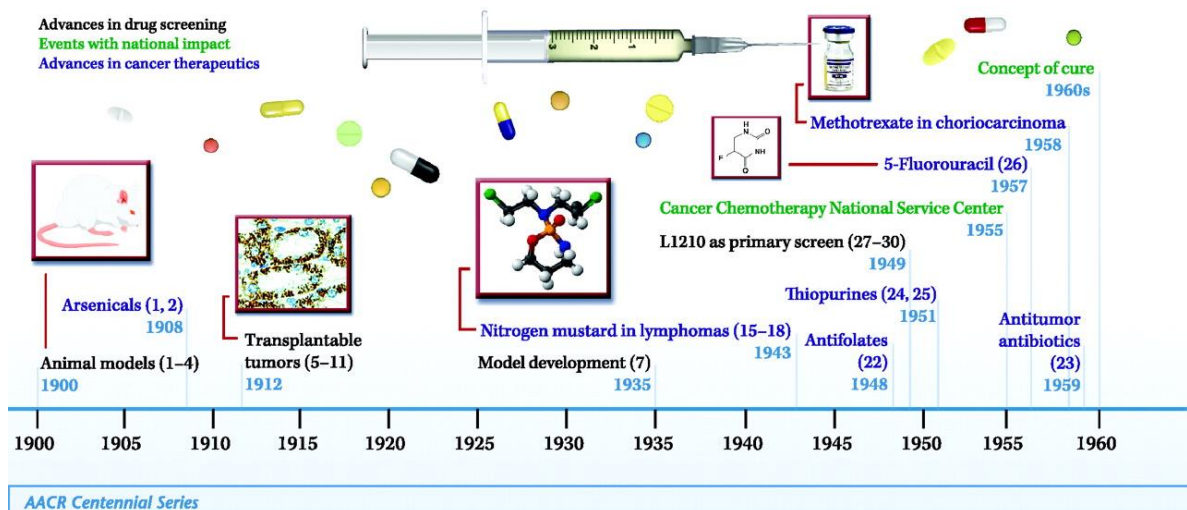


Figura 1 Avanzamenti chiave nella storia della chemioterapia per il cancro².

Dal momento che il 5-FU non è somministrabile per via orale, a causa di un assorbimento molto variabile, si è cercato fin da subito di creare nuove molecole adatte per questa via di somministrazione, arrivando a sviluppare i derivati tegafur e capecitabina.

Gli analoghi delle pirimidine posseggono una struttura chimica molto simile alle basi azotate classiche, ma se ne differenziano in molteplici modi, che variano dall'alterazione dell'anello pirimidinico, come nel caso del 5-FU, dove un atomo di fluoro sostituisce in posizione 5 il gruppo metilico della base timina, alla modifica della molecola di ribosio del nucleotide oppure una duplice modifica, come nella fludarabina fosfato¹.

I derivati del 5-FU sono profarmaci che possiedono una struttura più complessa, sviluppata allo scopo di renderli somministrabili per via orale. La capecitabina è un estere carbamato la cui struttura origina da quella della citidina⁵; il tegafur, invece, è un composto organoalogeno⁶.

Il motivo per cui queste molecole riescono ad alterare determinati sistemi enzimatici è proprio perché possiedono queste alterazioni nella loro struttura, come spiegato meglio nel prossimo paragrafo.

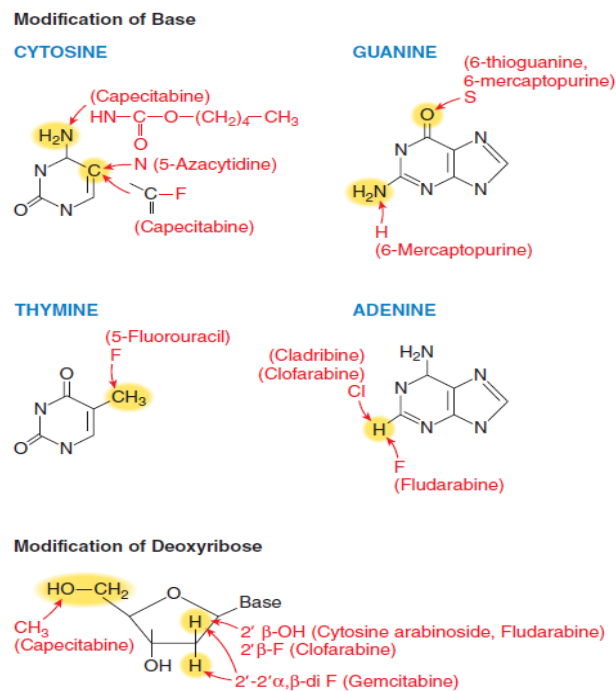


Figura 2 L'immagine mostra la struttura chimica delle basi azotate e del ribosio con in giallo i principali siti modificati nelle varie molecole¹.

FARMACOCINETICA E FARMACODINAMICA

Il 5-fluorouracile (5-FU) viene somministrato per via parenterale, poiché l'assorbimento per via orale risulta incompleto e imprevedibile, essendo influenzato da molteplici fattori. Ha un elevato volume di distribuzione e, nonostante sia scarsamente liposolubile, tende a superare la barriera ematoencefalica e a distribuirsi anche a livello del SNC. Inoltre, alcuni studi svolti su cavie hanno dimostrato una maggior concentrazione e una più lunga emivita tissutale del farmaco e dei suoi metaboliti nei tessuti tumorali, rispetto a quelli non tumorali. Può passare la barriera ematoplacentare, come dimostrato su studi svolti sui ratti, ma non viene escreto nel latte materno⁷.

La metabolizzazione del farmaco avviene tramite la sua riduzione a diidrofluorouracile (DHFU) in una reazione catalizzata dall'enzima diidropirimidina deidrogenasi (DPD), che si verifica soprattutto a livello epatico sebbene l'enzima sia presente anche in molti altri tessuti, ad esempio a livello intestinale e nelle cellule tumorali, cosa che permette il metabolismo del farmaco anche in condizione di insufficienza epatica. Il DHFU è un composto instabile che viene rapidamente trasformato in acido fluoro-ureidopropionico dall'enzima diidropirimidinasi, che a sua volta diventa 5-alfa-fluoro-beta-alanina tramite l'enzima beta-alanina-sintasi, principale metabolita presente nelle urine. L'escrezione dei

metaboliti e del farmaco immodificato (5-10%) è principalmente urinaria. L'emivita plasmatica è molto breve, circa 10-20 minuti¹.

Gli altri farmaci, tra cui capecitabina, tegafur e floxuridina, sono profarmaci, cioè dopo l'introduzione nell'organismo vengono convertiti nella molecola attiva, che, in questo caso, è 5-FU o un suo metabolita.

Floxuridina viene convertita direttamente in fluoro-deossi-UMP tramite l'enzima timidina-chinasi. Questo farmaco viene di solito somministrato tramite infusione continua nell'arteria epatica¹.

La capecitabina viene utilizzata per via orale, via attraverso la quale ha una buona biodisponibilità. Viene poi deesterificata e deaminata a formare un metabolita inattivo chiamato 5-deossi-fluoro-deossi-uracile, che ha un'emivita di circa un'ora e che viene poi trasformato in fluorouracile tramite l'enzima timidina fosforilasi a livello di fegato, tessuto tumorale e altri. L'ultima reazione viene ritardata in caso di insufficienza epatica, ma ciò non ha effetti rilevanti su tossicità ed efficacia del farmaco¹.

Il tegafur è un altro profarmaco utilizzato per via orale che viene convertito in 5-FU a livello epatico dal citocromo 2A6. Questo farmaco viene usato in combinazione con uracile oppure con gimeracil e oteracil. Uracile e gimeracil agiscono come inibitori dell'enzima DPD, rallentando la metabolizzazione della forma attiva del farmaco e garantendo, quindi, concentrazioni plasmatiche più elevate; oteracil, invece, inibisce un altro enzima, la orotato-fosforibosil-transferasi (OPRT), diminuendo l'attività di 5-FU a livello della mucosa intestinale sana, al fine di inibire gli effetti avversi a questo livello⁸.

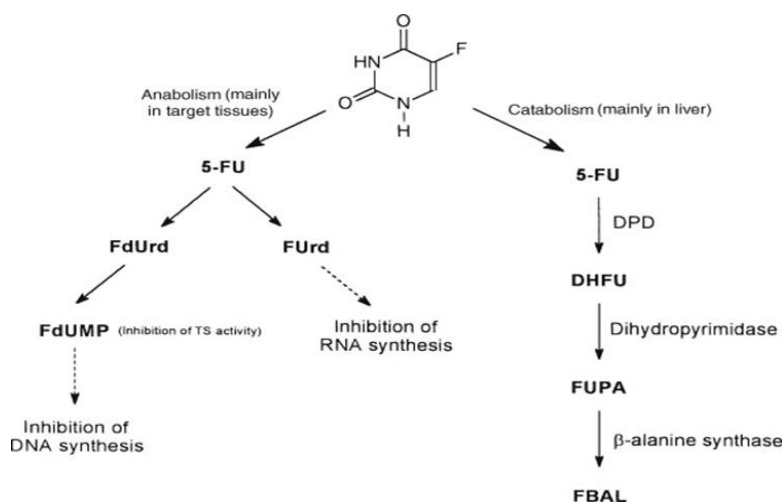


Figura 3 Cinetica del farmaco⁹.

I principali bersagli di questi farmaci sono l'enzima timidilato sintasi, DNA e RNA. Il 5-FU può esercitare la sua azione farmacologica solo dopo essere stato convertito nella sua forma nucleotidica tramite ribosilazione e fosforilazione. Nella sua forma trifosfata, fluoro-uracile trifosfato (FUTP), viene incorporato nella molecola di RNA, determinandone instabilità, facilità di degradazione e alterazione dei meccanismi di traduzione del mRNA in proteina, bloccando quindi la sintesi proteica. Nella sua forma monofosfata, fluoro-deossi-uracile monofosfato (FdUMP), invece, insieme con il cofattore metilene-tetraidrofolato lega covalentemente l'enzima timidilato sintasi (TS), formando un complesso TS-folato-FdUMP che inibisce l'enzima; questo avviene a causa dell'atomo di fluoro e della stabilità del legame tra fluoro e carbonio che impedisce all'enzima di svolgere la sua funzione, cioè spostare un gruppo metile e due atomi di idrogeno dal folato al deossi-UMP formando deossi-timina monofosfato (dTMP), determinando la stabilità del complesso e quindi il sequestro dell'enzima. Infine, FdUTP, insieme al dUTP che si accumula a causa del blocco della timidilato sintasi e quindi dell'impossibilità ad essere convertito in TMP, si integrano all'interno della molecola di DNA durante i normali meccanismi di replicazione a causa della carenza di TTP (timina trifosfato); questo determina ovviamente l'attivazione dei meccanismi di riparazione del DNA, che però non possono funzionare a causa della carenza di TTP. Tutto ciò porta infine alla rottura della molecola di DNA, all'arresto dei meccanismi di sintesi proteica e quindi alla morte cellulare¹.

