

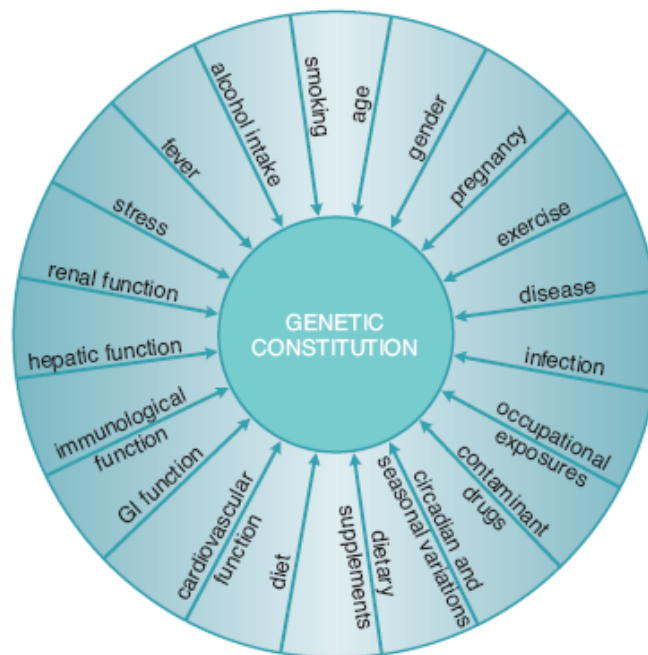
## ***1. Introduzione***

Negli ultimi anni, farmaci innovativi e nuovi protocolli di somministrazione di composti antitumorali hanno significativamente migliorato sia l'efficacia clinica che la tollerabilità della chemioterapia antineoplastica. Nonostante tali progressi, la variabilità osservata nella risposta terapeutica e la tossicità cui vanno incontro i pazienti sono ancora elevate. Pazienti con tumori apparentemente identici per istotipo e grado non sempre rispondono ugualmente allo stesso trattamento, dimostrando così la limitata capacità dei fattori prognostici attualmente disponibili nel predire l'efficacia o meno delle terapie. Attualmente il tipo di terapia antineoplastica viene scelto sulla base dell'istologia e di alcuni marcatori biologici del tumore, non considerando o considerando solo in parte la sua complessa base genetica che è individuale e che ne condiziona la possibile risposta del paziente al trattamento terapeutico. È chiaro come lo studio del profilo genetico dell'ospite, il paziente oncologico, sia altrettanto importante allo scopo di limitare eventuali fallimenti terapeutici o la comparsa di tossicità elevata. Un esempio è dato dalla terapia del carcinoma del colon retto, dove oggi trova largo impiego l'uso di Irinotecano in associazione con il 5-Fluorouracile (5-FU) e acido folinico, e dove la variabilità interindividuale nella risposta terapeutica e nello sviluppo di tossicità in seguito ai trattamenti con tali chemioterapici sembra essere correlata a varianti genetiche degli enzimi UDP-glucuronosiltrasferasi (UGT) e diidropirimidina deidrogenasi (DPD). Pertanto il seguente studio si è proposto di analizzare la presenza delle varianti alleliche UGT1A1\*28 della UDP-glucuronosiltrasferasi e DPYD\*2A della diidropirimidina deidrogenasi in soggetti siciliani con tumore colon rettale sottoposti a trattamento con Irinotecano e 5-Fluorouracile, per verificare per la prima volta la loro frequenza in una popolazione siciliana, correlando anche il diverso genotipo dei soggetti con gli eventuali effetti tossici manifestati nel corso della terapia.

## 1.1 Farmacogenetica

### *Variabilità individuale e polimorfismi genetici*

Tra i diversi fattori che influenzano la risposta ai farmaci oltre i parametri farmacocinetici e farmacodinamici, l'età, il sesso, le abitudini di vita, la presenza di altre patologie nell'individuo, l'esposizione a fattori ambientali, le possibili interazioni in caso di terapie concomitanti, i fattori genetici sono una causa primaria della normale variabilità degli effetti dei farmaci e sono responsabili di numerose e importanti differenze quantitative o qualitative dell'attività dei farmaci tra diversi pazienti (Fig. 1) (Vesell ES, 1991).



**Fig. 1** Fattori esogeni ed endogeni che contribuiscono alla variabilità della risposta farmacologica

Dell'importanza dell'influenza dei fattori genetici si occupa una nuova disciplina, la **farmacogenetica**, la quale studia le correlazioni esistenti tra il genotipo di un individuo e il fenotipo che, nel caso di un trattamento farmacologico, è proprio la risposta al farmaco. La variabilità di risposta alle molecole che vengono somministrate si manifesta sia in termini di mancata o solo parziale efficacia, sia per la comparsa di più o meno gravi effetti avversi, per cui mentre un determinato principio attivo può essere benefico e innocuo per alcuni soggetti, per altri può rivelarsi non solo inutile ma addirittura letale. Basti pensare che le reazioni

avverse da farmaci negli Stati Uniti sono tra la 4° e la 6° causa di morte della popolazione. I primi studi di genetica, effettuati su gruppi di famiglie o coppie di gemelli, hanno sottolineato l'importanza dei polimorfismi di proteine nel modulare la risposta ai farmaci, evidenziando come polimorfismi più comuni quelli dovuti ad alterazione di un singolo nucleotide (SNP).

Il patrimonio genetico di ogni individuo, che si esprime quindi fenotipicamente nella struttura, configurazione e concentrazione delle sue proteine, può modificare l'azione di un farmaco attraverso molteplici meccanismi. Per esempio anomalie a carico di enzimi coinvolti nel metabolismo dei farmaci possono o rallentare l'inattivazione e l'eliminazione di alcuni farmaci, aumentando il rischio di effetti tossici a dosi terapeutiche standard (possibile accumulo ed aumento di effetti indesiderati, tossicità da sovradosaggio, reazioni avverse inattese o idiosincrasiche) o aumentare il metabolismo del farmaco causando una risposta inefficace; anche il metabolismo di un profarmaco può essere diminuito (inefficacia) o aumentato (possibile tossicità da sovradosaggio) così come il "bersaglio" del farmaco può essere modificato, aumentato o diminuito con alterazioni dell'efficacia del farmaco e reazioni avverse inattese; infine differenze strutturali, geneticamente determinate, delle proteine ematiche potrebbero modificare le affinità di legame del farmaco alle proteine stesse (alterazione quota libera-legata).

Gli obiettivi perseguiti dalla farmacogenetica sono: identificare le variazioni geneticamente controllate nella risposta ai farmaci; studiare i meccanismi molecolari che determinano queste variazioni; valutare la loro rilevanza clinica; sviluppare metodologie diagnostiche semplici e affidabili che consentano l'identificazione degli individui sensibili prima della somministrazione del farmaco (Rossi F. et al, 2005).

La farmacogenetica è stata inizialmente definita come "lo studio della variabilità di risposta individuale al farmaco legata all'ereditarietà e alle caratteristiche genetiche personali e familiari". Durante l'ultima decade il termine farmacogenomica ha ulteriormente affinato tale definizione delineando con più precisione i campi e le finalità di questo nuovo ambito scientifico. L'obiettivo è sviluppare e utilizzare nuove terapie farmacologiche personalizzate, più efficaci e meno dannose, utilizzando le scoperte sul genoma umano (Muller M., 2003).

Pur occupandosi della stessa materia, la farmacogenetica e la **farmacogenomica** la affrontano con metodi e obiettivi sostanzialmente diversi, tanto che la distinzione tra le due branche è dovuta proprio ad un'evoluzione dell'una, la farmacogenetica, verso l'altra, a seguito dei progressi della genetica, non ultimo il sequenziamento del DNA (Vesell ES., 2000). Il graduale raggiungimento di questi obiettivi è infatti reso possibile dai continui miglioramenti della tecnologia del DNA ricombinante e dal fatto che i principi generali della genetica possono essere applicati anche ai geni che codificano per le proteine coinvolte nell'azione dei farmaci. Pertanto nell'ambito di una intera popolazione: 1) le variazioni alleliche sono comuni; 2) esistono per ciascun locus genetico numerosi alleli diversi che producono numerose varianti della stessa proteina; 3) alcune varianti alleliche sono "silenti", quindi prive di effetti funzionali, mentre altre possono modificare notevolmente il destino dei composti esogeni nell'organismo; 4) le frequenze geniche dei differenti alleli variano molto spesso secondo la razza con possibile variazione della farmacocinetica o della farmacodinamica da un'etnia ad un'altra; 5) alcune varianti alleliche sono classificate come "**polimorfismi genetici**" se mostrano una frequenza di espressione uguale o superiore all'1%, mentre altre varianti, meno frequenti, vengono classificate come "alterazioni genetiche rare".

Le conseguenze prodotte dai polimorfismi dipendono dalla sede genica in cui si verificano. Se cadono nelle regioni di regolazione dell'espressione dei geni possono influenzare l'attività trascrizionale dei geni e quindi la quantità dei prodotti genici. Sostituzioni nucleotidiche possono verificarsi nelle regioni codificanti dei geni (*esoni*) e possono causare la sostituzione di un aminoacido nella proteina codificata, influenzando quindi la funzionalità della proteina stessa o la sua stabilità. In altri casi i polimorfismi, pur verificandosi nella parte tradotta di un gene, non producono la sostituzione dell'aminoacido corrispondente e sono detti silenti. Questi ultimi polimorfismi sono molto più frequenti di quelli che inducono sostituzioni aminoacidiche, che possono venire eliminati per selezione naturale quando producono varianti deleterie (Goodman & Gilman, 2006).

Altri polimorfismi possono verificarsi nelle parti non codificanti dei geni o introni e possono risultare in difetti nel processamento degli RNA messaggeri o nella loro stabilità. Infine polimorfismi si trovano nelle regioni comprese tra i geni. Poiché dunque solo una piccola parte dei polimorfismi altera direttamente le sequenze

delle proteine, le varianti genetiche che possono contribuire alle diversità strutturali delle proteine umane sono solo migliaia e non milioni.

Il termine polimorfismo viene esteso ai casi di cambiamento nella sequenza del DNA: negli **RFLP** (Restriction Fragment Length Polymorphism) per indicare differenze nelle lunghezze dei frammenti di restrizione causate da perdita o guadagno di siti di restrizione nel DNA, nelle delezioni o inserzioni di DNA, nelle ripetizioni di gruppi nucleotidici nei microsatelliti e minisatelliti (**VNTR**-Variable Number of Tandem Repeats), nelle ripetizioni di trinucleotidi, nelle mutazioni puntiformi (**SNP**-Single Nucleotide Polymorphism), etc.

Diversi studi hanno evidenziato come polimorfismo più comune quello dovuto ad alterazione di un singolo nucleotide (SNP) il quale porta all'alterazione di un'unica base nella sequenza genomica; tale evento nel genoma umano si verifica approssimativamente ogni 1000 basi (Stephens et al, 2001).

Gli SNP possono colpire esoni (l'effetto potrà essere il cambiamento nella sequenza aminoacidica o meno), introni (probabilmente causando l'inserzione di siti di splicing alternativi) o le regioni regolatorie (con la conseguente alterazione dell'espressione genica). In termini di funzione proteica, tali alterazioni nella sequenza del DNA modificano o inibiscono la normale attività di un gene o della proteina codificata, determinando una abnorme risposta (resistenza del tumore o tossicità del paziente) al farmaco.

### ***Polimorfismi a carico di geni del metabolismo dei farmaci***

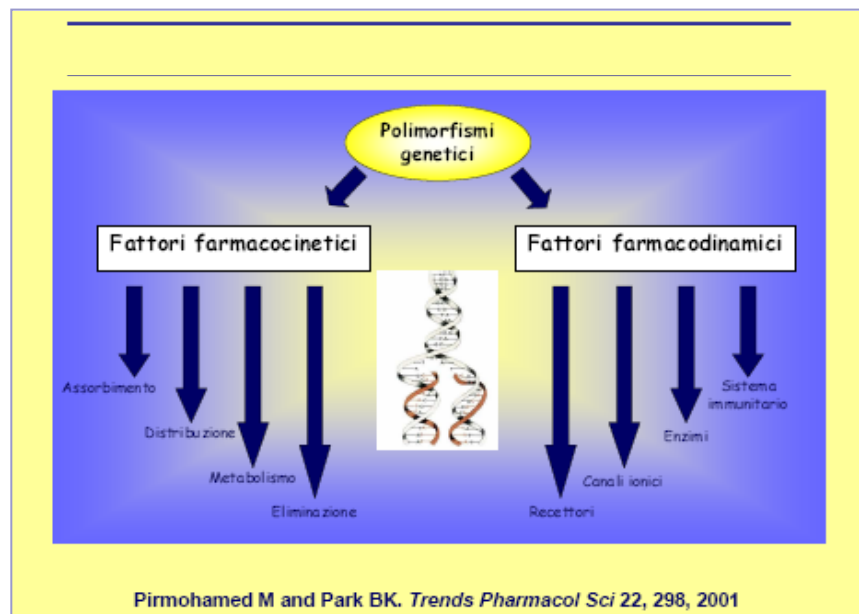
I polimorfismi genetici oggetto di studio della farmacogenetica sono quelli a carico di bersagli terapeutici, di trasportatori di membrana, di enzimi del metabolismo dei farmaci, cioè di tutti quei geni codificanti per proteine la cui alterata funzionalità determina una variabilità nella risposta ai farmaci.