USI CLINICI

5-FU è comunemente usato in regimi chemioterapici in combinazione nel trattamento del carcinoma avanzato o metastatico della mammella, del colon-retto, del tratto gastroenterico alto e del carcinoma pancreatico avanzato, mentre è usato come terapia adiuvante in pazienti con carcinoma mammario invasivo primario operabile e nel carcinoma del colon-retto. Il 5-FU viene usato nella maggior parte dei casi insieme ad acido folinico (leucovorin) perché da un lato aumenta la capacità del 5-FU di agire legandosi alla timidilato sintasi nelle cellule neoplastiche caratterizzate spesso dalla carenza di folati, dall'altro consente di neutralizzare gli effetti tossici esercitati dal farmaco su cellule a rapida crescita quali quelle del sistema ematopoietico e della mucosa gastroenterica. Questo farmaco viene somministrato sempre più spesso per via endovenosa bisettimanalmente, soprattutto per quanto riguarda il carcinoma del colon-retto, poiché si è

dimostrato che questo schema terapeutico presenta una minor incidenza di effetti collaterali e una maggior sopravvivenza in assenza di progressione di malattia. 5-FU inoltre viene usato in pazienti con carcinoma localmente avanzato di esofago, stomaco, pancreas, cervice uterina, ano e della testa e del collo in associazione alla radioterapia, poiché si è dimostrato un effetto sinergico con quest'ultima. Viene usato, infine, per il trattamento topico di cheratosi pre-maligne e per carcinoma basaloide multiplo¹.

La capecitabina viene usata per via orale per il trattamento di carcinoma metastatico della mammella dopo il fallimento di una precedente terapia, anche in associazione con docetaxel, per il trattamento di prima linea del carcinoma gastrico avanzato in associazione con un regime a base di platino, per la terapia adiuvante in pazienti sottoposti a chirurgia per carcinoma del colon e in pazienti con carcinoma metastatico del colon-retto¹.

Il tegafur, disponibile in Italia in associazione fissa con gimeracil e oteracil, può essere usato per il trattamento del carcinoma gastrico avanzato in associazione con cisplatino¹⁰.

La floxuridina (non disponibile in Italia) viene usata tramite infusione continua nella arteria epatica per il trattamento di pazienti con metastasi epatica da carcinoma del colon-retto e dopo resezione di metastasi epatiche¹.

REAZIONI AVVERSE

La frequenza degli eventi avversi correlati all'assunzione di fluoropirimidine (ADRs), segnalati nella popolazione dei pazienti trattati, è classificata e definita, in base alla convenzione seguente (CIOMS), come: molto comune ($\geq 1/10$), comune ($\geq 1/100$, $< 1/10$), non comune ($\geq 1/1000$; $< 1/100$), raro ($\geq 1/10.000$, $< 1/1.000$), molto raro ($< 1/10.000$), non nota (la frequenza non può essere stimata sulla base dei dati disponibili)¹¹. I pazienti anziani (≥ 65 anni) possono manifestare reazioni avverse con maggior frequenza rispetto a soggetti giovani, anche di grado elevato e tali da portare ad interruzione del trattamento.

Gli effetti indesiderati, descritti con frequenza uguale o inferiore al 30% dei pazienti trattati¹², sono:

- sintomi gastroenterici: mucosite, dolore a livello orale e sensazione di gusto metallico, diarrea, nausea e/o vomito. La tossicità è da ricondursi ad eccessiva attività apoptotica nella mucosa intestinale, perdita di *tight junctions* e quindi della funzione di barriera dell'epitelio e alterazione della flora batterica intestinale.

La mucosite può portare allo sviluppo di malnutrizione, di sepsi e può ritardare ulteriori trattamenti chemioterapici e radioterapici¹³;

- astenia;
- tossicità midollare, con anemia, trombocitopenia, leucopenia, fino alla pancitopenia. La tossicità midollare, in particolare la leucopenia, si sviluppa soprattutto dopo iniezione in bolo, di solito dopo 9-14 giorni. La patogenesi sembra essere correlata allo stress ossidativo, combinato ad altri meccanismi come inibizione della crescita ed effetto citotossico sui progenitori midollari¹⁴;
- tossicità cutanea, con dermatite, iperpigmentazione e atrofia cutanea, alopecia e cambiamenti delle unghie fino alla loro perdita. Particolare è la sindrome mano-piede, conosciuta anche come eritema acrale o sindrome da eritrodisestesia palmo-plantare, dovuta soprattutto a capecitabina, che determina dolore urente, eritema, desquamazione e alterazione della sensibilità con iperalgesia e parestesie localizzate a livello delle estremità, soprattutto palmi delle mani e piante dei piedi, di solito reversibile con la sospensione del farmaco o con la riduzione della dose.

Si pensa che la patogenesi differisca in base al farmaco coinvolto, dal momento che 5-FU e derivati non sono gli unici farmaci a determinarla: nel caso delle fluoropirimidine si crede sia dovuto a un accumulo del farmaco a livello della cute, cosa che si verifica soprattutto con la capecitabina a causa di una elevata concentrazione, principalmente a livello palmare e plantare, di timidina fosforilasi, l'enzima che converte il profarmaco nella sua forma attiva, cioè il 5-FU¹⁵.

Meno comuni e rilevati nell'1% circa dei pazienti¹², sono:

- cardiotossicità, con sviluppo di aritmie maligne, quali tachicardia ventricolare e possibile conseguente morte cardiaca improvvisa, prolungamento del tratto QT, cardiomiopatia, angina vasospastica e sindrome coronarica acuta da vasospasmo, trombosi e dissezione coronarica, miopericardite e, infine, shock cardiogeno. In caso di pazienti con anamnesi di cardiopatia, aritmia e angina pectoris occorre prestare particolare cautela nel somministrare il farmaco.

Sono stati proposti numerosi meccanismi patogenetici, tra cui vasocostrizione di una arteria coronarica, danno autoimmune miocardico, danno endoteliale con possibile formazione di trombi, danno miocardico diretto con sviluppo di necrosi e molti altri, ma il vasospasmo coronarico è il più probabile perché dimostrato nell'animale e in almeno il 10% dei pazienti con tossicità cardiaca¹⁶;

- iperammoniemia, con possibile encefalopatia iperammoniemica, condizione probabilmente dovuta all'accumulo di un metabolita, il fluorocitrato, che determina inibizione del ciclo di Krebs, a cui consegue anche l'inibizione del ciclo dell'urea e quindi l'accumulo di ammoniaca. L'ammoniaca accumulata nell'encefalo viene metabolizzata in glutammina, la quale causa edema cerebrale e ipertensione endocranica¹⁷;
- encefalopatia e altri disturbi neurologici, anche a lungo termine, condizione definita come “*chemo brain*”, che determina *cognitive impairment*, con, soprattutto, alterazioni della memoria.

Si pensa che questa sindrome sia dovuta a un danno prevalentemente a livello degli oligodendrociti, con, quindi, una demielinizzazione¹⁸.

Gli effetti indesiderati sono stadiati in termini di gravità secondo la CTCAE (Common Terminology Criteria for Adverse Events), come illustrato in figura 4.

Grade	Definition
Grade 1	Mild; asymptomatic or mild symptoms; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated.
Grade 2	Moderate; minimal, local or noninvasive intervention indicated; limiting age-appropriate instrumental ADL*.
Grade 3	Severe or medically significant but not immediately life-threatening; hospitalization or prolongation of hospitalization indicated; disabling; limiting self care ADL**.
Grade 4	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated.
Grade 5	Death related to AE.

Note: Activities of Daily Living (ADL); *Instrumental ADL refer to preparing meals, shopping for groceries or clothes, using the telephone, managing money, etc.; **Self care ADL refer to bathing, dressing and undressing, feeding self, using the toilet, taking medications, and not bedridden.

Figura 4 Classificazione CTCAE¹⁹.

Le gravi tossicità gastrointestinali ed ematologiche, indotte da fluoropirimidine, sono generalmente dose-correlate, o meglio sono riconducibili principalmente ad alterato metabolismo e conseguente accumulo del farmaco. L'enzima principale del loro catabolismo, come precedentemente riportato, è la diidropirimidina deidrogenasi (DPD), il cui gene codificante, DPYD, presenta varianti alleliche associate a ridotta attività enzimatica; pertanto, al fine di prevenire reazioni avverse potenzialmente molto gravi, le

linee guida raccomandano l'analisi farmacogenetica dei polimorfismi del DPYD in alcune situazioni, trattate nel paragrafo apposito (si veda "linee guida").

Gli effetti collaterali gravi e potenzialmente fatali associati ad assenza completa di attività della DPD sono, soprattutto, neutropenia, neurotossicità, diarrea grave e stomatite. La variante c.2194G>A è la più frequente ed è associata a tossicità da fluoropirimidine prevalentemente ematologica con neutropenia²⁰.

Alla luce di questi dati, ci sembra opportuno approfondire le basi della farmacogenetica e delle singole mutazioni e i loro effetti.

FARMACOGENETICA

Bisogna innanzitutto riassumere brevemente la differenza tra farmacogenetica e farmacogenomica. La farmacogenetica studia le varianti genetiche e come queste determinano variazioni della risposta farmacologica, mentre la farmacogenomica, invece, tramite lo studio del genoma o dei suoi prodotti (soprattutto RNA e proteine) correla le informazioni così ottenute a variazioni della risposta farmacologica¹.

La risposta individuale ai farmaci non dipende soltanto da fattori genetici, ma è il risultato di una complessa interazione tra questi e i fattori ambientali, tra cui dieta, età, esercizio fisico, esposizione a sostanze farmacologiche e non farmacologiche, quali alcool e tabacco. Tutti questi fattori determinano una risposta farmacologica che varia dall'effetto benefico sulla patologia trattata, all'assenza di beneficio, allo sviluppo di effetti avversi.

Per quanto riguarda i fattori genetici, possono essere coinvolti geni codificanti enzimi chiave per il metabolismo del farmaco, soprattutto i citocromi, le molecole di trasporto, i recettori o altre strutture target del farmaco stesso ed infine, geni che modulano il contesto nel quale avviene l'interazione farmaco-target molecolare. Questi geni possono essere ereditati; infatti, si è stimato, tramite studi su gemelli omozigoti, che il metabolismo dei farmaci sia ereditabile in una elevata percentuale. L'ereditarietà di questa tipologia di geni può essere di tipo mendeliano, quindi monogenica, recessiva, dominante o codominante, o multigenica, più frequente e più complessa da analizzare.

Esistono diversi tipi di varianti geniche; le più frequenti sono i polimorfismi a singolo nucleotide (SNP), anche chiamati varianti a singolo nucleotide (SNV), e le inserzioni e le delezioni, chiamate *indels*, le più piccole, e *copy number variations* (CNV), le più grandi.

Le SNPs possono avvenire in regioni codificanti (cSNPs) e non codificanti (ncSNPs); tra le cSNP distinguiamo *coding non synonymous* SNP e *coding synonymous* SNP. Le *non synonymous* SNP sono quelle varianti che codificano per un aminoacido differente da quello del gene *wild type*, oppure per un codone di stop, e che di solito determinano alterazioni della struttura della proteina, della sua funzione, della sua stabilità oppure una proteina più corta per la presenza di un codone di stop anomalo. Le *synonymous* SNP codificano per lo stesso aminoacido, ma questo non si traduce necessariamente nella produzione di una proteina perfettamente funzionante, perché potrebbero esserci

alterazioni della stabilità del trascritto di mRNA o dei meccanismi di splicing. Le SNP non codificanti (ncSNPs) possono svilupparsi in promotori, *enhancers*, introni o in regioni regolatorie, alterando il legame con i fattori di trascrizione, la stabilità del trascritto di mRNA o lo splicing, determinando quindi alterazioni della funzionalità della proteina, pur non modificandone gli aminoacidi²¹.

Le *indels*, il secondo tipo di varianti per frequenza dopo gli SNP, determinano piccole delezioni/inserzioni nel genoma umano i cui effetti ovviamente variano in base alla regione del gene colpito²².

Le CNV (*copy number variations*), infine, coinvolgono larghi segmenti di DNA, con duplicazione, delezione o inversione di un gene²³.

Queste mutazioni vengono individuate tramite due tipi di studi: *candidate gene study* e *genome-wide association study* (GWAS). Nel primo caso si testano i geni potenzialmente coinvolti nella farmacocinetica o nella farmacodinamica del farmaco, con l'ovvio punto negativo di non riuscire a valutare tratti multigenici. Il secondo tipo, invece, sfrutta le metodiche di sequenziamento genomico per valutare la frequenza di determinati alleli in una specifica popolazione, di solito coloro che rispondono a un farmaco o che mostrano effetti avversi.

Una volta identificato un gene o un locus di interesse farmacologico, si deve andare a valutare quali polimorfismi codificanti o non codificanti contribuiscono all'alterazione della risposta al farmaco. Per fare questo si possono condurre studi *in vitro* o su animale, inducendo la mutazione e valutando il risultato, oppure utilizzando algoritmi che analizzano le possibili variazioni della sequenza nucleotidica e stabiliscono quali sono quelle più probabilmente dannose per la funzione del gene.

Perché una mutazione possa essere in grado di incidere sulla risposta ad un farmaco, deve modificarne la farmacodinamica (PD) o, più comunemente, la farmacocinetica (PK), ad esempio alterando la funzione di enzimi implicati nel suo metabolismo, o nei sistemi di trasporto o di eliminazione. Le modifiche delle caratteristiche farmacocinetiche di un farmaco, in termini di variabili quali emivita ($t_{1/2}$), volume apparente di distribuzione (Vd), clearance (CL), se non prontamente riconosciute, si traducono in variazioni della concentrazione del farmaco nel sangue e conseguentemente nei diversi tessuti. Se tali alterazioni farmacocinetiche risultano rilevanti possono essere alla base di una maggior incidenza di effetti avversi o al contrario di assenza di efficacia del farmaco stesso.

Mutazioni di tipo *loss of function* in enzimi chiave del metabolismo, quali ad esempio i citocromi o la DPD, oggetto del nostro studio, di farmaci a basso indice terapeutico, determinano inevitabilmente variazioni dei parametri PK che, seppur minime, comporteranno un innalzamento della concentrazione ematica del farmaco. Ne consegue che la mancata correzione della dose o il giusto frazionamento della stessa possono essere causa di effetti avversi anche gravi¹.

GENE DPYD

Le prime informazioni riguardanti un possibile coinvolgimento del gene DPYD nella genesi degli effetti avversi da fluoropirimidine risalgono agli anni '80 del 1900. In questo periodo si inizia a notare una maggior incidenza di effetti avversi da 5-FU, soprattutto per quanto riguarda la neurotossicità grave, in persone affette da pirimidinemia familiare, malattia metabolica dovuta a deficienza di diidropirimidina deidrogenasi (DPD). Nei loro parenti, quindi, si iniziano a cercare le motivazioni biologiche alla base di questa associazione, dimostrando un marcato aumento dell'emivita terminale di 5-FU in questi pazienti, assieme all'assenza di metaboliti del farmaco e alla maggior escrezione urinaria di farmaco immodificato²⁴.

Negli anni '90 si è continuato a studiare questo argomento, dapprima con studi che hanno valutato l'associazione tra i livelli plasmatici di 5-FU e l'attività enzimatica di DPD, dimostrando una variazione circadiana della sua attività²⁵; si è passati poi a studiare le varianti del gene DPYD, stilando una nomenclatura che ancora oggi viene utilizzata²⁶ e, infine, approfondendo le conoscenze riguardanti il gene, la funzione dell'enzima e il loro effetto sul metabolismo del farmaco.

La dimostrazione che potenti inibitori di DPD come ad esempio brivudina o sorivudina, farmaci antivirali analoghi della pirimidina, fossero in grado di bloccare il metabolismo delle fluoropirimidine aumentandone le concentrazioni plasmatiche²⁷ ha confermato la maggior incidenza di effetti avversi da 5-FU in soggetti con deficit di DPD²⁸.

Negli anni 2000, la deficienza di DPD viene vista come una condizione potenzialmente letale in caso di terapia con 5-FU²⁹ e quindi si inizia già a parlare di terapia personalizzata³⁰, cercando modi per accertare la presenza del difetto in maniera veloce e poco costosa.

Nel 2006, uno studio mostra come sia possibile accertare la deficienza di DPD tramite la somministrazione di una dose ridotta del farmaco, seguita dalla misurazione dei parametri farmacocinetici³¹.

Dal 2010, diversi studi riportano la possibilità di contrastare il difetto di DPD tramite la riduzione della dose di 5-FU, affermando quindi la necessità di una metodica di screening pretrattamento, dimostrandone la *cost-effectiveness*, la minor incidenza di effetti avversi e l'assenza di effetti negativi sul trattamento della malattia di base³²⁻⁴¹.

La riduzione della dose si è dimostrata efficace poiché i pazienti con mutazioni di DPYD tendono ad avere una funzionalità enzimatica residua che dipende dal tipo di mutazione e dalla condizione di omozigosi o eterozigosi; pertanto abbassando la dose si determina il ripristino di una concentrazione plasmatica all'interno del range terapeutico, riportando il rischio di effetti avversi al livello della popolazione normale, senza però abbassare l'efficacia terapeutica sulla condizione patologica di base³⁶.

Oltre al gene DPYD, è stato poi scoperto un altro gene, TYMS, associato a tossicità da 5-FU; questo gene codifica per la timidilato sintasi, enzima che catalizza la reazione tra deossiridilato e deossitimidilato, essenziale per la formazione di precursori del DNA, oltre che essere uno dei target del 5-fluorouracile. La variante rs45445694 (allele TYMS 2R), una duplicazione, è stata associata, sia in omozigosi che in eterozigosi, ad eventi avversi gravi in seguito a somministrazione di 5-FU, dovuti ad una aumentata espressione della proteina a causa di un aumento del numero di ripetizioni della sequenza coinvolta³⁹.

Il gene DPYD, del peso di 950kb, è situato sul cromosoma 1p22 ed è costituito da 23 esoni codificanti.

Numerose varianti del gene DPYD si associano ad un alterato *splicing* dell'mRNA o codificano per proteine con sequenza aminoacidica alterata, ma alcune di queste non alterano la funzione di DPD in maniera clinicamente rilevante (c.85T>C, *9A, rs1801265, p.C29R; c.1627A>G, *5, rs1801159, p.I543V; c.2194G>A, *6, rs1801160, p.V732I)⁴².

Quattro varianti, che comportano la riduzione della funzione di DPD, sono di centrale importanza a causa della loro elevata frequenza nella popolazione generale e per l'impatto sulla funzionalità dell'enzima e quindi sulla tossicità da 5-fluorouracile; esse sono:

c.1905+1G>A (rs3918290, anche conosciuto come DPYD*2A, DPYD: IVS14 + 1G>A);
c.1679T>G (rs55886062, DPYD *13, p.I560S);
c.2846A>T (rs67376798, p.D949V);
c.1129-5923C>G (rs75017182, HapB3).

Tra queste varianti c.1905+1G>A e c.1679T>G hanno l'impatto più importante sulla funzione di DPD, mentre c.1129-5923C>G determina solo un'attività moderatamente ridotta⁴². La variante c.2846A>T determina una riduzione moderata della funzione dell'enzima, circa il 30%, ma si è visto che la riduzione della clearance 5-fluorouracile è molto maggiore, tanto che nelle linee guida AIOM-SIF viene consigliata una riduzione della dose del 50%, pari a quella consigliata per la mutazione non senso c.1905+1G>A.

La mutazione c.1905+1G>A (*2A), localizzata nell'esone 14, determina la non codifica di tutto l'esone, causando la produzione di una proteina non funzionale, con una riduzione della funzione del 50% negli eterozigoti³⁶.

Le varianti c.1679T>G e c.2846A>T sono mutazioni missenso che colpiscono la funzione della proteina, con una riduzione della funzione rispettivamente del 68% e del 30% negli eterozigoti⁴².

La variante c.1129-5923C>G (HapB3), localizzata nell'introne 10, causante l'aplotipo b3 (HapB3) di DPYD, introduce un sito di *splicing* criptico e la produzione parziale di un trascritto non funzionale, con quindi una proteina malfunzionante con una riduzione della funzione del 30%⁴².

In Europa il polimorfismo HapB3 è la variante più comunemente causa di diminuzione della funzione di DPD con una frequenza di portatori di 4.1-4.8%, seguita da c.1905+1G>A (1-1.2%) e c.2846A>T (0.8-1.4%); quindi circa il 7% della popolazione europea è portatore di almeno una variante⁴².

I soggetti omozigoti per la variante c.1129-5923C>G conservano dal 41 al 50% dell'attività dell'enzima, quindi hanno un deficit parziale di DPD. La condizione di omozigosi per altri alleli è stata studiata solo *in vitro*, dimostrando però una funzione rimanente che variava da meno del 25% per c.1905+1G>A al 39-59% per c.2846A>T⁴².

I portatori eterozigoti di c.1905+1G>A, c.2846A>T e c.1679T>G hanno una riduzione della clearance del 5-fluorouracile del 40-80% rispetto al soggetto sano⁴².

Recentemente si è scoperto che un comune polimorfismo (rs895819A>G) del DPYD-regulatory microRNA miR-27a è associato ad una bassa attività di DPD ed è correlato a tossicità da fluoropirimidine⁴².

Infine, la mutazione c.557A>G (p.Y186C) si osserva soprattutto in individui di etnia africana e determina in eterozigosi una riduzione del 46% della attività di DPD⁴².

Oltre al test genetico, per valutare la funzionalità di DPD si può stimarne l'attività nelle cellule mononucleate periferiche; la si può valutare indirettamente calcolando il rapporto tra diidrouracile endogeno e uracile nel plasma (UH2/U ratio), oppure si può usare un test da carico di uracile¹⁰.

L'attività di DPYD viene misurata tramite il *DPYD gene activity score*, precedentemente usato per tradurre il genotipo del gene codificante per il citocromo CYP2D6, un altro gene coinvolto nel metabolismo di alcuni farmaci e come DPYD responsabile di variazioni nella risposta terapeutica, in fenotipo, dando quindi una stima della funzionalità residua del sistema (tabella 1).