Sostanzialmente è possibile dividere i geni responsabili della variabilità di risposta ai farmaci in due grossi gruppi:

- 1) geni che intervengono nella modulazione della farmacodinamica,
- 2) geni che intervengono nella modulazione della farmacocinetica.

Nell'ambito del primo gruppo possiamo elencare geni che codificano per proteine recettoriali, per trasportatori o per enzimi biosintetici, cioè geni che intervengono nel determinare il meccanismo d'azione del farmaco (Fig. 2).

Nel caso dei recettori possiamo avere alterazioni quantitative o qualitative di queste proteine, un esempio potrebbero essere le mutazioni a carico del recettore  $\beta_2$ -adrenergico, un recettore legato alla risposta bronchiale nell'asma, i cui polimorfismi portano ad un ridotto numero di recettori sulla membrana cellulare delle cellule del muscolo liscio dei bronchi con relativa ridotta risposta ai farmaci  $\beta_2$ -agonistici. Un altro esempio importante sono gli ormai noti polimorfismi genetici dell'esone 26 e dell'esone 21 (C3435T e G2677T) della P-glicoproteina (P-gp, ABCB1), una pompa d'efflusso, che nei portatori omozigoti si accompagnano a ridotti livelli di P-gp intestinale e a depressa funzione della stessa; proteine trasportatrici alterate possono causare una distribuzione del farmaco anomala e mancato assorbimento (Rossi F. et al, 2005).



**Fig. 2** Fattori farmacocinetici e farmacodinamici possibili bersagli di polimorfismi genetici

Al secondo gruppo appartengono in particolare i geni del metabolismo. La maggior parte dei farmaci è soggetta a processi di biotrasformazione e perciò le variazioni genetiche degli enzimi coinvolti nel metabolismo dei farmaci possono avere importanti implicazioni cliniche.

La biotrasformazione descrive il metabolismo del farmaco ad opera di specifici enzimi, detti appunto "farmaco-metabolizzanti". Questi enzimi si trovano in diversi distretti corporei, tra cui fegato, intestino, reni, polmoni, cute, plasma e sistema nervoso centrale ed hanno in linea di massima lo scopo di trasformare i

farmaci in molecole maggiormente solubili, e quindi, più facili da eliminare attraverso le urine.

Le reazioni di biotrasformazione si dividono in due grandi gruppi:

- Reazioni di fase I o "non sintetiche" o di funzionalizzazione: si compongono prevalentemente di reazioni di ossidoriduzione e di idrolisi che inseriscono o liberano gruppi funzionali; le prime avvengono principalmente nel reticolo endoplasmatico liscio degli epatociti ad opera dei diversi isoenzimi del citocromo P450.
- Reazioni di fase II o "sintetiche": sono reazioni di coniugazione, mediate da diversi enzimi e cofattori, che aggiungono gruppi funzionali ai prodotti di fase I o altri composti allo scopo di renderli più facilmente eliminabili; le principali reazioni di fase II sono la coniugazione con acido glucuronico (o glucuronoconiugazione), l'acetilazione, la coniugazione con amminoacidi (soprattutto glicina, taurina e glutammina), la coniugazione con solfato (o solfoconiugazione) e la metilazione. Fra gli enzimi di fase II di interesse farmacogenetico vengono inclusi l'UDP-glucuronosiltrasferasi (UGT), la glutatione-S-transferasi (GST), e l'N-acetil-trasferasi (NAT).

Un numero relativamente piccolo di enzimi farmaco-metabolizzanti (DMEs) è responsabile del metabolismo della maggior parte degli agenti farmacologici oggi impiegate nell'uso clinico. Esiste un ristretto numero di polimorfismi rilevanti nell'ambito di questi enzimi, e molti di loro danno origine ad un mancato effetto terapeutico o ad un'esagerata risposta clinica al farmaco.

Il polimorfismo genetico negli enzimi farmaco-metabolizzanti (DMEs) consente di suddividere la popolazione in sottogruppi di individui con capacità metabolica individuale differente, distinguendosi per diversità apprezzabili nella loro capacità di svolgere determinate reazioni di biotrasformazione (Rossi F. et al, 2005).

Individui dotati di un efficiente metabolismo farmacologico vengono detti metabolizzatori rapidi (Extensive Metabolizers, EMs) e di solito presentano due alleli attivi del gene; individui con capacità di metabolizzazione dei farmaci estremamente ridotta o assente e per mutazione o delezione di entrambi gli alleli del gene, vengono detti metabolizzatori poveri (Poor Metabolizers, PMs); sono definiti metabolizzatori intermedi (Intermediate Metabolizer, IMs) individui che presentano un allele normale ed uno attivo del gene e possono richiedere, per



un'azione terapeutica ottimale, un dosaggio farmacologico inferiore alla norma; individui con un' aumentata espressione, dovuta ad una amplificazione genetica, a causa della quale possono richiedere, per un'azione terapeutica ottimale, un dosaggio farmacologico superiore alla norma, vengono detti metabolizzatori ultrarapidi (Ultrarapid Metabolizers, UMs).

Nel caso di enzimi soggetti a polimorfismo genetico il rischio di sviluppare reazioni avverse è più elevato nei pazienti con fenotipo PM, mentre negli individui EM o UM può verificarsi l'assenza dell'effetto terapeutico alle dosi di farmaco comunemente utilizzate, a causa della loro capacità di metabolizzare il farmaco in maniera molto rapida. Determinare quale sia il genotipo di un individuo può essere di notevole importanza non solo nel breve, ma anche nel lungo termine, in quanto il genotipo, come tutti i caratteri genetici, non è soggetto a cambiare nel corso dell'esistenza.

Tra i geni del metabolismo di fase I costituiscono principale esempio quelli che codificano per i sistemi enzimatici microsomiali, i citocromi P450 (tabella 1). Gli isoenzimi del citocromo P450 sono stati ampiamente studiati in vista dell'importante ruolo svolto nel metabolismo di numerosi farmaci e ne sono stati descritti circa 70 tipi di polimorfismo. Ad esempio per il CYP2D6, uno dei più importanti isoenzimi coinvolti nel metabolismo ossidativo dei farmaci, è stato individuato un polimorfismo genetico, per cui è possibile distinguere nella popolazione almeno due fenotipi: metabolizzatori lenti (PM) e metabolizzatori rapidi (EM). La precisa base molecolare del difetto sembra essere un'alterata espressione della proteina P450 che comporta la scarsità o l'assenza dell'isoenzima necessario. Più recentemente è stato segnalato un ulteriore genotipo polimorfico caratterizzato da un metabolismo ultrarapido di farmaci specifici dovuto alla presenza di varianti alleliche 2D6 con fino a 13 copie di geni in tandem. Di conseguenza, in questi casi saranno necessarie dosi giornaliere di farmaco più alte per il raggiungimento di livelli plasmatici terapeutici. L'enzima CYP2D6 è responsabile della conversione della codeina in morfina. La presenza di un polimorfismo genetico può spiegare la variabilità nella risposta clinica di soggetti diversi alla stessa dose di codeina. Alcuni di quei pazienti che non riescono ad ottenere un miglioramento di una sintomatologia algica con la codeina sono metabolizzatori lenti per il CYP2D6, incapaci di trasformare il farmaco nel suo più potente prodotto, la morfina.

**Tabella 1.** Esempi di geni la cui variabilità è associata ad una variazione nella risposta ai farmaci.

PROTEINA O GENE	FARMACI (ESEMPI)	ALTERAZIONI OSSERVATE (ESEMPI)
<i>Enzimi metabolizzanti farmaci</i>		
<b>CYP2C9</b>	Warfarin, tolbutamide, fenitoina, farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS)	Aumentato effetto anticoagulante del warfarin
<b>CYP2C19</b>	Omeprazolo	Aumentata efficacia antiulcera dell'omeprazolo
<b>CYP2D6</b>	Antidepressivi, antipsicotici, $\beta$ -bloccanti, codeina	Aumentata tossicità di antidepressivi, diminuita risposta analgesica alla codeina
<b>CYP3A4, 3A5, 3A7</b>	Ciclosporina, tacrolimo, bloccanti dei canali del calcio, lovastatina, tamoxifene, steroidi	Diminuita efficacia del tacrolimo nei trapianti d'organo
<b>Diidropirimidina deidrogenasi</b>	Fluorouracile	Aumentata tossicità
<b>UGT1A1</b>	Irinotecan	Aumentata tossicità gastrointestinale ed ematomidollare
<b>Tiopurina metiltransferasi (TPMT)</b>	Mercaptopurina, tioguanina, azatioprina	Aumentata tossicità ematomidollare

Altro esempio è costituito dai geni che codificano per gli isoenzimi dalla sottofamiglia del CYP3A. Sono state individuate più varianti alleliche di CYP3A4. L'efficacia della ciclosporina e del tacrolimus è fortemente influenzata dall'espressione di CYP3A5, altra isoforma epatica umana, marcatamente polimorfica. E' stato più volte riportato che i soggetti omozigoti per la variante polimorfica CYP3A5\*3, che causa splicing alternativo e la formazione di una proteina tronca e non funzionale, metabolizzerebbero meno efficacemente l'agente, richiedendo una dose più bassa per raggiungere i livelli terapeutici, rispetto a quelli che possiedono almeno una copia dell'allele wild type \*1 (CYP3A5\*1/\*1, CYP3A5\*1/\*3) e che sono considerati come esprimenti l'enzima (Thervet E et al, 2003; Macphee IA et al, 2005).

In particolare un nostro studio ha riguardato l'analisi dei polimorfismi del gene che codifica per l'isoenzima CYP3A5 e di quelli dell'esone 21 (G2677T) e 26 (C3435T) del gene MDR1, che codifica per la P-gp in pazienti sottoposti a trapianto di fegato e nei rispettivi donatori e in pazienti sottoposti a trapianto di rene trattati con tacrolimus. Il fine è stato di monitorare la terapia con l'immunosoppressore e valutare se il diverso genotipo dei pazienti arruolati potesse risultare determinante nelle variazioni dei livelli ematici del farmaco. Si è evidenziato un significativo effetto del genotipo di CYP3A5 nei donatori di fegato

e nei trapiantati renali nel condizionare la farmacocinetica dell'immunosoppressore. A parità di livelli circolanti di tacrolimus la dose giornaliera richiesta è risultata più elevata nei casi con almeno una copia dell'allele wild type \*1 rispetto agli omozigoti mutati \*3/\*3. Per quanto riguarda i polimorfismi del gene MDR1 dati della letteratura hanno suggerito che, nei soggetti omozigoti per l'allele variante C3435T nell'esone 26, si abbia una riduzione di circa due volte dell'espressione della P-glicoproteina intestinale (Hustert E et al, 2001; Sakaeda T et al, 2003). Sebbene questo polimorfismo sia sinonimo e dunque non causi alcuna modificazione del codice per la sequenza aminoacidica e direttamente della funzione della P-gp, esso sarebbe frequentemente in disequilibrio con altri polimorfismi non sinonimi tra cui G2677T all'esone 21. Così si potrebbe prevedere che la biodisponibilità di substrati della P-glicoproteina come il tacrolimus, possa essere influenzata dal polimorfismo C3435T all'esone 26; questa veduta è controversa e diversi lavori che hanno esaminato tale polimorfismo nel contesto di trapianti di rene, cuore o polmone, hanno escluso un suo ruolo significativo nel comportamento del tacrolimus (Goto M et al, 2002; Zheng H et al, 2004). I nostri dati sono in accordo con questo, precisando che la presenza dei polimorfismi a singolo nucleotide G2677T e C3435T non condiziona la dose necessaria per ottenere i livelli terapeutici target di tacrolimus sia nei riceventi che nei donatori di fegato. Diversamente nei trapiantati renali la presenza del polimorfismo dell'esone 21 è associato ad un aumento della dose necessaria per ottenere i livelli ematici ottimali di tacrolimus. Questo risultato contrasta quindi con i dati riportati in diversi studi dove sono i soggetti con genotipo wild type (G/G) a richiedere una dose giornaliera più elevata del farmaco. Tuttavia l'effetto rilevato dei polimorfismi del gene MDR1 sulla dose di tacrolimus è meno evidente rispetto a quello del polimorfismo CYP3A5\*3 (Provenzani A. et al, 2009; Provenzani A. et al, 2011).