Table 1. Values for activity assigned to alleles of DPYD.		
Activity value	Alleles	Ref.
0	DPYD*2A (rs3918290)	[4,8,10,11,19,27,29-46]
	DPYD*13 (rs55886062)	[4,19,30,32,33,46,49,50]
0.5	c.2846A>T (rs67376798)	[4,13,24,33,36,41,42,44,47]
	c.1236G>A/ HapB3 (rs56038477)	[14,15,42,44,46,47,49,50,56]
1	DPYD*1 (wild-type)	

These values for both alleles of a patient are summed, leading to an individual gene activity score.

Tabella 1 Valore di activity score degli alleli di DPYD⁴³.

In base al *DPYD activity score* delle diverse varianti, si modifica la dose di farmaco somministrata (tabella 2); in caso di score 0 è opportuno non somministrare fluoropirimidine ma optare per un trattamento alternativo⁴³.

Table 2. Initial dose recommendation for *DPYD* gene activity score.

Gene activity score	% of standard dose
0	Alternative drug
0.5	25
1	50
1.5	75
2	100

Tabella 2 Correlazione tra *DPYD* gene activity score e dose iniziale di farmaco raccomandata⁴³.

I pazienti con un deficit completo noto di DPD non devono ricevere 5-FU per iniezione o per infusione, e non devono ricevere capecitabina o tegafur, poiché una completa mancanza di DPD li espone a un rischio più elevato di effetti collaterali gravi e potenzialmente letali.

Per i pazienti con un deficit parziale di DPD, deve essere presa in considerazione una dose iniziale ridotta di questi farmaci, potendo poi essere aumentata in corso di trattamento, dato che non è stata stabilita con certezza l'efficacia di una dose ridotta per il trattamento della patologia di base, pur essendoci già delle dimostrazioni di efficacia per quanto riguarda la chemioterapia con 5-FU a dosi ridotte in pazienti con mutazione *DPYD**2A⁴¹, prestando però particolare attenzione alla gravità degli effetti collaterali.

Tuttavia, poiché alcuni pazienti portatori di varianti con riduzione o annullamento della funzione di DPD tollerano dosi normali di 5-FU, la dose dovrebbe essere aumentata in seguito a cicli di terapia effettuati senza la comparsa di effetti collaterali rilevanti o in seguito al riscontro di una concentrazione plasmatica di farmaco inferiore alla concentrazione terapeutica. La dose andrà invece ridotta ulteriormente al manifestarsi di effetti collaterali rilevanti.

Al fine di avere un migliore controllo degli effetti indesiderati e per migliorare la gestione dei pazienti nella pratica clinica quotidiana, è utile proporre il monitoraggio delle concentrazioni plasmatiche (Therapeutic Drug Monitoring, TDM) dei farmaci nel tempo. Essere in grado di determinare una correlazione tra la concentrazione plasmatica del farmaco e gli effetti avversi può contribuire ad ottimizzare la strategia terapeutica; la

misurazione delle concentrazioni plasmatiche dei farmaci, pur nelle difficoltà tecniche ed organizzative, sembra essere una chiara necessità da applicare nella pratica clinica.

La carenza di DPD si associa a livelli elevati di uracile plasmatico pretrattamento. Livelli ematici di uracile ≥ 16 ng/ml e < 150 ng/ml sono indicativi di un deficit parziale di DPD, mentre un livello ematico di uracile ≥ 150 ng/ml è indicativo di un deficit completo di DPD. Il TDM del fluorouracile, complementare al test DPD iniziale, può essere utile per ripristinare una adeguata esposizione al farmaco in pazienti che mostrino basse o elevate concentrazioni plasmatiche e può migliorare gli esiti clinici in pazienti trattati con 5-FU in infusione endovenosa. L'AUC target (area sotto la curva concentrazione-tempo) dovrebbe essere compresa tra 20 e 30 mg x h/L¹⁰.

RACCOMANDAZIONI AIOM-SIF

Le raccomandazioni intersocietarie, della Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM) e della Società Italiana di Farmacologia (SIF) sono state pubblicate a ottobre del 2019 in seguito all'aumentare degli studi scientifici che riportavano la necessità di introdurre procedure molecolari di screening per lo studio delle mutazioni di DPYD prima del trattamento con 5-FU e farmaci analoghi in modo da aumentare la sicurezza dei pazienti e quindi diminuire la frequenza degli effetti avversi, causa di aumento della durata di ospedalizzazione e dei costi sanitari, oltre che di sofferenza e mortalità per il paziente⁴⁴.

Nel marzo 2020 il comitato di sicurezza dell'EMA (PRAC) conferma la necessità dello screening per mutazioni di DPYD e formula le raccomandazioni per il trattamento per i medicinali fluorouracile, capecitabina, tegafur e flucitosina⁴⁵; il 25 maggio 2020 l'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) emette una propria "nota informativa importante" per i medici prescrittori, concordata con le autorità regolatrici europee¹⁰.

Secondo quindi le diverse indicazioni tra loro integrate, il test molecolare per il gene DPYD va eseguito su sangue periferico ed è raccomandabile:

- prima della terapia con fluoropirimidine ogni qualvolta, a giudizio dell'oncologo, il trattamento venga proposto ad un paziente con caratteristiche cliniche (comorbidità, performance status, stadio di malattia) che lascino supporre un limitato impatto in termini di sopravvivenza e/o risposta e/o sia elevato il rapporto rischio/beneficio. L'analisi deve comprendere le mutazioni: c.1236G>A (c.1129-5923C>G), c.1679T>G, c.1905+1G>A e c.2846A>T;
- nei casi di tossicità gravi o inattese comparse durante la terapia con fluoropirimidine è consigliata l'analisi delle stesse mutazioni che devono essere valutate prima dell'inizio della terapia (c.1236G>A, c.1679T>G, c.1905+1G>A, e c.2846A>T) qualora il paziente non le abbia precedentemente eseguite⁴⁴. A queste si aggiunge la variante c.2194G>A che è associata a tossicità da fluoropirimidine prevalentemente ematologica ed è l'unica di cui se ne consiglia la valutazione solo in caso di tossicità durante la terapia⁴⁶.

Queste linee guida valgono per 5-fluorouracile e i suoi profarmaci, capecitabina e tegafur.

In caso di mutazione con deficit completo di funzione, i pazienti sono ad elevato rischio di eventi avversi e potenzialmente letali e, quindi, non devono essere trattati con fluoropirimidine. In caso, invece, di mutazioni che determinino un deficit parziale di funzione, i pazienti possono essere trattati con fluoropirimidine a dosaggio ridotto, titolando poi la dose se non si presentano eventi avversi, dato che non è stata ancora dimostrata la reale efficacia del dosaggio ridotto.

Il test viene eseguito su DNA germinale estratto da 3 ml di sangue periferico raccolto in provetta con anticoagulante (EDTA), dopo acquisizione del consenso informato. Il campione può essere conservato in provetta chiusa, sterile e a temperatura ambiente per un periodo massimo di 48 ore, a +4 °C fino a 5 giorni oppure a -20 °C per più di 5 giorni.

Il campione deve essere poi accompagnato dalla richiesta su ricettario del SSN e idonea documentazione che specifichi se si tratta di una analisi pre- o durante trattamento, indicando le tossicità che si siano manifestate se il test viene eseguito durante la terapia, e che riporti uno schema riassuntivo del regime chemioterapico e di altre terapie concomitanti, allo scopo di consentire al farmacologo clinico di valutare eventuali interazioni farmacologiche che impattino sulla funzione dell'enzima DPD⁴⁴.

Ai laboratori che aderiscono al progetto è richiesto di rispettare alcuni requisiti minimi, cioè avere strumentazione idonea per analisi di acidi nucleici da campioni biologici, disporre di certificazione del laboratorio UNI EN ISO 9001:2015 e dimostrare la comprovata esperienza e competenza del personale per l'esecuzione e l'interpretazione del test.

All'Ospedale Galliera, dove si è svolto questo studio, si utilizza il sistema MagCore HF16 (RBC Bioscience Corp) con il kit "MagCore GenomicDNA whole blood" per l'estrazione e la purificazione del DNA germinale a partire da sangue intero in EDTA. La valutazione dello status mutazionale del gene DPYD è stata eseguita mediante tecnica di Real-Time PCR che si avvale della piattaforma "EasyPGX ready DPYD" (Diatech Pharmacogenetics srl), secondo procedure validate e certificate CE IVD. Il test, mediante discriminazione allelica, permette il rilevamento dei 5 principali polimorfismi validati quali marcatori clinici associati alla tossicità del farmaco con limite di sensibilità analitica di 10 ng/reazione di DNA.

Questi polimorfismi sono: c.1905+1G>A (rs3918290; IVS14+1G>A;DPYD*2A), c.1679T>G (rs55886062; p.I560S; DPYD*13), c.2846A>T (rs67376798; p.D949V),

c.1129-5923C>G (rs75017182; IVS 10C>G / HapB3) e c.2194G>A (rs1801160; V7321; DPYD*6), considerando che la variante c.1129-5923C>G co-segrega con la variante c.1236G>A (rs56038477) e che l'aplotipo B3 comprende le seguenti varianti: c.483+18G>A (rs56276561, IVS 5+18G>A), c.680+139G>A (IVS 6+139G>A) e c.959-51T>C (IVS 9-51T>C).

Il referto deve contenere le seguenti informazioni:

- scheda anagrafica del paziente, con indicazione della struttura e del medico richiedenti l'analisi;
- matrice utilizzata per l'analisi, metodica impiegata per la sua esecuzione e indicazione delle varianti alleliche esaminate;
- risultati dell'analisi;
- valutazione farmacologica e impostazione della terapia.

Il referto così prodotto deve essere quindi contestualmente firmato dal farmacologo clinico, o da una figura professionale equivalente in sua assenza, e dal responsabile dell'esecuzione dell'analisi. La riduzione di dose suggerita dalle linee guida AIOM-SIF è riportata in tabella 3. Come si può osservare la riduzione della dose è prevista generalmente solo in caso di mutazioni allo stato eterozigote, mentre, in considerazione di quanto descritto in letteratura, non è consigliata la somministrazione di fluoropirimidine qualora il paziente presenti una mutazione delle varianti c.1679T>G, c.1905+1G>A, c.2846A>T in forma omozigote. La variante c.2194G>A (indicata in tabella con asterisco), come precedentemente descritto, deve essere ricercata solo se il paziente dovesse mostrare tossicità dopo l'inizio del trattamento; la presenza sia della forma eterozigote che di quella omozigote consente di confermare la correlazione tra la tossicità in atto e la somministrazione del farmaco. In entrambi i casi, le linee guida suggeriscono una riduzione della dose all'85% in caso di variante in eterozigosi e al 70% in caso di omozigosi.

Il test farmacogenetico congiuntamente alla valutazione farmacologica, è ritenuto pertanto un utile ausilio, da affiancare al giudizio clinico, per scegliere il regime di trattamento ottimale per il singolo paziente e per la personalizzazione della cura.