Il CYP2C9 è l'isoenzima più rappresentato della sottofamiglia del CYP2C. Esso catalizza l'idrossilazione dell'S-enantiomero del farmaco anticoagulante warfarina, farmacologicamente più potente dell'enantiomero R, con formazione di metaboliti inattivi. L'inibizione di tale isoforma può pertanto portare a conseguenze clinicamente importanti. Per il CYP2C9 è stata dimostrata l'esistenza di polimorfismo genetico. Esistono due varianti di quest'enzima ben

caratterizzate e ciascuna con mutazioni nella sequenza aminoacidica responsabili di alterato metabolismo: l'allele citocromo P450 2C9\*2 codifica per una mutazione Arg144/Cys, con conseguente alterata interazione funzionale con la P450 riduttasi. L'altra variante allelica, P450 2C9\*3 codifica per un enzima che presenta la mutazione Ile359/Leu dotato di più bassa affinità per molti substrati. Di conseguenza gli individui portatori di quest'ultimo fenotipo presentano una tolleranza notevolmente ridotta all'anticoagulante warfarin, richiedono dosi più basse del farmaco e sono potenzialmente esposti ad un maggiore rischio di complicazioni emorragiche rispetto ai soggetti con attività metabolica normale.

L'enzima polimorfico CYP2C19 costituisce circa il 4% degli isoenzimi del CYP450 a livello epatico. Un esempio delle conseguenze del polimorfismo genetico di tale enzima è quello relativo al farmaco antimalarico proguanile. Il profarmaco inattivo viene biotrasformato a cicloguanile attivo dal CYP2C19. Nei soggetti PM per tale enzima, l'azione antimalarica del farmaco può essere quindi notevolmente diminuita o assente.

Tra i geni del metabolismo di fase II, un esempio molto significativo è dato dall'acetilazione di alcuni farmaci ad opera dell' N-acetiltransferasi (Rossi F. et al, 2005). Un numero considerevole di farmaci è substrato di questo enzima il farmaco più studiato è l'isoniazide, un antitubercolare che viene eliminato mediante tale reazione di fase II. In base al profilo genetico di questo enzima, la cui mutazione è ereditata in maniera autosomica recessiva, la popolazione è stata divisa in due gruppi, acetilatori rapidi (con enzima normale) ed acetilatori lenti (con enzima alterato). Test biochimici hanno confermato quanto era stato osservato dai test genetici, in quanto si è visto che gli individui acetilatori lenti hanno una aumentata concentrazione plasmatica del farmaco immodificato.

Un altro esempio classico, che riveste notevole rilevanza clinica, è rappresentato dal polimorfismo del gene tiopurina-S-metiltransferasi (TPMT), l'enzima responsabile della biotrasformazione di 6-mercaptopurina, 6-tioguanina e azatioprina, farmaci indicati per il trattamento della leucemia linfoblastica acuta nel bambino, malattie autoimmuni e trapianti. L'espressione fenotipica dell'enzima TPMT nei tessuti è influenzata da polimorfismi genetici che consentono la sintesi di una proteina con attività enzimatica normale, intermedia o assente, causando differenze individuali nella tossicità delle tiopurine e nella loro efficacia. La TPMT catalizza la S-metilazione delle tiopurine che sono

caratterizzate da un indice terapeutico ristretto. La principale forma di tossicità è rappresentata dalla mielosoppressione, che può essere letale. Individui omozigoti per TPMT\*3A (principale variante allelica nella popolazione caucasica, responsabile di un'attività enzimatica molto bassa) sono a rischio di mielosoppressione quando vengono trattati con dosi standard di tiopurine. Questi soggetti devono essere trattati con circa 1/10 della dose standard ed essere sottoposti a un monitoraggio accurato.

L'esistenza di varianti enzimatiche polimorfe può portare all'assenza dell'effetto atteso. Un esempio è dato dalla carenza dell'enzima ipoxantina guaninafosforibosiltrasferasi (HGPRT), appartenente alla via metabolica deputata al recupero delle purine. Questa carenza ereditata in modo recessivo con il cromosoma X, può essere completa (sindrome di Lesch-Nyhan) o incompleta (patologia gottosa, iperescrezione renale di acido urico). Mentre in condizioni normali la 6-mercaptopurina e l'azatioprina vengono convertite nei rispettivi nucleotidi, nei pazienti affetti da deficit di HGPRT non vengono metabolizzate e risultano perciò inefficaci anche se somministrate a dosi elevate.

Notevole importanza rivestono il polimorfismo a carico del gene che codifica per l'uridin-difosfo-glucuroniltrasferasi (UGT) di tipo 1A1 (UGT1A1\*28), associato ad una ridotta glucuronazione del metabolita attivo dell'Irinotecano e rischio di diarrea e tossicità midollare di grado elevato, e quello del gene della diidropirimidina deidrogenasi (IVS14+1G>A) associato invece ad elevata tossicità di grado 3-4 gastrointestinale ed ematologica (31-34% dei casi), talvolta letale (0.5% dei casi) in seguito a trattamento con 5-Fluorouracile. Di questi ultimi polimorfismi si parlerà più in dettaglio in seguito (paragrafo 1.3 e 1.4). La presenza di queste varianti polimorfiche contribuisce a sottolineare l'importanza del problema della variabilità individuale della risposta ai farmaci nella terapia dei tumori.

### ***Farmacogenetica in oncologia***

Negli ultimi anni numerose sono state le ricerche condotte per meglio definire il ruolo di innovativi approcci di carattere farmacogenetico/farmacogenomico per la personalizzazione delle terapie in campo oncologico.

A causa del ristretto indice terapeutico degli agenti utilizzati in terapia antitumorale, con intervallo limitato tra dose efficace e dose tossica, minime

variazioni nel metabolismo dei farmaci stessi potrebbero determinare effetti molto diversi, sia in termini di risposta che di tossicità.

Queste differenze di risposta possono essere, anche in questo caso, correlate in parte alla presenza di polimorfismi, che in condizioni normali non hanno alcun effetto, ma che in particolari condizioni di stress (come un prolungato trattamento chemioterapico) possono influire sulla biodisponibilità del farmaco. Pertanto gli studi di farmacogenetica risultano particolarmente utili per approfondire i caratteri genetici legati alla variabilità interindividuale nella risposta e nello sviluppo di tossicità ai trattamenti chemioterapici (Danesi R. et al, 2001).

Nell'individuazione e nel ricorso all'esecuzione di opportuni test genetici, potenzialmente utili nella selezione dei pazienti oncologici che con maggiore probabilità possano beneficiare di uno specifico trattamento chemioterapico, è importante tuttavia tenere in considerazione che non soltanto i polimorfismi del genoma del paziente, ma anche le varianti genetiche che caratterizzano le cellule neoplastiche possono influenzare la risposta ai farmaci antineoplastici.

I polimorfismi del genoma dell'ospite e del tumore regolano entrambi il trasporto, la ritenzione e l'efflusso dei farmaci antitumorali, determinandone il grado di penetrazione nel tessuto tumorale. L'efficacia della terapia può essere influenzata dalle caratteristiche genetiche soprattutto della cellula tumorale, in quanto il genoma del tumore possiede la maggioranza dei polimorfismi che influenzano l'aggressività tumorale e la sua farmaco-sensibilità o resistenza (ad esempio mutazioni di p53, del gene c-Kit, della Timidilato Sintetasi, ecc.); i polimorfismi del genoma dell'ospite rappresentano invece i principali determinanti del rischio di tossicità per il paziente (ad esempio polimorfismi dei geni del metabolismo come tiopurina metiltransferasi, diidropirimidina deidrogenasi, UDP glucuronosiltransferasi, ecc), alla quale non contribuiscono invece in modo sostanziale i polimorfismi del genoma del tumore.

E' importante fare tale distinzione in quanto la cellula tumorale, a causa della sua elevata instabilità genetica, sviluppa mutazioni somatiche addizionali che portano il suo genotipo a differire da quello germinale delle cellule non-tumorali; ciò può spiegare in parte lo sviluppo di fenomeni di farmacoresistenza durante il corso della terapia.

## ***1.2 Carcinoma del colon retto (CRC)***

### ***Epidemiologia e fattori di rischio***

Il carcinoma del colon retto rappresenta una delle più frequenti cause di morte per neoplasia nei paesi occidentali. La sua incidenza è in aumento in tutto il mondo ed in Europa vengono diagnosticati ogni anno 200.000 casi.

Tale neoplasia è rara prima dei 40 anni, presentandosi più frequentemente intorno ai 60 anni (Labianca Roberto et al, 2010 A). L'incidenza nei due sessi non mostra differenze per quanto riguarda la localizzazione colica, mentre a livello rettale sembra essere leggermente più frequente nel sesso maschile. Il 70% dei pazienti si presenta alla diagnosi con malattia chirurgicamente aggredibile, il 30% con malattia metastatica; il 25% dei pazienti operati radicalmente presenterà una ripresa di malattia dopo un tempo variabile. Più del 50% dei tumori del colon viene diagnosticato in fase avanzata quando l'efficacia dei trattamenti diminuisce sensibilmente. La prevenzione rimane quindi una delle armi principali contro questo carcinoma (Bonadonna et al, 2007).

La causa del carcinoma colon rettale rimane tuttora sconosciuta nella maggior parte dei casi, nonostante l'intensa attività di ricerca (Labianca Roberto et al, 2010 B). Stando ai risultati ottenuti da alcuni studi, sembra che ci siano delle correlazioni tra il cancro del colon retto e diversi fattori genetici, dietetici, occupazionali e ambientali. Non è stata individuata un'unica causa ma le ricerche hanno portato ad acquisizioni importanti. La genetica della poliposi familiare adenomatosa (FAP) e la conoscenza degli oncogeni e dei geni di soppressione tumorale hanno permesso di capire che il locus p53 sul cromosoma 17 è anormale nel 70% dei casi. Esistono due rare malattie genetiche, in presenza delle quali sussiste un alto rischio di sviluppare un carcinoma del colon retto: il carcinoma colon rettale ereditario non associato a poliposi (HNPCC), in cui tumori intestinali si sviluppano in giovane età, a volte in più parti dell'intestino, e la poliposi adenomatosa familiare che è una forma autosomica dominante caratterizzata dalla presenza di numerosi polipi (a volte 1000) nella mucosa del grosso intestino (con preferenza sigma e retto). In 3 su 4 pazienti prima dei 40 anni si sviluppano uno o più carcinomi e la lesione molecolare responsabile è dovuta alla mutazione del gene APC (5q21).

La colite ulcerosa è associata ad un aumentato rischio di cancro colon rettale, e anche la malattia di Crohn rappresenta una condizione favorente. Per coloro che sono affette da malattie infiammatorie croniche della mucosa intestinale il rischio di sviluppare un carcinoma del colon retto aumenta in relazione alla durata e all'estensione della malattia (Bonadonna et al, 2007).

Diversi studi sperimentali hanno dimostrato che una dieta ricca di grassi animali e proteine e povera di fibre (frutta e verdura) favorisce lo sviluppo del cancro al colon retto: tra le tante ipotesi sul meccanismo carcinogenetico si ritiene che l'incremento degli acidi biliari promuova la cancerogenesi attraverso un aumento dell'attività proliferativa delle cellule delle cripte intestinali. Le fibre avrebbero un'azione protettiva così come l'assunzione di vegetali, frutta, cereali, vitamina C. Il calcio agisce in modo protettivo legando in maniera irreversibile gli acidi grassi e biliari liberi nel lume intestinale evitando i danni sulla mucosa.

L'esposizione professionale a certi agenti fa sì che alcune categorie lavorative siano a rischio: operai esposti all'asbesto, metalmeccanici, operai di fibre tessili sintetiche, lavoratori del cuoio e del legno.

Anche i fattori ambientali giocano un ruolo non indifferente. L'attività fisica è importante e determina riduzione del rischio di cancro; l'alimentazione ha importanza nella prevenzione del cancro del colon retto, e deve contenere le fibre; per quanto riguarda l'uso di alcool, solo nei grandi bevitori vi è incidenza di cancro aumentata; il fumo si associa a rischio di cancro aumentato di almeno 2 volte; sembrerebbe che le donne abbiano una minore incidenza di tumore, ma d'altro canto, non sembra che terapie ormonali nella donna in menopausa possano giocare un ruolo in questo senso. Infine terapie con farmaci antinfiammatori non steroidei, per esempio l'aspirina, possono giocare un ruolo importante nella prevenzione del cancro del colon retto (Garcia-Albeniz X e Chan AT, 2011).