Genotipo DPYD		Dose di fluoropirimidine consigliata
Wild-type	c.1236GG	100%
	c.1679TT	
	c.1905+1GG	
	c.2846AA	
	*c.2194GG	
Eterozigote	c.1236GA	75%
	c.1679TG	50%
	c.1905+1GA	
	c.2846AT	
	*c.2194GA	85%
Omozigote mutato	c.1236AA	50%
	c.1679GG	Trattamento con fluoropirimidine da evitare
	c.1905+1AA	
	c.2846TT	
	*c.2194AA	70%

Tabella 3 Raccomandazione dose in caso di mutazione di DPYD⁴⁴.

ANALISI DEL POLIMORFISMO DEL DPD IN PAZIENTI CANDIDATI A TERAPIA CON FLUOROPIRIMIDINE: LO STUDIO

In considerazione delle più recenti evidenze si è deciso a partire dall'anno 2020, di applicare le Linee Guida AIOM-SIF a tutti i pazienti oncologici che necessitassero di un trattamento chemioterapico a base di 5-FU o capecitabina all'interno dell'Ente Ospedaliero Ospedali Galliera. Lo studio per l'implementazione di questo protocollo di *Good Clinical Practice* ha previsto l'intervento di un team multidisciplinare per la presa in carico del paziente, che ha coinvolto le Unità di Anatomia Patologica, di Oncologia medica e di Farmacologia Clinica.

Tutto ciò è stato necessariamente affiancato dalla stesura di una nota informativa da illustrare al paziente (figura 5) e di un modulo per il consenso informato (figura 6) che richiede la firma del paziente o di un suo tutore legale trattandosi di un'analisi genetica finalizzata all'identificazione di specifiche variazioni nella sequenza del DNA in grado di predire la risposta individuale ad alcuni farmaci.

In particolare l'informativa è stata elaborata al fine di chiarire in maniera sintetica i termini "analisi farmacogenetica" o "test farmacogenetico" che vengono spesso utilizzati in modo intercambiabile; viene riportato come le variazioni nella sequenza del DNA, definite polimorfismi, possano modificare l'espressione o l'attività di geni coinvolti principalmente nei processi di assorbimento, distribuzione, metabolismo o eliminazione dei farmaci chemioterapici e che alcuni polimorfismi possono determinare modifiche dell'azione di 5-FU e capecitabina, provocando una ridotta o assente risposta al trattamento o la comparsa di reazioni avverse. L'informativa descrive sinteticamente che per l'esecuzione del test farmacogenetico è necessario raccogliere alcune informazioni cliniche e prelevare un campione di sangue periferico. Al fine di garantire la libertà di scelta del paziente e la protezione dei dati sensibili personali, l'informativa specifica che il consenso all'indagine può essere revocato in qualsiasi momento e che i risultati ottenuti, così come ogni atto medico, sono confidenziali, sottoposti al vincolo del segreto professionale e comunicati solo al diretto interessato.

Va precisato che durante il processo decisionale di implementazione dei test farmacogenetici si è deciso che la variante c.2194G>A fosse comunque indagata in fase pretrattamento, nonostante le linee guida ne consiglino la valutazione solo nel caso in cui il paziente manifesti tossicità (in particolare ematologica) durante la terapia. Questa decisione è stata presa per evitare di dover effettuare il singolo test in caso di sviluppo di effetti indesiderati dopo l'inizio del trattamento, in pazienti altrimenti negativi per le altre mutazioni. L'analisi della variante c.2194G>A è infatti parte integrante del kit per l'effettuazione del pannello farmacogenetico generale ed il costo di ogni kit è particolarmente ingente.

In ogni caso, come da indicazioni delle Linee Guida AIOM-SIF, l'accertamento pretrattamento della variante c.2194G>A in etero- o in omozigosi non richiede una modifica *ab initio* del dosaggio del farmaco chemioterapico e quindi si è stabilito che il referto farmacogenetico venisse acquisito dall'oncologo senza necessitare di valutazione farmacologica, che invece è richiesta per un adeguamento della dose in caso di tossicità manifesta.



INFORMATIVA
Analisi Farmacogenetica

Servizio di Anatomia e Istologia Patologica
Responsabile. Dott. Eugenio Lucio Marinaro

Servizio di Farmacologia Clinica
Responsabile. Prof. Francesca Mattioli

Gentile Signore/a, affinché sia informato/a sul tipo di analisi che le verrà proposto, la preghiamo di leggere con attenzione questo breve testo che contiene alcune informazioni che saranno meglio dettagliate nel corso del colloquio con il suo medico. Tali informazioni hanno lo scopo di chiarirle il significato dell'analisi farmacogenetica e permetterle di decidere liberamente se effettuare o meno il test.

I termini "analisi farmacogenetica" o "test farmacogenetico" sono sinonimi e definiscono un test genetico finalizzato all'identificazione di specifiche variazioni nella sequenza del DNA in grado di predire la risposta individuale ad alcuni farmaci. Tali variazioni, comunemente definite polimorfismi, sono frequenti nella popolazione e sono caratterizzate da cambiamenti nel DNA che possono modificare l'espressione o l'attività di geni coinvolti principalmente nei processi di assorbimento, distribuzione, metabolismo o eliminazione di alcuni farmaci. Alcuni polimorfismi possono determinare inoltre modifiche dell'azione di un farmaco provocando una ridotta o assente risposta al trattamento o la comparsa di reazioni avverse.

La risposta al farmaco presenta, in altri termini, una variabilità individuale di efficacia e sicurezza che può dipendere da una componente genetica. Sono oggi descritte numerose varianti farmacogenetiche associate con l'effetto terapeutico sia in termini di efficacia che di tollerabilità del trattamento.

Il test farmacogenetico è ritenuto pertanto un utile ausilio, da affiancare al giudizio clinico, per scegliere il regime di trattamento ottimale per il singolo paziente e per la personalizzazione della cura.

Per l'indagine sarà necessario raccogliere alcune informazioni cliniche utili per la valutazione da parte del farmacologo clinico e prelevare un campione di sangue periferico (3 ml) che servirà per l'esecuzione dell'analisi molecolare sul DNA.

Può revocare il consenso in qualsiasi momento, anche nell'immediatezza della procedura sanitaria che le viene proposta.

Tutti i risultati ottenuti dalle analisi farmacogenetiche, così come ogni altro atto medico, sono da considerarsi strettamente confidenziali, sottoposti al vincolo del segreto professionale e comunicati solo al diretto interessato (nel caso di minori, interdetti o sottoposti ad amministrazione di sostegno, ai soggetti legittimati).

In caso in cui Lei lo ritenga necessario, il personale medico o biologo del Servizio di Anatomia e Istologia Patologica o del Servizio di Farmacologia Clinica è a disposizione per eventuali chiarimenti.

Figura 5 Nota informativa per l'analisi farmacogenetica.



CONSENSO INFORMATO

Analisi Farmacogenetica

Servizio di Anatomia e Istologia Patologica
Responsabile. Dott. Eugenio Lucio Marinaro

Servizio di Farmacologia Clinica
Responsabile. Prof. Francesca Mattioli

Io sottoscritto/a:

Cognome.....Nome.....

Nato il.....a.....Prov.....

Recapito.....

A seguito del colloquio intercorso con il/la Dr./Dr.ssa

Cognome.....Nome.....

Letta l'informativa consegnatami, avendo compreso il contenuto e avendo ottenuto informazioni dettagliate sul significato delle analisi farmacogenetiche richieste

acconsento

- | | |
|---|---|
| 1) all'utilizzo di un mio campione biologico a scopo diagnostico | SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> |
| 2) al trattamento dei miei dati personali, sensibili, genetici per le finalità ivi indicate | SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> |
| 3) a rendere partecipe dell'indagine il mio medico curante | SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> |
| 4) all'utilizzo del materiale biologico e dei miei dati per approfondimenti a fini diagnostici presso il centro che esegue le analisi | SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> |
| 5) fatto salvo ogni obbligo di legge, a rendere partecipi dei risultati i miei famigliari, qualora ne facciano richiesta | SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> |

TIPOLOGIA del Campione da analizzare:

Sangue periferico altro (specificare)

Prestazione/i richiesta/e

Analisi Farmacogenetica (indicare il nome del farmaco/i)

GENE/I polimorfico/i

In riferimento alla possibilità che nell'ambito dell'analisi possano emergere notizie inattese e/o incidentali relative alla mia salute **acconsento** a che mi vengano comunicate **non acconsento** a che mi vengano comunicate

Data.....

Firma dell'Interessato.....Firma del Medico Proponente

REVOCA del CONSENSO

Il sottoscritto/a Cognome Nome

Dichiara di revocare il consenso n. 1 - 2 - 3 - 4 - 5 (ovvero tutti) sopra riportato/i

Data.....

Firma dell'Interessato

Figura 6 Consenso informato per l'analisi farmacogenetica.

ANALISI DEL POLIMORFISMO DEL DPD IN PAZIENTI CANDIDATI A TERAPIA CON FLUOROPIRIMIDINE: I PAZIENTI

Dall'analisi da noi effettuata in collaborazione con la S.C. Anatomia e istologia patologica dell'Ente Ospedaliero Ospedali Galliera, nell'anno 2020 sono stati tipizzati per mutazioni del gene DPYD 125 pazienti, dei quali 105 sono risultati *wild type*, mentre 20 presentavano le seguenti mutazioni:

- mutazione DPYD*6 c.2194G>A in eterozigosi, **16 pazienti**;
- mutazione DPYD*6 c.2194G>A in omozigosi, **1 paziente**;
- mutazione 1129-5923 C>G in eterozigosi, **1 paziente**;
- mutazione DPYD*2A c.1905+1G>A in eterozigosi, **2 pazienti**.

Questa trattazione si focalizzerà sull'analisi dei pazienti con mutazioni che hanno beneficiato della consulenza del farmacologo clinico per l'aggiustamento della dose del farmaco chemioterapico, capecitabina o 5-fluorouracile, e dei farmaci assunti per il trattamento di patologie concomitanti.

Fra i 16 pz con mutazione DYP*6 c.2194G>A, una sola paziente, la signora C.S., è arrivata alla nostra attenzione in seguito a tossicità per trattamento chemioterapico a base di capecitabina e oxaliplatino. Solo in questo caso quindi l'individuazione della mutazione DPYD*6 c.2194G>A in eterozigosi è stata effettuata a regime chemioterapico già iniziato e proprio a causa dell'insorgenza di importanti effetti indesiderati. Si riporta la storia clinica della paziente, l'interpretazione del dato farmacogenetico e la variazione del trattamento secondo quanto proposto dalle linee guida AIOM-SIF e di concerto con il team multidisciplinare.

La paziente, di 74 anni, presentava in anamnesi: isteroannessiectomia bilaterale per neoplasia del collo dell'utero diagnosticata a 36 anni; pregressa frattura vertebrale; diabete di tipo 2 in terapia con antidiabetico orale (metformina); ipertensione arteriosa in terapia farmacologica con sartano (olmesartan 20 mg/die) e gastroprotezione (pantoprazolo 40 mg/die). Nell'aprile del 2020 veniva posta la diagnosi di adenocarcinoma dello stomaco in sede, con unica metastasi epatica, a causa del quale era stato prontamente iniziato, nello stesso mese di aprile 2020, un trattamento con regime chemioterapico di prima linea

XELOX (capecitabina 1800 mg/mq/die ovvero 3000 mg totali dal g1 al g14 q21 + oxaliplatino 100 mg/mq g1 q21 ovvero 165 mg totali).

Al giorno 14 del terzo ciclo di trattamento, cioè il 23 giugno 2020, la paziente manifestava tossicità con sviluppo di febbre (temperatura massima 39.5°C) con brividi, diarrea di grado 3, vomito di grado 2, il tutto persistente da almeno 5 giorni.

Per diarrea di grado 3, secondo i Criteri Comuni di Tossicità del CTCAE (Common Terminology Criteria for Adverse Events), si intende un incremento da 7 a 9 scariche al giorno o incontinenza e malassorbimento; per vomito di grado 2 si intende invece una condizione che richiede l'intervento farmacologico e l'idratazione del paziente per via endovenosa.

La chemioterapia è stata interrotta e si è quindi proceduto ad effettuare l'analisi dei polimorfismi del gene DPYD in corso di trattamento, come previsto dalle linee guida, e la paziente è risultata portatrice di mutazione 2194G>A (DPYD*6) con genotipo eterozigote.

In caso di presenza di questo polimorfismo le linee guida prevedono la riduzione della dose iniziale all'85% della stessa, mentre l'RCP (riassunto delle caratteristiche del prodotto, redatto nel 2017) di capecitabina consiglia, in caso di tossicità di grado 3, di sospendere il farmaco fino a riduzione (da grado 3 a grado 1) o scomparsa della tossicità e di ridurre la dose del farmaco al 75% della dose iniziale, a partire dal successivo ciclo.

La signora C.S. era quindi trattata con cinque farmaci (capecitabina, oxaliplatino, metformina, olmesartan, pantoprazolo). In seguito alla consulenza farmacologica non risultavano interazioni clinicamente rilevanti tra i farmaci capecitabina, oxaliplatino, metformina, olmesartan, in grado di portare ad un minor beneficio clinico o, al contrario, allo sviluppo di reazioni avverse significative. Tuttavia, i pazienti di età superiore ai 60 anni, rispetto ai soggetti più giovani, possono riportare con maggior frequenza reazioni avverse correlate al trattamento chemioterapico; in particolare quando capecitabina è usata in associazione ad altri agenti antineoplastici, come nel nostro caso con oxaliplatino.

I pazienti anziani (≥ 65 anni) possono manifestare reazioni avverse anche di grado elevato comprese quelle che hanno portato, nella nostra paziente, all'interruzione del trattamento.

La capecitabina può causare squilibri idroelettrolitici, disordini metabolici e, seppur raramente, iperglicemia, sebbene con un meccanismo ancora non del tutto noto. La signora C.S. era in trattamento da tempo con metformina per il controllo del diabete, tuttavia i dati

clinici non riportavano alcuna rilevante alterazione della glicemia dopo l'inizio del trattamento con capecitabina.

Degna di nota invece una possibile interazione, segnalata in letteratura come severa, tra capecitabina e gli inibitori di pompa protonica (PPI), in questo caso pantoprazolo, sebbene con meccanismo non ancora chiarito. Alcuni autori ipotizzano una riduzione dell'assorbimento di capecitabina causata dall'innalzamento del pH gastrico ad opera dei PPI. Non vi sono studi di farmacocinetica in letteratura dirimenti, ma invece è dimostrata una riduzione della sopravvivenza globale dei pazienti con cancro gastro-esofageo in stadio avanzato trattati con capecitabina e PPI rispetto a chi assumeva solo capecitabina (9,2 mesi contro 11,3 mesi; hazard ratio 1.34)⁴⁷.

Infine, va ricordato che capecitabina e i suoi metaboliti sono eliminati principalmente per via renale (il 95,5% della dose di capecitabina somministrata è eliminata nelle urine), pertanto è controindicata in pazienti affetti da insufficienza renale grave (clearance della creatinina < 30 ml/min). L'incidenza di reazioni avverse di grado 3 o 4 è maggiore rispetto al soggetto sano, in pazienti con moderata compromissione della funzione renale (clearance della creatinina pari a 30-50 ml/min). Nella nostra paziente, la presenza di vomito e diarrea di grado elevato e la conseguente disidratazione, avrebbero potuto portare ad una certa compromissione della funzionalità renale con possibile minor escrezione del/i farmaco/i assunti dalla paziente.

Capecitabina (Xeloda®) è commercializzato in compresse per somministrazione orale da 150 mg o da 500 mg; la paziente assumeva inizialmente 3 compresse da 500 mg due volte al giorno per garantire la dose di 1800 mg/mq/die ovvero 3000 mg giornalieri (valore ottenuto per arrotondamento considerando la superficie corporea pari a 1.65 mq), manifestando poi la descritta tossicità. Al fine di ridurre la dose al 75% della dose iniziale, seguendo l'indicazione del RCP del farmaco (più cautelativamente rispetto a quanto suggerito dalle Linee Guida) si sarebbero dovuti somministrare 1350 mg/mq/die di farmaco. Tuttavia, per consentire un adeguato frazionamento della dose con le formulazioni disponibili questa dose presupponeva di somministrare 2 compresse da 500 mg + 1 compressa da 150 mg due volte al giorno, raggiungendo una dose totale di 2300 mg. In seguito alla consulenza farmacologica si è preferito fissare la successiva dose di capecitabina cautelativamente al 72% circa della dose iniziale, cioè a 1290 mg/mq/die, somministrando poi alla paziente due compresse da 500 mg due volte al giorno (dose totale

di 2000 mg). Dose che si sarebbe comunque dovuta rivalutare in caso di sospensione del PPI o in presenza di alterazione dei parametri ematochimici e della funzionalità renale.

Durante il periodo di follow up a seguito della consulenza farmacologica per tossicità acuta da capecitabina, la paziente ha manifestato solamente diarrea saltuaria di grado 1 che non ha richiesto modifiche del trattamento farmacologico che è proseguito fino a fine cicli programmati; purtroppo, la paziente è poi deceduta per Covid nell'anno 2021.

Ad esclusione di questo caso, negli altri la valutazione farmacogenetica è stata effettuata prima di iniziare il regime chemioterapico; verrà descritta brevemente la storia clinica dei tre pazienti in cui è stata rilevata al test una mutazione del gene DPYD e per i quali è stata effettuata la consulenza farmacologica.

La signora A. B. di 68 anni, in seguito alla diagnosi di adenocarcinoma gastrico, ha eseguito l'analisi del polimorfismo del gene DPYD in vista di una possibile terapia con fluoropirimidine. La paziente presentava un'anamnesi muta per patologie, ma risultava in terapia con betabloccante (nebivololo, 5 mg, 1 compressa al giorno), farmaco verosimilmente prescritto dal Medico di Medicina Generale (MMG) per una problematica ipertensiva o aritmica.

Il regime chemioterapico proposto come prima linea era oxaliplatino 85 mg/mq per via EV e leucovorina 400 mg/mq per via EV in bolo al g1, 5-fluorouracile 1200 mg/mq per via EV in infusione continua nelle 24 ore al g1 e al g2 e, infine, 5-fluorouracile 400 mg/mq per via EV in bolo al g1; l'oncologo si riservava, tuttavia di usare, in alternativa, uno schema a base di capecitabina 2000 mg/mq/die per via orale dal g1 al g14 + oxaliplatino 130 mg/mq per via EV al g1.

In seguito al riscontro della positività in eterozigosi della mutazione c.1129-5923C>G (IVS10C>G/HapB3) che co-segrega con c.1236G>A e, in seguito alla consulenza farmacologica, si è deciso di ridurre la dose delle fluoropirimidine al 75% della dose prevista, secondo le raccomandazioni AIOM-SIF. Infatti, considerando l'età della paziente, la probabile patologia cardiovascolare controllata con betabloccante (nebivololo) e il maggior rischio di cardiotossicità delle fluoropirimidine in caso di pazienti con anamnesi di cardiopatia, aritmia e angina pectoris, non avendo ulteriori informazioni cliniche dettagliate sulla storia clinica della paziente, non si è potuto far altro che suggerire la riduzione del dosaggio, in linea con quanto proposto dalle linee guida, l'attenta valutazione della funzionalità renale e il frequente monitoraggio dei parametri ematochimici.

Il rapporto clinico con la paziente si è concluso contestualmente alla consulenza farmacologica, in quanto in seguito la paziente è stata presa in carico presso un altro Ente.

Il signor C. G., di 87 anni, è arrivato alla nostra attenzione dopo la diagnosi di metastasi epatica da adenocarcinoma del colon.

Il paziente, in terapia con cardioaspirina, bisoprololo e amlodipina, presenta una lunga storia clinica, iniziata nel 2016 con la diagnosi di adenocarcinoma del colon destro per il quale era stato sottoposto ad un intervento di emicolectomia destra. Nel 2017 venivano asportati due adenomi a livello del colon trasverso e nel 2019 il paziente era sottoposto a splenectomia per sospetta localizzazione splenica secondaria, rivelatasi poi essere un angioma. Ad agosto del 2020, in seguito ad una ECT e ad una TC di approfondimento, veniva riscontrata una formazione nodulare in sede paracavale, definita dal radiologo come “fortemente sospetta per lesione ripetitiva”. La lesione epatica era giudicata come non operabile in ragione dell’età del paziente, dei molteplici interventi chirurgici subiti e della sede; veniva quindi programmato un trattamento chemioterapico a base di capecitabina 1500 mg/mq/die ovvero 3000 mg totali (1,97 mq) e bevacizumab, motivo per il quale gli veniva proposta l’analisi farmacogenetica pre-trattamento.

L’analisi rilevava la mutazione c.1905+1G>A (IVS14+1G>A) DPYD*2A in eterozigosi; in sede di consulenza farmacologica non si ravvisavano rischi da interazione clinicamente rilevanti tra capecitabina, bevacizumab e i farmaci che il paziente assumeva quotidianamente, ma, vista l’età avanzata e, come nel caso precedente, la probabile patologia cardiovascolare, controllata con betabloccante (bisoprololo), calcio-antagonista (amlodipina) e terapia antiaggregante piastrinica, si decideva di ridurre la dose al 50% della dose programmata, cioè 750 mg/mq/die ovvero 1500 mg/die.

In corso di follow up si è registrata una buona tolleranza al trattamento che è proseguito per quattro cicli; veniva tuttavia sospeso bevacizumab, anticorpo monoclonale antiangiogenetico, per insorgenza di tromboembolia polmonare risoltasi in seguito agli interventi del caso. Da gennaio 2021 il paziente non si è più presentato per il monitoraggio.

Infine, si riporta il caso della signora F. R. M., di 74 anni, che ha eseguito il test in seguito alla diagnosi di adenocarcinoma del retto inferiore e quindi alla pianificazione di un trattamento neoadiuvante a base di capecitabina alla dose di 1650 mg/mq/die e radioterapia.

La paziente presentava in anamnesi: fibrillazione atriale cronica in terapia con flecainide, farmaco antiaritmico della classe 1C di Vaughan-Williams, alla dose di 50 mg due volte al giorno e bisoprololo 5 mg/die e con farmaco anticoagulante ad azione diretta rivaroxaban 20 mg/die; ipertensione arteriosa in terapia con Olprezide® (associazione a dose fissa tra olmesartan medoxomil, un sartano, e idroclorotiazide, un diuretico tiazidico) 40/12.5 mg/die; ipertiroidismo, trattato in passato con tiroidectomia e, quindi, in terapia sostitutiva con Eutirox® 100 mcg per 4 giorni/settimana e 125 mcg per i restanti 3 giorni/settimana, e infine omeprazolo 10 mg/die.