### ***Storia naturale***

Gli adenocarcinomi rappresentano il 95% delle neoplasie del grosso intestino. I rimanenti istotipi comprendono carcinoidi, sarcomi e linfomi.

La storia naturale di questo tumore è nota nelle sue linee generali (Bonadonna et al, 2007). Esiste un periodo maggiormente a rischio di ripresa della malattia costituito dai primi 24 mesi dall'intervento chirurgico. L'incidenza delle riprese di malattia decresce poi rapidamente e pazienti liberi da malattia a 5 anni possono

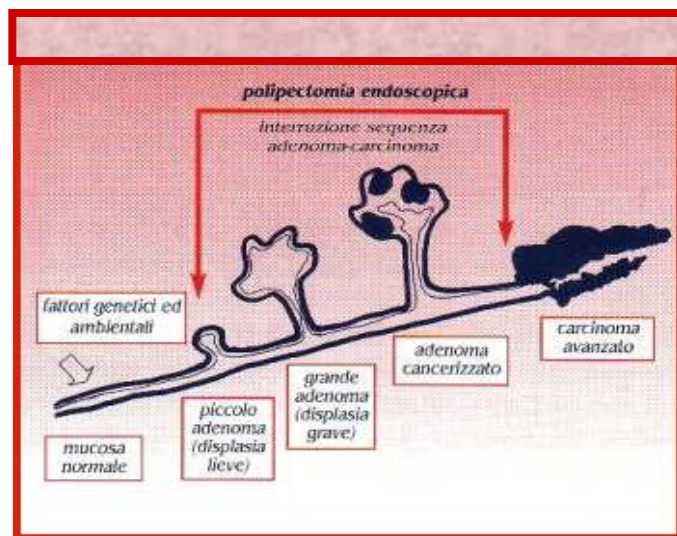


ragionevolmente essere considerati guariti. Il fegato rappresenta la più comune sede di ripresa di malattia, ma si verificano anche metastasi ossee e polmonari.

Lo stadio della malattia al momento dell'intervento è tra i più importanti indicatori prognostici, mentre le modalità della diffusione metastatica sono correlate alla sede di insorgenza del tumore primitivo (colon vs retto).

Il carcinoma del colon retto si sviluppa attraverso una serie di modificazioni sequenziali che precedono l'insorgenza della neoplasia (Fig. 3):

iperplasia → displasia lieve → displasia moderata → displasia grave → carcinoma



**Fig. 3** Storia naturale del carcinoma del colon retto

### ***Stadiazione e prognosi***

Sono molti i sistemi proposti per la stadiazione dei tumori del colon retto, e tra questi il più usato è stato quello introdotto da Dukes nel 1932 (Tabella 2), modificato circa 20 anni dopo da Astler e Collier (Tabella 3) (C.E. Dukes 1932, V.B. Astler, F.A. Collier 1954).

**Tabella 2.** Stadiazione del carcinoma del colon retto secondo Dukes

<b>STADIO A</b>	Neoplasia confinata entro la parete intestinale.
<b>STADIO B</b>	Neoplasia che si stende oltre la parete intestinale.
<b>STADIO C</b>	Qualsiasi neoplasia con metastasi linfonodali.
<b>STADIO D</b>	Metastasi a distanza.

**Tabella 3.** Stadiazione del carcinoma del colon retto secondo Astler e Coller

<b>STADIO A</b>	Neoplasia confinata entro la parete intestinale.
<b>STADIO B1</b>	Neoplasia che invade la muscolaris propria ma non si estende oltre.
<b>STADIO B2</b>	Neoplasia che si estende oltre la muscolaris propria.
<b>STADIO C1</b>	Come B1 ma con metastasi linfonodali.
<b>STADIO C2</b>	Come B2 ma con metastasi linfonodali.
<b>STADIO D</b>	Metastasi a distanza.

**Tabella 4.** Classificazione TNM

<b>T-TUMORE PRIMITIVO</b>
<b>TX :</b> Tumore primitivo non accertabile
<b>Tis :</b> Carcinoma in situ
<b>T0:</b> Non evidenza di tumore primitivo
<b>T1 :</b> Tumore che invade la sottomucosa
<b>T2:</b> Tumore che invade la muscolare propria
<b>T3:</b> Tumore che penetra attraverso la muscolare propria nella sottosierosa o nei tessuti pericolici o perirettali non ricoperti da peritoneo
<b>T4:</b> Tumore che invade direttamente altri organi o strutture (l'invasione diretta in T4 comprende l'invasione di altri segmenti del colon-retto attraverso la sierosa: ad esempio l'invasione del colon sigmoideo da un carcinoma del cieco).
<b>N-LINFONODI REGIONALI</b>
<b>NX:</b> Linfonodi regionali non valutabili
<b>N0:</b> Linfonodi regionabili liberi da metastasi
<b>N1:</b> Metastasi in 1-3 linfonodi regionali
<b>N2:</b> Metastasi in 4 o più linfonodi regionali
<b>M-METASTASI A DISTANZA</b>
<b>Mx:</b> metastasi a distanza non accertabili
<b>M0:</b> Metastasi a distanza assenti
<b>M1:</b> Metastasi a distanza presenti

Attualmente si utilizzano più comunemente la classificazione TNM (Tabella 4) e le classificazioni associate AJCC (American Joint Committee on Cancer) e UICC (Union Internationale Contre le Cancer) (Tabella 5) per avere una stadiazione

separata e parallela sia del tumore primitivo, sia del coinvolgimento linfonodale, che delle metastasi a distanza.

**Tabella 5.** Classificazioni associate AJCC e UICC

<b>STADIO 0</b>	Tis	N0	M0
<b>STADIO 1</b>	T1-2	N0	M0
<b>STADIO 2</b>	T3-4	N0	M0
<b>STADIO 3</b>	T1-4	N1-3	M0
<b>STADIO 4</b>	Qualsiasi T	Qualsiasi N	M1

La stadiazione viene dunque compiuta seguendo lo schema in tabella 6 (i numeri indicano la percentuale di sopravvivenza a 5 anni):

**Tabella 6.** Schema complessivo della classificazione del carcinoma del colon retto

<b>stadio</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>	<b>Dukes</b>	<b>Astler e Coller</b>
stadio 0	Tis	N0	M0		
stadio 1	T1	N0	M0	A 82%	A 100%
	T2	N0	M0		
stadio 2	T3	N0	M0	B 73%	B1 67%
	T4	N0	M0		B2 54%
stadio 3	Ogni T	N1	M0	C 27%	C1 43%
	Ogni T	N2 o N3	M0		C2 22%
stadio 4	ogni T	ogni N	M1	D 0%	D 0%

Sintesi della stadiazione:

	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>
<b>N0</b>	stadio 1 A	stadio 1 A	stadio 2 B1	stadio 2 B2
<b>N1</b>	stadio 3 C1	stadio 3 C1	stadio 3 C1	stadio 3 C1
<b>N2 - N3</b>	stadio 3 C2	stadio 3 C2	stadio 3 C2	stadio 3 C2

Lo stadio iniziale della malattia è il più importante fattore predittivo della sopravvivenza che risulta essere, a 5 anni, dell'85-90% per i pazienti in stadio A di Dukes e di circa il 60% per quelli in stadio B; tale sopravvivenza si riduce ulteriormente ad un valore del 40% in caso di coinvolgimento linfonodale ed è

inferiore al 5% in caso di metastasi a distanza. Altri criteri prognostici maggiori possono essere suddivisi schematicamente in criteri clinici, istopatologici e biologici (Bonadonna et al, 2007).

Tra i criteri prognostici clinici vi sono l'età: la prognosi è peggiore nei soggetti giovani al di sotto dei 30 anni, perché di solito la diagnosi è tardiva, e si ha spesso la presenza di un adenocarcinoma mucosale ad alto grado (53% nei soggetti giovani, contro il 20% negli anziani), con frequenti metastasi linfonodali; il sesso: le donne hanno infatti una prognosi migliore in termini di sopravvivenza; la sintomatologia: la mortalità a 5 anni dei soggetti sintomatici è del 49% contro il 79% di quelli asintomatici, specie quando i sintomi hanno una durata di almeno 6 mesi; la sede: rispetto alle altre localizzazioni, il carcinoma del retto e del rettosigma presentano una prognosi peggiore.

I criteri prognostici istopatologici comprendono l'aspetto macroscopico, il grado e l'istotipo. In base alle caratteristiche istologiche, si possono distinguere diversi gradi di differenziazione e varietà tumorali, ben differenziati (G1), moderatamente differenziati (G2), scarsamente differenziati (G3). Anche l'invasione dei vasi linfatici e dei sanguigni venosi rappresenta un fattore prognostico negativo indipendente per la sopravvivenza. L'invasione dei vasi linfatici è più frequente negli stadi avanzati di malattia.

Diversi sono i criteri biologici prognostici che vengono considerati. L'antigene carcino-embriionario (CEA) è spesso elevato nei pazienti con neoplasia retto-colica avanzata è un fattore prognostico importante, ma non è utile né nello screening, né nella diagnosi. Dopo un trattamento adeguato, il CEA si abbassa notevolmente ed un suo nuovo aumento, registrato nel follow up dei pazienti operati, è indice di ripresa di malattia. Il CA 19-9 si è rivelato essere un marker abbastanza specifico. L'oncogene c-myc è espresso soprattutto da adenocarcinomi mucinosi ed ad alto grado, a prognosi spesso negativa, così come l'oncogene ras, associato generalmente ad interessamento linfonodale. Di tutt'altra natura sono i geni multi drug resistance 1 (MDR 1) e catepsina B, mutati in genere in tumori meno aggressivi. Tra gli oncosoppressori il gene APC è associato a sindromi ereditarie e simultaneamente coinvolto in neoplasie sporadiche. Benché sia ritenuto responsabile della poliposi colica familiare, mutazioni somatiche di tale gene rappresentano il primo evento nella storia naturale del carcinoma sporadico del colon. Tale gene è localizzato sul

cromosoma 5 (5q21) e codifica per una proteina citoplasmatica che riveste un ruolo chiave nella regolazione dell'apoptosi, del ciclo cellulare, della interazione ed adesione intercellulare, dei processi di migrazione nonché di metastatizzazione. Attualmente, comunque la funzione meglio conosciuta è quella di regolazione della beta-catenina. Nel 50% degli adenomi sporadici del colon e nell'80% dei carcinomi, l'APC è inattivato ed incapace di regolare la beta-catenina che si accumula nel nucleo e forma complessi con fattori di trascrizione fungendo da co-attivatore di geni attivatori di crescita e proliferazione cellulare (c-myc, ciclina D1), nonché di proteasi extracellulari (MMP7), che facilitano i processi di invasione e metastasi. Alterazioni strutturali del gene oncosoppressore p53, che è localizzato sul cromosoma 17 ed ha funzione di attivatore della trascrizione e di modulatore del processo apoptotico, partecipando ai meccanismi di riparo del DNA e al controllo dei processi angiogenetici mediante regolazione dei fattori di crescita vascolari (VEGF) si riscontrano nel carcinoma del colon-retto con una frequenza che oscilla tra il 40 ed il 60%. La perdita di tale gene potrebbe accelerare la progressione tumorale attraverso la promozione di una instabilità genetica, che inoltre può determinare anche una condizione di chemioresistenza, attraverso l'amplificazione dei geni che intervengono nella resistenza farmacologica (geni Timidilato Sintetasi, DHF-Reduttasi e MDR1). Pazienti con tumori che mostrano delezioni alleliche nei cromosomi 17 e 18, hanno una maggiore percentuale di recidive ed una ridotta sopravvivenza.

In uno studio presentato all'American Society of Clinical Oncology (Tejpar S et al, 2009) analisi effettuate su campioni di tessuto confermano che i pazienti con alta frequenza di instabilità microsatellitare (MSI-H) hanno una maggiore sopravvivenza rispetto ai pazienti con tumori con stabilità microsatellitare (MSS). Tuttavia questo vantaggio viene perduto in presenza della chemioterapia. La terapia adiuvante sembra avere un effetto benefico in pazienti con tumori MSS mentre nei pazienti con MSI-H determina un peggiore risultato. Tuttavia lo studio di Barratt e altri dimostra che la ritenzione di eterozigosi ad uno o più microsatelliti entro il gene della p53 sul 17p o sul 18q comporta un notevole beneficio nella terapia adiuvante con 5-Fluorouracile (Barratt PL et al, 2002).