L'analisi genetica ha dimostrato la positività per la mutazione c.1905+1G>A (IVS14+1G>A) DPYD*2A in eterozigosi, che ha portato in sede di consulenza farmacologica ad una riduzione della dose iniziale di 1650 mg/mq/die (1.79 mq) al 50% del previsto, ossia a 825 mg/mq/die, corrispondenti a 1450 mg/die.

In questo caso, considerando i trattamenti farmacologici concomitanti, la valutazione farmacologica ha evidenziato alcune possibili interazioni di tipo PK/PD clinicamente rilevanti e degne di nota, tra capecitabina e i farmaci assunti dalla signora.

La prima interazione riguarda l'associazione di capecitabina e inibitori della pompa protonica (PPI), già in precedenza descritta; è altamente sconsigliato l'uso concomitante di PPI e capecitabina, infatti l'aumento del pH gastrico dovuto alla co-somministrazione di PPI (nel caso in oggetto, omeprazolo) riduce l'assorbimento gastrointestinale di capecitabina con un possibile minor beneficio clinico. Se il PPI non può essere interrotto a causa della gravità dei sintomi gastrointestinali, si suggeriscono regimi a base di fluorouracile per via endovenosa invece di capecitabina per *os*.

Inoltre, omeprazolo è notoriamente substrato ed inibitore degli enzimi microsomiali, in particolare dei citocromi CYP2C19 e 3A4; nel nostro caso non vi era ragione (assenza di appropriatezza terapeutica) per la prescrizione di un PPI e tanto meno di omeprazolo; infatti, l'inibizione competitiva del CYP3A4, esercitata da parte dell'omeprazolo, può influenzare il metabolismo di primo passaggio di diversi farmaci (tra i quali ad esempio il rivaroxaban assunto dalla paziente, con un rischio aumentato di sanguinamento).

Poiché omeprazolo, esomeprazolo e probabilmente lansoprazolo, hanno un notevole potenziale di causare interazioni farmacologiche, qualora sia ritenuta necessaria la gastroprotezione si dovrebbero scegliere pantoprazolo o rabeprazolo che non sembrano esercitare un rilevante effetto inibitorio sul metabolismo citocromo-dipendente di altri

farmaci e si associano quindi ad una minore incidenza di interazioni farmacologiche e reazioni avverse farmaco-correlate (ADR).

Tra le ADR correlate al trattamento con capecitabina, oltre al già riportato rischio di cardiotoxicità, si sottolineano alterazioni elettrolitiche, quali ipokaliemia e ipomagnesemia (ADR comune $[\geq 1/100, < 1/10]$); l'associazione tra flecainide, farmaco antiaritmico di classe I e il beta-bloccante bisoprololo, non raccomandata ma certamente prescritta e ritenuta idonea per la paziente da uno specialista cardiologo, consente di esercitare un rilevante effetto inotropo negativo ed un allungamento del tempo di conduzione atrioventricolare; tale associazione non è raccomandata in caso di disionia.

Quindi la consulenza farmacologica, oltre a suggerire la riduzione della dose di capecitabina per la presenza della variante c.1905+1G>A (IVS14+1G>A) DPYD*2A in eterozigosi, ha suggerito una razionalizzazione di tutta la terapia assunta dalla paziente ritenendo necessaria la deprescrizione di omeprazolo, del quale non se ne ravvedeva l'utilità nel caso in specie considerata la non gastro-lesività della terapia in atto e a fronte della evidenza di interazioni tra farmaci e, previa consulenza cardiologica, la rivalutazione della terapia antiipertensiva e antiaritmica, con particolare riguardo al rischio di disionia.

La paziente durante il periodo di follow up non ha manifestato alcuna tossicità farmaco-relata, risulta in attesa di intervento di resezione del retto.

CONCLUSIONI

Grazie alle nuove scoperte scientifiche derivanti dal Progetto Genoma Umano (HGP, Human Genome Project) la disciplina della Farmacologia Clinica sta ampliando esponenzialmente i suoi ambiti di influenza. L'interesse crescente nei settori di farmacogenetica e genomica sta portando allo sviluppo di nuove strategie di gestione delle cure al fine di supportare il SSN nella razionalizzazione della terapia farmacologica, coniugando la riconciliazione terapeutica, al netto dei criteri imprescindibili di efficacia e sicurezza delle cure, al risparmio nella spesa farmaceutica corrente.

Tutto ciò comporta non solo benefici indiretti sulla durata e soprattutto sulla qualità della vita dei pazienti, che vengono trattati farmacologicamente in maniera personalizzata e sulla base delle proprie singolari caratteristiche genetiche e fenotipiche, ma anche una riduzione dei costi per il Sistema Sanitario: l'applicazione di questo test può, infatti, avere un profilo di costo-efficacia favorevole in quanto i costi diretti del test sarebbero ammortizzati dai costi legati alle reazioni avverse evitate.

Soprattutto in ambito oncologico fattori genetici vengono sempre più spesso correlati al fenotipo della risposta al farmaco. In questo scenario la combinazione fra test farmacogenetici ed il monitoraggio terapeutico dei farmaci (TDM) può rappresentare un approccio innovativo funzionale all'individuazione del miglior regime terapeutico in grado di massimizzare l'efficacia e la sicurezza di classi di farmaci in specifiche popolazioni di pazienti.

L'indice terapeutico della maggior parte degli agenti citotossici è purtroppo ancora oggi un elemento critico di sicurezza del trattamento, perché l'attività farmacologica contro le cellule tumorali è quasi invariabilmente associata a fenomeni di tossicità nei confronti dei tessuti sani. In quest'ottica il TDM, attraverso la dimostrazione di interazioni PK/PD con il sequenziamento delle varianti alleliche, è in grado di correlare la chemiosensibilità o la tolleranza al farmaco, ai diversi profili di espressione fenotipica e, pur nelle difficoltà tecniche ed organizzative, sembra quindi essere una chiara necessità da applicare nella normale pratica clinica.

L'approccio integrato del farmacologo clinico al singolo paziente pare quindi consentire, attraverso l'analisi farmacogenetica, di identificare i fattori genetico-molecolari predittivi

della tossicità ai farmaci antitumorali e quindi di stratificare i pazienti in base alla loro probabilità di incorrere in un insuccesso terapeutico o in una tossicità acuta in seguito a trattamento chemioterapico, portando ad una vera personalizzazione della terapia e ad un miglioramento della qualità di vita del malato.

BIBLIOGRAFIA

1. L.L. Bruton, R. Hilal-Dandan, B.C. Knollmann. *Goodman&Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. s.l. : McGraw-Hill Education, 2018. 978-1-25-958474-9.
2. *A History of Cancer Chemotherapy*. Chu, T. DeVita Jr. e Edward. 21, s.l. : Cancer Res, 2008 nov 1, Vol. 68(21):8643-53. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6611.
3. Sneader, Walter. *Drug Discovery: A History*. s.l. : John Wiley and Sons, 2005. ISBN:9780471899792 DOI:10.1002/0470015535.
4. *THE SYNTHESIS OF 5-FLUOROPYRIMIDINES*. Robert Duschinsky, Edward Plevin, and Charles Heidelberger. s.l. : Journal of the American Chemical Society, 1957, Vol. 79 (16), 4559-4560. DOI: 10.1021/ja01573a087.
5. capecitabine. *pubchem.ncbi.nlm.nih.gov*. [Online] 24 6 2005. [Riportato: 13 3 2021.] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Capecitabine>.
6. tegafur. *pubchem.ncbi.nlm.nih.gov*. [Online] 25 3 2005. [Riportato: 13 3 2021.] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tegafur>.
7. fluorouracile, riassunto caratteristiche prodotto. *farmaci.agenziafarmaco.gov.it*. [Online] 15 8 2020. [Riportato: 13 3 2021.] https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer_003786_042291_RCP.pdf&retry=0&sys=m0b113.
8. aifa. *riassunto delle caratteristiche prodotto tegafur*. s.l. : aifa, 2020.
9. Alex Sparreboom, Walter J. Loos, Maja J.A. de Jonge, Jaap Verweij. CHAPTER 18 - CLINICAL TRIAL DESIGN: INCORPORATION OF PHARMACOKINETIC, PHARMACODYNAMIC, AND PHARMACOGENETIC PRINCIPLES. [aut. libro] Bruce C. Baguley and David J. Kerr. *Anticancer Drug Development*. s.l. : Academic Press, 2002.
10. *Medicinali contenenti 5-fluorouracile (i.v.), capecitabina e tegafur: test pre-trattamento per*. s.l. : aifa, 25 maggio 2020.
11. *international reporting of adverse drug reactions*. CIOMS. ginevra : s.n., 1987.

12. *Adverse effects of 5-fluorouracil: Focus on rare side effects.* Sonia Amin Thomas, Zhuliet Grami, Sharvil Mehta, Kushal Patel. 3: e1266, Vol. Cancer Cell and Microenvironment. doi: 10.14800/ccm.1266.
13. *5-Fluorouracil-induced changes of intestinal integrity biomarkers in BALB/c mice.* Song MK, Park MY, Sung MK. s.l. : J Cancer Prev, 2013 Dec, Vol. 18(4):322-9. doi: 10.15430/jcp.2013.18.4.322. PMID: 25337561; PMCID: PMC4189444.
14. *Possible involvement of oxidative stress in 5-fluorouracil-mediated myelosuppression in mice.* Numazawa S, Sugihara K, Miyake S, Tomiyama H, Hida A, Hatsuno M, Yamamoto M, Yoshida T. s.l. : Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2011 Jan, Vol. 108(1):40-5. doi: 10.1111/j.1742-7843.2010.00621.x. Epub 2010 Aug 16. PMID: 20722640..
15. *Management of cytotoxic chemotherapy-induced hand-foot syndrome.* Kwakman JJM, Elshot YS, Punt CJA, Koopman M. s.l. : Oncol Rev, 2020 May 13, Vol. 14(1):442. doi: 10.4081/oncol.2020.442. PMID: 32431787; PMCID: PMC7232019.
16. *5-fluorouracil induced cardiotoxicity: review of the literature.* Sorrentino MF, Kim J, Foderaro AE, Truesdell AG. s.l. : Cardiol J, 2012, Vol. 19(5):453-8. doi: 10.5603/cj.2012.0084. PMID: 23042307.
17. *Fluorouracil-induced Hyperammonemia in a Patient with Colorectal Cancer.* Thomas SA, Tomeh N, Theard S. s.l. : Anticancer Res, 2015 Dec, Vol. 35(12):6761-3. PMID: 26637893.
18. *Intermediate Dose 5-Fluorouracil-Induced Encephalopathy.* Yeon-A Kim, Hyun Cheol Chung, Hye Jin Choi, Sun Young Rha, Jin Sil Seong, Hei-Cheul Jeung. 1-pages55-59, s.l. : Japanese Journal of Clinical Oncology, January 2006, Vol. 36. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyi214>.
19. *The NCI Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v 3.0 is the new standard for oncology clinical trials.* Setser, A. D. Colevas and A. 22:14_suppl, 2004, Vol. Journal of Clinical Oncology. DOI: 10.1200/jco.2004.22.90140.6098.
20. *The clinical relevance of multiple DPYD polymorphisms on patients candidate for fluoropyrimidine based-chemotherapy. An Italian case-control study.* Iachetta, F., Bonelli, C., Romagnani, A. et al. 120, pages834–839, 2019, Vol. British Journal of Cancer. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0423-8>.

21. *The use of single-nucleotide polymorphism maps in pharmacogenomics.* McCarthy, J., Hilfiker, R. s.l. : Nat Biotechnol, 2000, Vol. 18, 505–508. <https://doi.org/10.1038/75360>.
22. *Small insertions and deletions (INDELs) in human genomes.* Julienne M. Mullaney, Ryan E. Mills, W. Stephen Pittard, Scott E. Devine. R2 Pages R131–R136, s.l. : Human Molecular Genetics, 15 October 2010, Vol. 19. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq400>.
23. *Large multiallelic copy number variations in humans.* Handsaker, R., Van Doren, V., Berman, J. et al. pages 296–303, s.l. : Nat Genet, 2015, Vol. 47. <https://doi.org/10.1038/ng.3200>.
24. *Familial deficiency of dihydropyrimidine dehydrogenase. Biochemical basis for familial pyrimidinemia and severe 5-fluorouracil-induced toxicity.* Diasio RB, Beavers TL, Carpenter JT. 81(1):47-51, 1988 jan, Vol. J Clin Invest. doi: 10.1172/JCI113308. PMID: 3335642; PMCID: PMC442471..
25. *Relationship between dihydropyrimidine dehydrogenase activity and plasma 5-fluorouracil levels with evidence for circadian variation of enzyme activity and plasma drug levels in cancer patients receiving 5-fluorouracil by protracted continuous infusion.* Harris BE, Song R, Soong SJ, Diasio RB. s.l. : cancer res, 1990 jan 1, Vol. 50(1):197-201. PMID: 2293556..
26. *Nomenclature for human DPYD alleles. Pharmacogenetics.* McLeod HL, Collie-Duguid ES, Vreken P, Johnson MR, Wei X, Sapone A, Diasio RB, Fernandez-Salguero P, van Kuilenberg AB, van Gennip AH, Gonzalez Fj. 1998 dec, Vol. 8(6):455-9. doi: 10.1097/00008571-199812000-00001. PMID: 9918128..
27. *Sorivudine and 5-fluorouracil; a clinically significant drug-drug interaction due to inhibition of dihydropyrimidine dehydrogenase.* Diasio, Robert B. s.l. : British journal of clinical pharmacology, 1998, Vol. 46(1): 1–4. doi: 10.1046/j.1365-2125.1998.00050.x. PMID: 9690942; PMCID: PMC1873978..
28. *Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and fluorouracil-related toxicity.* Milano G, Etienne MC, Pierrefite V, Barberi-Heyob M, Deporte-Fety R, Renée N. s.l. : Br J Cancer, 1999 Feb, Vol. 79(3-4):627-30. doi: 10.1038/sj.bjc.6690098. PMID: 10027340; PMCID: PMC2362417.
29. *Safe administration of irinotecan, oxaliplatin and raltitrexed in a DPD-deficient patient with metastatic colon cancer.* Volk J, Reinke F, van Kuilenburg AB, van Gennip

AH, Schlichting C, Ganser A, Schöffski P. s.l. : Ann Oncol, 2001 Apr, Vol. 12(4):569-71. doi: 10.1023/a:1011178111295. PMID: 11398894..

30. *The role of pharmacogenetics and pharmacogenomics in cancer chemotherapy with 5-fluorouracil.* Diasio RB, Johnson MR. s.l. : Pharmacology, 2000 Sep, Vol. 61(3):199-203. doi: 10.1159/000028401. PMID: 10971206..

31. *A pharmacokinetic-based test to prevent severe 5-fluorouracil toxicity.* Bocci G, Barbara C, Vannozzi F, Di Paolo A, Melosi A, Barsanti G, Allegrini G, Falcone A, Del Tacca M, Danesi R. s.l. : Clin Pharmacol Ther, 2006 Oct, Vol. 80(4):384-95. doi: 10.1016/j.clpt.2006.06.007. PMID: 17015056..

32. *DPD-based adaptive dosing of 5-FU in patients with head and neck cancer: impact on treatment efficacy and toxicity.* Yang CG, Ciccolini J, Blesius A, Dahan L, Bagarry-Liegey D, Brunet C, Varoquaux A, Frances N, Marouani H, Giovanni A, Ferri-Dessens RM, Chefrour M, Favre R, Duffaud F, Seitz JF, Zanaret M, Lacarelle B, Mercier C. s.l. : Cancer Chemother Pharmacol, 2011 Jan, Vol. 67(1):49-56. doi: 10.1007/s00280-010-1282-4. Epub 2010 Mar 5. PMID: 20204365..

33. *Relationship between Single Nucleotide Polymorphisms and Haplotypes in DPYD and Toxicity and Efficacy of Capecitabine in Advanced Colorectal Cancer.* Maarten J. Deenen, Jolien Tol, Artur M Burylo, Valerie D. Doodeman, Anthonius de Boer, Andrew Vincent, Henk-Jan Guchelaar, Paul H.M. Smits, Jos H. Beijnen, Cornelis J.A. Punt, Jan H.M. Schellens and Annemieke Cats. 10, s.l. : clinical cancer research, May 2011, Vol. 17. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2209.

34. *Safety, pharmacokinetics (PK), and cost-effectiveness of upfront genotyping of DPYD in fluoropyrimidine therapy.* M. J. Deenen, A. Cats , M. K. Sechterberger , J. L. Severens , P. H. M. Smits , R. BakkerC. M. Mandigers , M. Soesan , J. H. Beijnen , J. H. M. Schellens. 15_suppl (May 20, 2011) 3606-3606., s.l. : Journal of Clinical Oncology, 2011, may 20, Vol. 29. DOI: 10.1200/jco.2011.29.15_suppl.3606.

35. *Prevention of 5-FU-induced health-threatening toxicity by pretherapeutic DPD deficiency screening: Medical and economic assessment of a multiparametric approach.* Michele Boisdron-Celle, Olivier Capitain et all. 15_suppl (May 20, 2013) 3601-3601, s.l. : Journal of Clinical Oncology, 2013, may 20, Vol. 31. DOI: 10.1200/jco.2013.31.15_suppl.3601.

36. *Upfront Genotyping of DPYD*2A to Individualize Fluoropyrimidine Therapy: A Safety and Cost Analysis*. Deenen MJ, Meulendijks D, Cats A, Sechterberger MK, Severens JL, Boot H, Smits PH, Rosing H, Mandigers CM, Soesan M, Beijnen JH, Schellens JH. s.l. : J Clin Oncol, 2016 Jan 20, Vol. 34(3):227-34. doi: 10.1200/JCO.2015.63.1325. Epub 2015 Nov 16. PMID: 26573078..
37. *Prospective DPYD genotyping to reduce the risk of fluoropyrimidine-induced severe toxicity: Ready for prime time*. Lunenburg CATC, Henricks LM, Guchelaar HJ, Swen JJ, Deenen MJ, Schellens JHM, Gelderblom H. s.l. : Eur J Cancer, 2016 Feb, Vol. 54:40-48. doi: 10.1016/j.ejca.2015.11.008. Epub 2015 Dec 21. PMID: 26716401..
38. *Dihydropyrimidine dehydrogenase pharmacogenetics for predicting fluoropyrimidine-related toxicity in the randomised, phase III adjuvant TOSCA trial in high-risk colon cancer patients*. Ruzzo A, Graziano F, Galli F, Galli F, Rulli E, Lonardi S, Ronzoni M, Massidda B, Zagonel V, Pella N, Mucciarini C et al. s.l. : Br J Cancer, 2017 Oct 24, Vol. 117(9):1269-1277. doi: 10.1038/bjc.2017.289. Epub 2017 Aug 24. PMID: 29065426; PMCID: PMC5709672.
39. *Fluorouracil Therapy and DPYD Genotype*. Dean L, Kane M. s.l. : Pratt VM, Scott SA, Pirmohamed M, Esquivel B, Kane MS, Kattman BL, Malheiro AJ, editors. Medical Genetics Summaries [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012–, 2016 Nov 3 [updated 2021 Jan 11]. PMID: 28520376..
40. *DPYD genotype-guided dose individualisation of fluoropyrimidine therapy in patients with cancer: a prospective safety analysis*. Henricks LM, Lunenburg CATC, de Man FM et al. s.l. : Lancet Oncol, 2018 Nov, Vol. 19(11):1459-1467. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30686-7. Epub 2018 Oct 19. PMID: 30348537.
41. *Effectiveness and safety of reduced-dose fluoropyrimidine therapy in patients carrying the DPYD*2A variant: A matched pair analysis*. Henricks LM, van Merendonk LN, Meulendijks D, et al. s.l. : International Journal of Cancer, 2019 May, Vol. 144(9):2347-2354. DOI: 10.1002/ijc.32022.
42. *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for Dihydropyrimidine Dehydrogenase Genotype and Fluoropyrimidine Dosing: 2017 Update*. Amstutz U, Henricks LM, Offer SM, Barbarino J, Schellens JHM, Swen JJ, Klein TE,

McLeod HL, Caudle KE, Diasio RB, Schwab M. s.l. : Clin Pharmacol Ther, 2018 Feb, Vol. 103(2):210-216 Epub 2017 Nov 20. PMID: 29152729; PMCID: PMC5760397.

43. *Translating DPYD genotype into DPD phenotype: using the DPYD gene activity score.* Henricks LM, Lunenburg CA, Meulendijks D, Gelderblom H, Cats A, Swen JJ, Schellens JH, Guchelaar HJ. s.l. : Pharmacogenomics, 2015, Vol. 16(11):1277-86. doi: 10.2217/pgs.15.70. Epub 2015 Aug 12. PMID: 26265346.

44. Stefania Gori, Giuseppe Aprile, Saverio Cinieri, Giuseppe Altavilla, Roberto Bordonaro,. *Raccomandazioni 2019 per analisi farmacogenetiche.* s.l. : Gruppo di lavoro AIOM - SIF, 2019 ottobre.

45. PRAC. *Nuovi test di laboratorio e raccomandazioni per il trattamento per i medicinali fluorouracile, capecitabina, tegafur e flucitosina.* s.l. : EMA, 13 March 2020. EMA/125891/2020.

46. *DPYD*6 plays an important role in fluoropyrimidine toxicity in addition to DPYD*2A and c.2846A>T: a comprehensive analysis in 1254 patients.* Del Re, M., Cinieri, S., Michelucci, A. et al. s.l. : Pharmacogenomics J, 2019, Vol. 19, 556–563. <https://doi.org/10.1038/s41397-019-0077-1>.

47. The Complete Drug Reference - MedicinesComplete © Royal Pharmaceutical Society 2020. Ultimo aggiornamento 05-02-2021