Altro importante fattore biologico prognostico è l'espressione della Timidilato Sintetasi (TS). In uno studio su alcuni pazienti sottoposti a terapia adiuvante con Fluorouracile, la maggioranza dei pazienti con recidiva erano TS positivi, mentre

tra quelli senza malattia il 67% erano TS negativi. Inoltre i pazienti con sovraespressione di TS godrebbero di un migliore beneficio se trattati con farmaci aventi un meccanismo diverso dal 5-Fluorouracile (Hitre E et al, 2005).

Bisogna tuttavia osservare come negli ultimi dieci anni per nessuna malattia tumorale si è assistito ad un progresso così importante in terapia come è accaduto per il carcinoma del colon retto. Oggi finalmente ci sono a disposizione farmaci efficaci in grado addirittura di guarire i pazienti o, comunque, di tenere sotto controllo la malattia. Sottoporre il paziente alla chemioterapia dopo l'intervento di resezione del tumore aiuta a prevenirne la ricomparsa soprattutto in chi è a maggior rischio di recidiva, cioè in quei malati che presentano linfonodi infiltrati dal tumore.

### ***Terapia***

L'andamento delle curve di incidenza e mortalità dell'ultima decade testimoniano il successo della diagnosi precoce e l'efficacia delle terapie attuate. Esiste pieno accordo nel riconoscere la chirurgia come unico trattamento con possibilità di guarigione, alla quale possono essere utilmente associate la radioterapia e la chemioterapia.

Il miglioramento delle tecniche diagnostiche che chirurgiche negli ultimi 40 anni ha determinato un miglioramento della prognosi. Generalmente il 70% dei pazienti viene sottoposto ad interventi chirurgici apparentemente radicali a scopo curativo; invece nel restante 30% dei casi, già in fase avanzata di malattia al momento della diagnosi, viene eseguita una chirurgia a scopo palliativo. Nei pazienti operati in maniera apparentemente radicale, il rischio di recidiva varia con lo stadio patologico del tumore primitivo. La chirurgia può essere inoltre utile, e talora indispensabile, nella malattia avanzata, per prevenire complicanze, come occlusioni, sanguinamenti o perforazioni, oppure per asportare recidive locoregionali o metastasi a distanza (al fegato, polmone, ecc.), talora con intento curativo.

Negli adenocarcinomi del retto, nei quali è più frequente la recidiva locale, viene adoperata di routine la radioterapia a scopo adiuvante, associata alla chemioterapia. Un trattamento radiochemioterapico inoltre, può essere eseguito

pre-operatoriamente nelle neoplasie localmente avanzate per ridurre la massa e consentire al paziente di essere sottoposto all'intervento chirurgico.

Nella gestione dei pazienti affetti da carcinoma del colon retto in fase metastatica sono state impiegate quindi diverse modalità terapeutiche. Il trattamento chemioterapico rappresenta però il fulcro delle possibilità terapeutiche disponibili in questo gruppo di pazienti.

La chemioterapia adiuvante viene somministrata dopo l'intervento chirurgico di asportazione radicale del tumore, al fine di ridurre il rischio che la malattia si ripresenti. Il 5-fluorouracile (5-FU), fluoropirimidina appartenente al gruppo degli anti-metaboliti, sin dalla sua introduzione, risalente a circa 40 anni fa, rappresenta a tutt'oggi, il farmaco di scelta nel trattamento del carcinoma del colon retto. Altri chemioterapici usati in passato in monochemioterapia come alcune nitrosuree, la mitomicina C, il fluorouracile, non hanno mostrato, in termini di risposte o sopravvivenza, un vantaggio rispetto al 5-fluorouracile usato da solo.

Attualmente la somministrazione per via endovenosa di 5-FU con acido folinico (AF) per 5 giorni al mese per 6 mesi è considerato il trattamento standard adiuvante nei pazienti in stadio III, capace di determinare un incremento della sopravvivenza assoluta pari al 5-10%, rispetto ai pazienti che non hanno ricevuto chemioterapia adiuvante.

Negli ultimi anni nuovi farmaci sono stati studiati in associazione o meno con il 5-FU per cercare di migliorare la sopravvivenza in pazienti affetti da carcinoma metastatico del colon retto in fase avanzata. Tra questi l'Irinotecano (CPT-11) e l'Oxaliplatino rivestono un ruolo fondamentale associati eventualmente agli inibitori di VEGF (vascular endothelial growth factor) o dell'EGFR (epidermal growth factor receptor) in caso di positività del tumore per la presenza di questo recettore.

L'Irinotecano recentemente in associazione con il 5-FU, ha mostrato percentuali di risposte obiettive maggiori rispetto ai pazienti trattati con solo 5-FU con una sopravvivenza globale di circa 17 mesi.

L'oxaliplatino ha un'attività molto interessante nei confronti del carcinoma del colon retto, riuscendo in monochemioterapia ad ottenere risposte obiettive in prima e seconda linea nella fase avanzata rispettivamente nel 24% e 10% dei casi. Nello studio MOSAIC (Andrè T et al, 2006) è stato osservato che l'associazione del 5-FU/AF con l'oxaliplatino (schema FOLFOX), già efficace nel trattamento di

prima linea del carcinoma colon-retto avanzato, è efficace e sicura anche nel trattamento adiuvante. Nei pazienti in stadio II e III trattati con FOLFOX, infatti, tale studio ha osservato una riduzione del rischio di ricaduta di malattia a 3 anni del 25%. Un importante vantaggio terapeutico dello schema FOLFOX è la sua capacità di determinare una riduzione del volume e del numero delle metastasi epatiche in pazienti con carcinoma metastatico del colon retto, che è risultato essere correlato ad un aumento della percentuale di sopravvivenza di tali pazienti sia a 2 che a 5 anni e all'aumento delle possibilità di intervenire chirurgicamente su metastasi epatiche considerate inoperabili prima della chemioterapia. Studi clinici hanno valutato, inoltre, l'associazione dell'oxaliplatino con il Raltitrexed un inibitore della Timidilato Sintetasi (Wilson KS et al, 2009). Quest'ultimo è un farmaco con un maneggevole profilo di tossicità sia nei pazienti trattati precedentemente con chemioterapia adiuvante sia nei pazienti non trattati.

### ***1.3 5-FU***

Il 5-Fluorouracile (5-FU) è un antimetabolita, analogo delle basi pirimidiniche, ampiamente utilizzato in clinica da solo o in associazione con altri farmaci nel trattamento di varie neoplasie maligne, in particolare dei tumori del tratto gastroenterico, della mammella, dell'ovaio e dell'area testa-collo (Punt CJH, 1998).

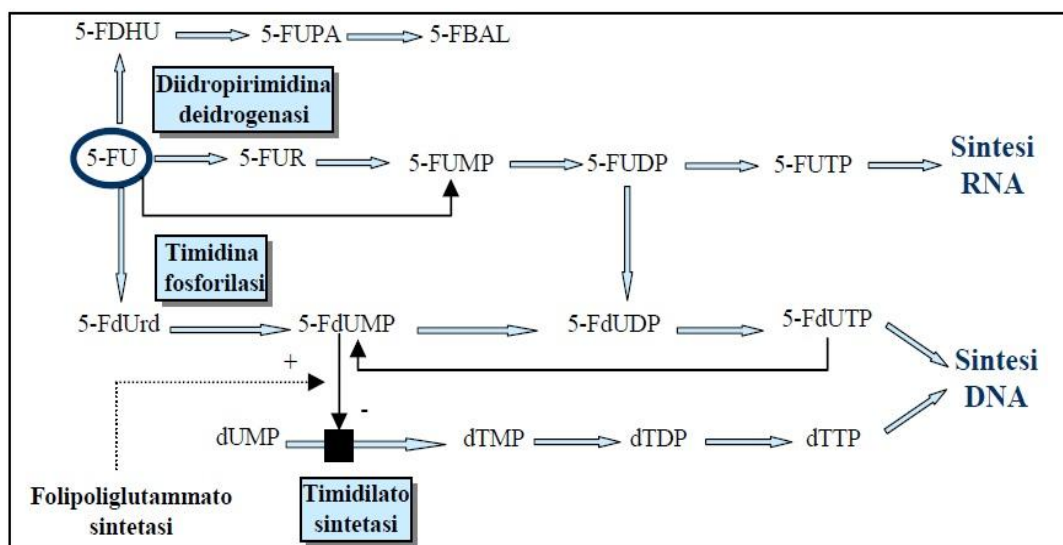
Il 5-FU, molecola inattiva sia per le cellule normali che tumorali, acquisisce la sua attività citotossica in seguito alle biotrasformazioni che subisce all'interno della cellula. La penetrazione del farmaco nella cellula avviene sia per diffusione passiva che attraverso il sistema di trasporto dell'uracile (Bajetta E et al, 1996). Nella cellula, il 5-FU può seguire le stesse vie metaboliche dell'uracile (Fig. 4):

1. la conversione, ad opera della timidina-fosforilasi e timidina-chinasi, in 5-fluorodesossiuridilmonofosfato (FdUMP) che blocca l'enzima timidilato-sintetasi (TS), arrestando la sintesi di timidina e del DNA;
2. la conversione diretta, ad opera della orotidina-5'-monofosfato-fosforibosil-transferasi in presenza di 5-fosforibosil-1-pirofosfato (PRPP), o dell'uridin-fosforilasi e uridina-chinasi in fluorouridilmonofosfato (FUMP),



successivamente fosforilato a fluorouridiltrifosfato (FUTP) che viene incorporato nell'RNA nucleare e citoplasmatico alterandone le funzioni;

3. la conversione di FUMP in desossiribonucleotide (FdUMP) in seguito fosforilato (FdUTP) e incorporato nel DNA compromettendone la stabilità.



**Fig. 4** Vie metaboliche del 5-Fluorouracile

Dopo la somministrazione, il farmaco può seguire diversi destini metabolici: più dell'80% della dose viene inattivata mediante biotrasformazione, principalmente a livello epatico, circa il 15-20% del 5-FU viene eliminato come tale nelle urine e solo una piccola frazione resta disponibile per esercitare la sua azione tossica a livello cellulare. L'efficacia terapeutica e l'induzione di effetti indesiderati tossici sono strettamente correlate al bilancio tra i processi anabolici e quelli catabolici che presentano una notevole variabilità interindividuale con conseguenze importanti sulla risposta clinica dei diversi pazienti alla terapia (Grem JL, 1997).

Nelle cellule eucariotiche la prima delle tre tappe della via catabolica delle basi pirimidiniche timina e uracile, seguita anche dal loro analogo 5- FU, è catalizzata dall'enzima diidropirimidina deidrogenasi (DPD). La DPD agisce riducendo il doppio legame dell'anello pirimidinico e formando il 5-fluoro-5,6-diidrofluorouracile (5-FDHU). Il 5-FDHU è un composto instabile convertito ad opera della diidropirimidinasasi (Maguire JH, Dudley KH, 1978) in acido fluoro-ureidopropionico (FUPA) e successivamente, ad opera della beta-ureidopropionasi (Sanno et al, 1979), in 5alfa-fluoro-beta-alanina (FBAL), principale metabolita urinario del 5-FU. La prima tappa del catabolismo del 5-FU,

mediata dall'enzima DPD, costituisce la tappa limitante dell'intera via metabolica (Shiotani T, Weber G, 1981). La diidropirimidina deidrogenasi è un enzima citosolico ubiquitario espresso principalmente a livello epatico ma anche in altri tessuti quali, per esempio, la mucosa intestinale ed i leucociti del sangue periferico (Diasio RB, Lu Z, 1994).

Lo studio della farmacocinetica plasmatica del 5-FU e del suo principale catabolita 5-FDHU, espressione del metabolismo sistemico delle fluoropirimidine da parte della DPD, può rappresentare un utile strumento per l'identificazione dei soggetti a rischio di tossicità gravi o mortali su base farmaco genetica indotte da trattamenti chemioterapici che prevedono l'impiego del 5-FU (Bocci G et al, 2000). La riduzione della formazione del principale metabolita, o la presenza di alterazioni consistenti della distribuzione sia del 5-FU che del 5-FDHU, possono pertanto essere considerate manifestazioni di un alterato funzionamento della via metabolica delle fluoropirimidine e costituire una possibilità reale di individuare i soggetti a rischio tra coloro che dovranno affrontare la terapia adiuvante e modificare opportunamente la terapia. L'analisi della farmacocinetica del 5-FU riveste particolare importanza in considerazione dell'ampia scelta di modalità e vie di somministrazione proponibili per questo farmaco. La somministrazione orale del 5-FU è stata abbandonata a causa della notevole variabilità della biodisponibilità, della concentrazione massima plasmatica e del tempo necessario per raggiungerla (Cohen et al, 1974). Dopo somministrazione orale, infatti, una frazione variabile di 5-FU, comunque inferiore al 75%, raggiunge la circolazione sistemica. Le cause di questa variabilità dipendono probabilmente da ostacoli nell'assorbimento in relazione alle diverse condizioni di pH del tratto gastroenterico prossimale o al catabolismo da parte della DPD presente nella mucosa intestinale (Naguib FMN et al, 1985). Per questa ragione il 5-FU è generalmente somministrato per via endovenosa, attraverso la quale il farmaco penetra rapidamente nello spazio extracellulare, compreso il liquido cerebrospinale, apparentemente per diffusione semplice. Il 5-FU raggiunge livelli elevati e persistenti nei versamenti pleurici e nell'ascite e quantità significative penetrano anche nel sistema nervoso centrale, dove generalmente il 5-FU diffonde nel tessuto neoplastico più rapidamente rispetto al tessuto sano (Bourke et al, 1973). La farmacocinetica del 5-FU è considerata di tipo non lineare (Collins et al, 1980) e ciò riflette probabilmente la saturabilità dei processi metabolici o di

trasporto alle concentrazioni più elevate del farmaco e non permette di predire i livelli plasmatici o la tossicità ad alte dosi.

L'impiego principale del 5-FU è rappresentato dalla terapia adiuvante post-chirurgica di neoplasie del colon. Studi clinici condotti su un gran numero di pazienti oncologici hanno mostrato un piccolo, ma significativo, aumento della sopravvivenza libera da malattia nei pazienti con carcinoma del colon in stadio Dukes C sottoposti a trattamento con 5-FU in associazione a folati rispetto a quelli sottoposti al solo trattamento chirurgico. Il trattamento adiuvante a base di 5-FU, in associazione con quello radioterapico, è il trattamento di scelta anche nei carcinomi rettali di stadio Dukes C e B2 che presentano un rischio di recidiva locale più elevato (NIH Consensus Conference, 1990). L'esperienza clinica indica che il 5-FU induce risposte parziali nel 10-30% dei pazienti con carcinoma metastatico della mammella e del tratto gastrointestinale; effetti benefici sono stati riportati anche nei tumori del fegato (sia primitivi che metastatici, soprattutto nel caso di neoplasie del tratto gastroenterico), del pancreas, dell'endometrio, della cervice, dell'ovaio, della vulva e della vagina (per applicazioni topiche), della vescica e della regione testa-collo. Altre indicazioni all'uso di 5-FU sono rappresentate da carcinomi cutanei e lesioni precancerose della cute. Inoltre, il 5-FU è in grado di interagire positivamente, sia a livello clinico che preclinico, con vari altri farmaci antineoplastici, tra cui il cisplatino, l'oxaliplatino e l'irinotecano (Goodman & Gilman, 2006).

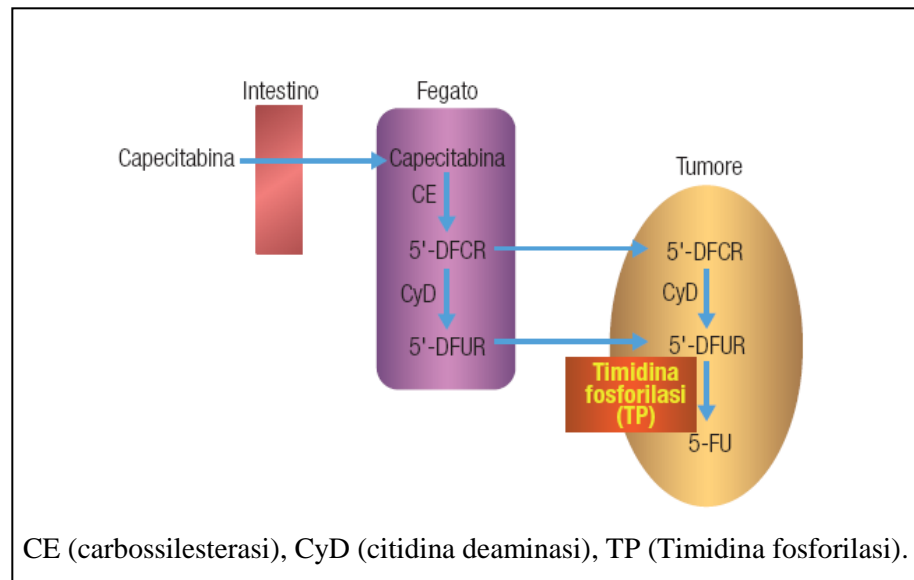
Per quanto riguarda la tossicità nei confronti dell'ospite gli effetti principali del 5-FU sono a carico dei tessuti in rapida proliferazione, ed in particolar modo a carico della mucosa gastrointestinale e del midollo osseo. Malgrado i numerosi studi svolti e le conoscenze finora acquisite, non è stato tuttora definito se il 5-FU svolga un effetto citotossico letale o un transitorio effetto inibitore sulla proliferazione cellulare. Inoltre, non è chiaro se il 5-FU interferisca con la proliferazione delle cellule tumorali e delle cellule dell'organismo ospite con diversi e molteplici meccanismi di citotossicità. Tra i vari meccanismi attribuiti al 5-FU, quello a cui attualmente viene data maggiore importanza è l'inibizione della Timidilato Sintetasi da parte di FdUMP, che rappresenta il meccanismo più studiato e meglio conosciuto del 5-FU (Machover D, 1991). È noto, inoltre, che il 5-FU può alterare le funzioni della membrana cellulare determinando variazioni del potenziale elettrico transmembranario e della carica elettrica di superficie

(Walliser S, Redman K, 1978) ed alterazioni strutturali della membrana attraverso un'interferenza con la sintesi delle glicoproteine. Questo effetto può associarsi ad un aumento del volume delle cellule che le rende più suscettibili alla lisi.

L'ampia diffusione dovuta all'efficacia clinica e alla buona tollerabilità ha messo in evidenza l'insorgenza di effetti tossici di particolare gravità, talvolta mortali, in una piccola percentuale di pazienti (<1%) senza che sia possibile, con le tecniche di laboratorio di comune uso, l'identificazione dei soggetti a rischio. Lo spettro di tossicità associate con il 5-FU varia considerevolmente con la dose, lo schema e la via di somministrazione. La tossicità del 5-FU compare nella maggior parte dei casi dopo alcuni giorni dall'inizio del trattamento. I primi sintomi interessano generalmente l'apparato gastroenterico: i più frequenti e precoci sono rappresentati da anoressia, nausea e vomito, seguiti da stomatite e diarrea. Sul midollo emopoietico il farmaco, soprattutto se somministrato per via endovenosa, può causare mielodepressione con leuco- e trombocitopenia, che determinano un aumento della suscettibilità alle infezioni e tendenza ad emorragie, con conseguenze talvolta mortali. Sono possibili alterazioni degli annessi cutanei con modesta perdita di capelli, che raramente progredisce fino alla totale alopecia, distrofie ungueali, dermatiti, aumentata pigmentazione e atrofia della cute. Sul sistema nervoso centrale il 5-FU può determinare alterazioni responsabili di atassia cerebellare acuta (circa nel 2% dei casi) ed altri sintomi quali confusione mentale, difficoltà di concentrazione, riduzione della memoria e deterioramento mentale nei pazienti anziani. Questi disturbi sono reversibili dopo sospensione del trattamento (Goodman & Gilman, 2006). La somministrazione endovenosa del 5-FU è quindi associata spesso ad elevata morbilità. Per migliorare la tollerabilità e la concentrazione a livello tumorale del farmaco oggi è spesso utilizzata la Capecitabina. Si tratta di un profarmaco del 5-fluorouracile il quale viene convertito nel composto attivo nel tessuto tumorale mediante tre reazioni enzimatiche che coinvolgono la carbossilesterasi, la citidina deaminasi e la timidina fosforilasi (Fig. 5). Gli enzimi timidina fosforilasi e citidina deaminasi, richiesti per l'attivazione, mostrano un'aumentata attività nel tessuto di molti tumori, rispetto al tessuto normale.

In tal modo, la Capecitabina viene attivata selettivamente a livello tumorale, esplicando l'azione di antimetabolita nella fase S del ciclo cellulare e mimando gli effetti dell'infusione continua di 5-FU. Nella sua formulazione in compresse, la

molecola di Capecitabina è assorbita intatta attraverso la mucosa intestinale e, successivamente, viene idrolizzata dalla carbossilesterasi epatica a 5'-deossi-5-fluorocitidina (5'-DFCR) (Walko CM and Lindley C, 2005; Van Cutsem E et al, 2001).



**Fig. 5** Attivazione enzimatica della Capecitabina

Nel secondo passaggio, l'enzima citidina deaminasi, presente nel fegato e nel tessuto tumorale, converte il metabolita 5'-DFCR nella forma intermedia 5'-deossi-5-fluorouridina (5'-DFUR). Infine, la timidina fosforilasi, che è presente nelle cellule tumorali in concentrazioni da 3 a 10 volte superiori rispetto alle cellule normali, trasforma il 5'-DFUR nel farmaco attivo 5-FU. Questa molecola agisce impedendo la replicazione del DNA e forzando le cellule tumorali alla morte per apoptosi (Daniel Vallbø hmer et al, 2007).

Nonostante il profilo di tossicità delle fluoropirimidine (5-FU e il suo profarmaco Capecitabina) esse rappresentano ancora oggi componenti principali della chemioterapia per il trattamento di diversi tumori. I pazienti che hanno sviluppato tossicità particolarmente gravi dopo la somministrazione di 5-FU ed i loro consanguinei hanno presentato un difetto metabolico consistente in un ridotto catabolismo e inattivazione del 5-FU a 5-fluoro-5,6-diidrouracile (5-FDHU) ad opera della diidropirimidina deidrogenasi (DPD). In tali soggetti è stata infatti dimostrata una riduzione o assenza dell'attività diidropirimidino-deidrogenasica nei leucociti, suggerendo che la determinazione del grado di attività enzimatica

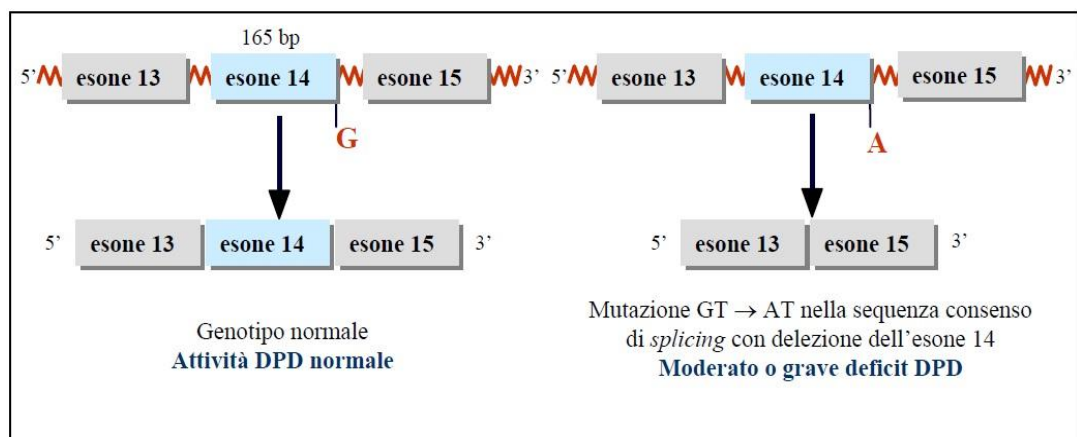
leucocitaria potesse rappresentare un valido metodo di selezione dei soggetti da sottoporre o meno a chemioterapia con 5-FU. Successivamente, è stato dimostrato che l'analisi dell'attività diidropirimidino-deidrogenasica nei leucociti, di esecuzione complessa e con materiale radiomarcato, è soggetta a molte variabili metodologiche tanto da poter generare risultati inattendibili. Pertanto, l'analisi di routine dell'attività diidropirimidino-deidrogenasica nei leucociti come base per l'individuazione dei pazienti a rischio e l'ottimizzazione del trattamento chemioterapico non sembra rappresentare un metodo pienamente affidabile e un approccio farmacocinetico basato sulla valutazione delle concentrazioni ematiche del 5-Fluorouracile potrebbe essere più adeguato alla rilevanza clinica del problema (Bocci G et al, 2000).

Recentemente è stato scoperto che il gene codificante per la DPD è altamente polimorfico: sono state, infatti, identificate numerose varianti alleliche, la cui frequenza può variare significativamente in base al gruppo etnico considerato e le quali sembrano giocare un ruolo chiave nella regolazione dell'attività dell'enzima.

### ***Diidropirimidina deidrogenasi (DPD)***

La diidropirimidina deidrogenasi (DPD) è l'enzima principale di controllo del metabolismo del 5-FU, catalizzando la tappa limitante della sua inattivazione. I substrati fisiologici di questo enzima sono rappresentati dalle pirimidine, uracile e timina che vengono degradati con formazione finale di  $\beta$ -alanina. DPD è un omodimero a localizzazione citosolica con un peso molecolare che varia da 200 a 216 kDa, a seconda della specie di mammifero considerata (Van Kuilenburg et al, 1997 A) e la reazione enzimatica catalizzata implica una riduzione NADPH-dipendente delle pirimidine. E' una proteina composta da 1025 aminoacidi e nella sequenza ci sono alcune porzioni conservate che corrispondono agli ipotetici siti di legame per il NADPH e per il FAD e a due gruppi ferro-zolfo. Inoltre, Naguib e collaboratori (1985) hanno misurato l'attività dell'enzima DPD in vari tessuti, trovando valori più elevati nel fegato e nei leucociti rispetto a quelli di altri tessuti quali polmone, pancreas e mucosa intestinale, dove la DPD è tuttavia presente. Il gene che codifica per l'enzima DPD è localizzato sul cromosoma 1, nella posizione 22 del suo braccio corto (1p22); tale gene è costituito da 23 esoni e 22 introni che nell'insieme danno luogo ad una sequenza nucleotidica pari a circa 150 Kb (Fernandez-Salguero et al, 1994; Johnson et al, 1997). Sono state

determinate non solo la lunghezza e la sequenza degli esoni e degli introni, ma anche delle regioni di confine fra introni ed esoni (siti di splicing). La conoscenza della struttura e organizzazione del gene DPD ha consentito l'identificazione e l'analisi molecolare di molteplici mutazioni che possono interferire con l'espressione e l'attività catalitica dell'enzima DPD. La più nota fra le mutazioni del gene DPD, descritta in pazienti con deficit parziale o totale di attività enzimatica, consiste in una mutazione puntiforme con sostituzione della guanina (G) in posizione 1986 con una adenina (A). La mutazione si localizza nella sequenza GT del sito di riconoscimento per lo splicing all'estremità 5' dell'introne 14 (Meinsma et al, 1995; Wei et al, 1996; Vreken et al, 1996 A; Vreken et al, 1996 B; Van Kuilenburg et al, 1997 B). Tale mutazione è indicata come IVS14+1G>A, allele DPYD\*2A (Fig. 6). La mutazione non permette il riconoscimento del sito al momento dello splicing del pre-mRNA e ciò causa la delezione dell'intero esone che precede la mutazione con conseguente perdita di 165 bp. La delezione dell'esone 14 nell'RNA messaggero ha come risultato la delezione di 55 residui amminoacidici, dal 581 al 635, nella sequenza primaria della proteina DPD.



**Fig. 6** Mutazione nel sito di splicing dell'esone 14 del gene DPD.

Nella condizione di eterozigosi per la mutazione nel sito di splicing si riscontra una riduzione dell'attività DPD che diventa completa nei soggetti omozigoti e tale da determinare lo sviluppo di grave tossicità nei soggetti trattati con 5-FU. L'assenza di attività enzimatica, infatti, si associa nei pazienti sottoposti al trattamento con l'agente chemioterapico alla comparsa di attacchi epilettici, microcefalia e ritardo mentale in età pediatrica.

Tale mutazione determina, quindi, un mancato accumulo della proteina nella cellula. È interessante, tuttavia, notare che, anche se la proteina non si accumula nella cellula, il suo mRNA è comunque presente, indicando che la mancata produzione della proteina DPD non è dovuta ad una particolare instabilità dell'mRNA, difettoso rispetto a quello che codifica per la proteina attiva. La frequenza dell'allele mutato calcolata in una popolazione di pazienti con neoplasia del colon-retto è stata dello 0,7% (Ridge et al, 1998).

Sono state descritte altre mutazioni del gene DPD, sebbene non tutte siano associate a un deficit di attività DPD. Tra queste vi sono:

- tre diverse mutazioni puntiformi che producono sostituzioni di aminoacidi in regioni non conservate della molecola di DPD (Wei et al, 1996);
- una mutazione puntiforme con sostituzione di G con A nel codone 534 che determina la sostituzione dell'aminoacido serina con asparagina. Nello studio di Ridge e collaboratori (1998) la mutazione è stata trovata allo stato di eterozigosi anche in pazienti con neoplasie del colon-retto, con un'incidenza dell'allele mutato pari all'1,3%. Tuttavia in questi soggetti non sono stati riscontrati bassi livelli di attività DPD, e ciò suggerisce che la mutazione non influenzi significativamente l'attività catalitica dell'enzima;
- una mutazione puntiforme con sostituzione di A con G nel codone 543 che determina la sostituzione dell'aminoacido isoleucina con una valina. Questa mutazione è stata descritta in associazione alla mutazione nel sito di splicing, sullo stesso allele, nello studio di Ridge e collaboratori (1998). L'attività DPD nei soggetti in cui è presente questa mutazione varia in un intervallo molto ampio, da valori molto bassi, associati a rischio di grave tossicità indotta da 5-FU, a valori normali. Si deve comunque considerare la frequente associazione di questa mutazione con la mutazione nel sito di splicing che sicuramente comporta una bassa attività enzimatica; di conseguenza si ritiene che la mutazione nel codone 543 da sola non abbia un effetto significativo sull'attività catalitica della DPD. Per questo motivo e per l'elevata frequenza dell'allele mutato nella popolazione, la mutazione nel codone 543 può essere considerata un comune polimorfismo del gene non particolarmente influente sul rischio di tossicità indotta da 5-FU;
- due mutazioni nonsense le quali determinano un codone di stop prematuro nella sequenza codificante. Poiché il codone di stop si localizza prima del sito di



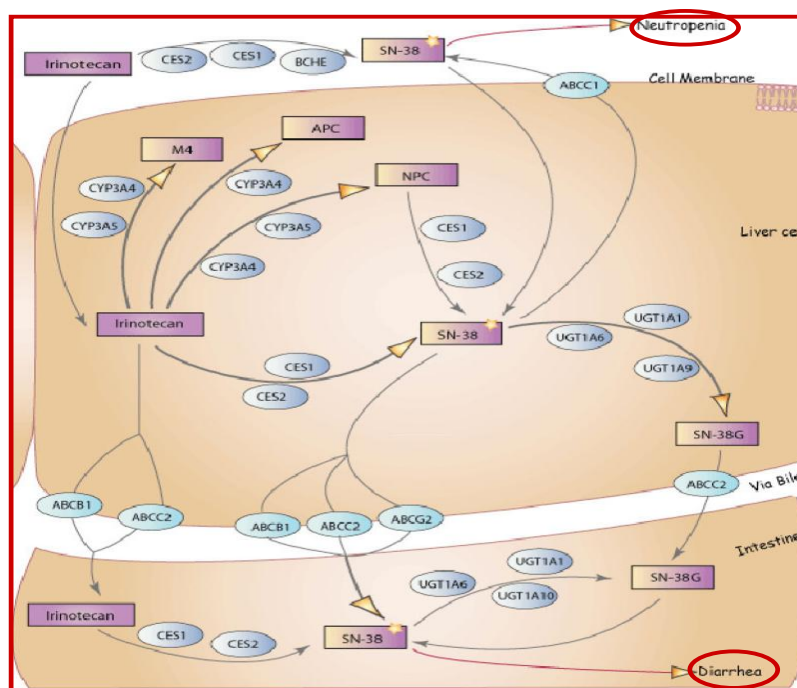
legame di FAD e dell'uracile, la proteina DPD codificata non è funzionale (Van Kuilenburg André B.P, 2004).

### ***1.4 Irinotecano***

L'Irinotecano, conosciuto anche come CPT-11, è un derivato semisintetico della camptotecina, inibitore della topoisomerasi I, dotato di potente attività antitumorale. E' tra i più diffusi chemioterapici antineoplastici utilizzati per il trattamento di varie forme di tumori solidi (carcinoma polmonare non a piccole cellule, ovarico, del colon retto e della mammella); tuttavia il suo impiego clinico è fortemente limitato dal verificarsi di gravi reazioni avverse quali diarrea e mielosoppressione. Tutti gli analoghi della camptotecina presentano una struttura chimica pentaciclica; esistono in due forme, una lattonica (ad anello chiuso) attiva ed una carbossilata (ad anello aperto) inattivata. L'equilibrio tra queste due forme è pH-dipendente. L'Irinotecano è un pro-farmaco, che ad opera della carbossilesterasi-2 viene attivato al metabolita attivo SN-38, un inibitore della topoisomerasi I più potente rispetto al farmaco progenitore.

Inoltre l'Irinotecano viene anche ossidato dal CYP3A4, dando origine a due metaboliti inattivi, a loro volta idrolizzati a SN-38 (Fig. 7). Anche l'SN-38 esiste in forma lattonica attiva ed in forma carbossilata ad anello aperto, meno attiva. L'SN-38 viene poi, a sua volta, glucuronato e inattivato prevalentemente dall'isoforma UGT1A1 dell'enzima epatico UDP- glucuronosiltrasferasi (UGT) (e in misura minore dalle isoforme UGT1A6, UGT1A7 e UGT1A9).

La topoisomerasi I è un enzima che interviene in vari processi del DNA, quali la replicazione, la trascrizione e la ricombinazione. La funzione biologica della topoisomerasi I consiste nell'allentare la torsione della doppia elica di DNA: questo è ritenuto indispensabile per la corretta lettura e trascrizione del codice genetico e ciò spiega il notevole interesse suscitato dai farmaci che interferiscono con la topoisomerasi I.



**Fig 7.** Vie metaboliche dell'Irinotecano

Per ottenere questo risultato l'enzima si lega alla molecola di DNA superavvolta e ne taglia un filamento permettendo ad esso di svolgersi intorno all'asse del filamento rimasto integro; quando il superavvolgimento si rilascia, l'enzima si stacca dal DNA e ricostituisce l'integrità del filamento che aveva interrotto. L'Irinotecano si lega al complesso DNA-topoisomerasi I impedendo il distacco dell'enzima e la ricongiunzione delle estremità del filamento tagliato. Il danno cellulare si realizza quando la "forca replicativa" (cioè il complesso enzimatico responsabile della replicazione del DNA) incontra il complesso DNA-topoisomerasi-Irinotecano con frammentazione della doppia elica di DNA e conseguente apoptosi della cellula per perturbazioni del ciclo cellulare e difetti nei meccanismi di riparazione del DNA (Rossi F et al, 2005).

Nello studio della farmacocinetica dell'Irinotecano rivestono particolare importanza i valori dei livelli plasmatici sia dell'Irinotecano che di SN-38. In particolare, è stato visto che i livelli plasmatici di SN-38 sono il risultato di diversi processi metabolici e della presenza di un circolo enteroepatico, responsabile in parte della variabilità interindividuale dei parametri farmacocinetici. In generale, i livelli plasmatici di SN-38 aumentano fino a 1,5-3 ore dall'inizio dell'infusione per poi diminuire. L'emivita di SN-38 è di circa 47 ore, più lunga di quella dell'Irinotecano. L'escrezione urinaria ammonta al 28% della dose, sotto forma di Irinotecano e SN-38, ma la via di eliminazione principale è quella biliare. Il

coinvolgimento di molti sistemi enzimatici, a loro volta sottoposti a processi di attivazione/inibizione e alcuni dei quali con polimorfismo genetico (ad es. l'UGT1A1), spiega le difficoltà incontrate nel definire il profilo farmacocinetico di SN-38 e l'importanza del rapporto tra SN-38 coniugato e non-coniugato, nonché della persistenza nel plasma di SN-38 non-coniugato per la comparsa di tossicità ematologica e diarrea.

L'Irinotecano è indicato in combinazione con 5-fluorouracile e acido folinico per il trattamento di pazienti con carcinoma avanzato del colon retto, che non sono stati trattati precedentemente con chemioterapia per malattia avanzata. E' previsto anche l'uso in monoterapia in pazienti nei quali un trattamento convenzionale con 5-fluorouracile non ha avuto successo. L'Irinotecano, inoltre, in combinazione con cetuximab è indicato per il trattamento di pazienti con carcinoma metastatico del colon retto esprimente il recettore EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor).

La tossicità dell'Irinotecano si può manifestare a carico di vari organi e apparati. Gli effetti collaterali più comuni sono: diarrea e crampi addominali, aumento anomalo della temperatura corporea, febbre, dolori generalizzati a tutto il corpo, nausea e vomito, affaticamento e perdita dei capelli. La diarrea, se prolungata nel tempo, può diventare pericolosa per l'organismo, a causa degli effetti della disidratazione. I soggetti trattati dovrebbero assumere farmaci specifici per controllare tale manifestazione e bere molti liquidi. L'Irinotecano può anche indurre mielosoppressione, portando ad una diminuzione delle cellule del sistema immunitario. Questo potrebbe portare all'insorgenza di gravi infezioni. Inoltre le donne che assumono Irinotecano non dovrebbero intraprendere gravidanze, perché il farmaco può causare gravi danni allo sviluppo del feto.

La tempestiva comparsa di gravi e spesso anche letali effetti avversi ascrivibili all'utilizzo dell'Irinotecano viene attribuita principalmente ad un difetto nell'attività dell'UDP-glucuronosiltrasferasi (UGT) enzima chiave per la detossificazione epatica del metabolita attivo del farmaco. Da recenti studi è emerso che il gene codificante per l'enzima UGT è altamente polimorfico: sono state infatti identificate numerose varianti alleliche, la cui frequenza può variare significativamente all'interno della stessa popolazione, ma anche in base al gruppo etnico considerato (Beutler E et al, 1998).

### ***Uridin-difosfo-glucuroniltrasferasi (UGT)***

Le UDP-glucuronosiltrasferasi (UGT) sono una famiglia di enzimi detossificanti che coniugano con l'acido glucuronico un'ampia varietà di composti endogeni (bilirubina, acidi biliari, ormoni steroidei) ed esogeni (farmaci, pesticidi, componenti del tabacco). I metaboliti formati da queste reazioni sono generalmente meno tossici e più facilmente idrosolubili, e ciò facilita la loro escrezione renale e biliare. Le UGT sono proteine transmembrana localizzate tra il reticolo endoplasmatico, dove hanno il loro sito attivo, e la membrana nucleare degli epatociti e di molte altre cellule.

Gli enzimi UGT sono divisi in due famiglie, UGT1 e UGT2. Il gruppo UGT1 consiste di isoforme multiple di esoni specifici che sono espressi per uno splicing alternativo dell'esone 4, che è presente in ciascun membro della famiglia UGT1. Nove isoenzimi funzionali di UGT1 (UGT1A1, UGT1A3--UGT1A10) sono stati caratterizzati e tutti derivano da un singolo locus genico localizzato sul cromosoma 2. Sono coinvolti principalmente nel metabolismo di composti esogeni ma anche di importanti substrati endogeni quali bilirubina e ormoni steroidei. Il complesso dei geni UGT2 è ulteriormente suddiviso nei sottogruppi UGT2A e UGT2B e i diversi isoenzimi UGT2 2A1, 2B4, 2B7, 2B10, 2B11, 2B15 e 2B17 sono invece coinvolti principalmente nella glucuronidazione di composti endogeni.

Il carcinoma del colon retto (CRC) ha mostrato un incremento dell'incidenza associata a fattori genetici e abitudini di vita. La suscettibilità individuale al CRC potrebbe essere dovuta in parte alle variazioni nella capacità detossificante del tratto gastrointestinale. I polimorfismi genetici degli enzimi detossificanti tra i quali l'UGT, possono portare a variazioni nell'attività detossificante influenzando i livelli di composti tossici e/o carcinogenetici e incrementando il rischio di CRC (E.M.J. van der Logt et al, 2005).

Molti membri della famiglia UGT1A sono espressi a bassi livelli nel colon. UGT1A7, UGT1A8 e UGT1A10 sono espressi invece solo in distretti extraepatici e risultano notevolmente rilevanti per la detossificazione nel colon (Strassburg C.P. et al, 1998). Esistono dati in letteratura che riportano l'esistenza di una relazione tra la presenza di alcune varianti alleliche polimorfiche di diversi isoenzimi di UGT1A (come UGT1A7, UGT1A6 e UGT1A9) e l'aumentato

rischio di incidenza del tumore al colon (Strassburg CP, 2002; Leslie E. Carlini, 2005).

Numerosi studi di farmacogenetica sono stati condotti negli ultimi anni per valutare quale potesse essere l'impatto di alcune varianti genetiche del gene UGT nella modulazione della risposta e della tossicità al trattamento con Irinotecano. Alcuni studi hanno dimostrato che alcune varianti di questo enzima (UGT1A1\*28, UGT1A1\*6, UGT1A1\*60, UGT1A7\*3, UGT1A9\*22) sono più o meno correlate con una riduzione dell'espressione e/o della capacità enzimatica che si riflette in una riduzione nella detossificazione del metabolita attivo. Questo comporta un maggior rischio di sviluppo di tossicità e una maggior esposizione al farmaco nella sua forma attiva. Il polimorfismo che è risultato di maggiore impatto sulla riduzione della attività enzimatica nella popolazione caucasica è UGT1A1\*28.

I portatori omozigoti per il polimorfismo UGT1A1\*28 nel promotore di UGT1A1 mostrano una ridotta capacità epatica nel coniugare la bilirubina tramite UGT, portando ad una forma di iperbilirubinemia nota come sindrome di Gilbert (Monaghan, G. et al, 1996; Raijmakers, M.T.M. et al, 2000).

Recenti evidenze suggeriscono che la farmacocinetica e la tossicità da trattamento chemioterapico con Irinotecano risulti essere determinata dalla variabilità genetica a livello della regione TATA box del promotore del gene uridin-difosfoglucuroniltrasferasi di tipo 1A1 (UGT1A1).

E' stata individuata una correlazione tra polimorfismo nella regione promotore del gene che codifica per UGT1A1 e fenotipo metabolizzatore lento. Nella popolazione generale si osservano tre principali genotipi a livello del promotore di questo gene: il genotipo omozigote wild type, caratterizzato da 6 ripetizioni del dinucleotide timidina-adenina e denominato (TA) 6/6 (UGT1A1\*1/\*1), il genotipo omozigote mutato con 7 ripetizioni del dinucleotide TA denominato (TA) 7/7 (UGT1A1\*28/\*28), e il genotipo eterozigote denominato (TA) 6/7 (UGT1A1\*1/\*28) che possiede su un cromosoma l'allele wild type e sull'altro cromosoma l'allele con la ripetizione extra. L'introduzione del dinucleotide extra determina una diminuzione dell'attività enzimatica con conseguente aumento dei livelli del metabolita attivo dell'Irinotecano (SN-38) ed insorgenza di gravi effetti collaterali. In particolare, come recentemente mostrato, tra i pazienti trattati con Irinotecano, quelli aventi genotipo UGT1A1\*28/\*28 e UGT1A1\*1/\*28 mostrano

una maggiore severità di effetti avversi, tra cui diarrea e neutropenia, rispetto a pazienti con genotipo UGT1A1\*1/\*1.

La presenza di tale variante allelica si associava infatti a livelli più elevati di bilirubina (2.5 volte maggiori), ad un significativo aumento delle transaminasi (63 vs 24 UI/L) e ad una maggior frequenza di episodi di neutropenia (43% vs 13%) rispetto a quanto evidenziato nei soggetti wild-type richiedendo quindi una riduzione della dose del farmaco (Ando Y, 2000; Innocenti F et al, 2004).

L'analisi delle variante allelica UGT1A1\*28 può dunque essere utile da un punto di vista clinico per individuare i pazienti che possono beneficiare maggiormente della chemioterapia con Irinotecano o subirne gravi effetti tossici.

## ***2. Obiettivi dello studio***

Le varianti polimorfiche dei geni della UDP-glucuronosiltrasferasi (UGT) e della diidropirimidina deidrogenasi (DPD) sono correlate alla tossicità riscontrata nei soggetti affetti da carcinoma coloretale (CRC) trattati rispettivamente con Irinotecano e 5-Fluorouracile (5-FU), e spiegano alcuni possibili insuccessi di tali trattamenti farmacologici.

Per questa ragione gli obiettivi dello studio sono stati:

- Analizzare la frequenza della variante allelica UGT1A1\*28 e della variante allelica DPYD\*2A, in 32 soggetti con CRC che necessitano di un trattamento chemioterapico con Irinotecano, in monoterapia o associato con il 5-FU.
- Correlare la presenza del polimorfismo UGT1A1\*28 e del polimorfismo DPYD\*2A con l'eventuale tossicità manifestata nel corso della terapia.
- Evidenziare l'eventuale tossicità da *sindrome farmacogenetica combinata* dovuta alla copresenza di tali polimorfismi in entrambi gli enzimi nello stesso soggetto.

La peculiarità dello studio è data dal fatto che è condotto su 32 soggetti di razza siciliana, poiché non esistono ancora dati sulla frequenza allelica di queste varianti in tale popolazione.

### ***3. Materiali e metodi***



### ***3.1 Campione***

Per determinare la presenza della variante allelica UGT1A1\*28 della UDP-glucuronosiltrasferasi (UGT) e della mutazione IVS14+ 1G>A della diidropirimidina deidrogenasi (DPD) in soggetti con tumore coloretale sottoposti a trattamento con irinotecano e 5-FU e correlare il diverso genotipo dei soggetti con gli eventuali effetti tossici manifestati nel corso della terapia, è stato arruolato un campione composto da 32 pazienti.

Nella prima fase dello studio sono stati reclutati i pazienti ed è stata costituita una banca biologica per la conservazione dei campioni.

Per ogni paziente è stato effettuato un prelievo di circa 3-5 ml di sangue anticoagulato con EDTA e i campioni ematici sono stati conservati a temperatura controllata (-20°C).

E' stato allestito un archivio informatizzato per la raccolta dei dati clinico-patologici relativi a ciascun paziente. Questo è stato possibile grazie alla collaborazione con il gruppo clinico e di ricerca del reparto di Oncologia del Policlinico "P. Giaccone" di Palermo.

L'età media è risultata di  $66,6 \pm 12$  anni (range: 40-82) dei quali 11 (34%) di sesso femminile e 21 (66%) di sesso maschile, tutti con CRC metastatico di etnia caucasica e origine siciliana.

9 pazienti sono stati sottoposti a trattamento con Irinotecano da solo, 14 ad Irinotecano in associazione con 5-FU e acido folinico, 3 con 5-FU in associazione con oxaliplatino e acido folinico (FOLFOX), 5 con capecitabina in associazione con oxaliplatino (CAPOX) e 1 con capecitabina da sola.

Per l'Irinotecano il dosaggio utilizzato è  $50/80 \text{ mg/m}^2$  settimanale e  $150/180 \text{ mg/m}^2$  bisettimanale. Per il 5-FU il dosaggio utilizzato è  $400-600 \text{ mg/m}^2$  bis/die. Per la capecitabina è stato utilizzato un dosaggio pari a  $1250 \text{ mg/m}^2$  bis/die da sola e  $1000 \text{ mg/m}^2$  bis/die in associazione con oxaliplatino. La dose di oxaliplatino somministrata è di  $85 \text{ mg/m}^2$  nello schema FOLFOX e  $100-130 \text{ mg/m}^2$  nello schema CAPOX.

Tutti i pazienti hanno espresso il loro consenso informato a partecipare allo studio.

### ***3.2 Estrazione e purificazione del DNA genomico***

Il DNA è stato estratto e purificato da 200 µl di sangue umano intero grazie all'impiego di un kit della Qiagen (QIAamp DNA Mini Kit).

Da 200 µl di sangue intero umano si ottengono circa 6 µg di DNA che viene risospeso in 200 µl di acqua (30 ng/ml).

Il protocollo del kit prevede la preparazione di una miscela costituita da proteinasi K e campione, alla quale viene aggiunto Buffer AL ed etanolo. La soluzione viene trasferita nella QIAamp Spin Column alla quale vengono aggiunti Buffer AW1 e Buffer AW2 ed, infine, Buffer AE o acqua distillata.

La procedura prevede varie fasi: inizialmente portare 20 µl di proteinasi K in un tubo da 1,5 ml e aggiungere 200 µl di campione (sangue intero) nel tubo. Aggiungere 200 µl di Buffer AL al campione. Agitare al vortex per 15 secondi. Incubare a 56°C per 10 minuti. Centrifugare il tubo da 1,5 ml per rimuovere eventuali gocce all'interno del coperchio. Aggiungere 200 µl di etanolo (96-100%) al campione e agitare al vortex per 15 secondi. Centrifugare brevemente per rimuovere eventuali gocce all'interno del coperchio. Trasferire la miscela nella QIAamp Spin Column (inserita in un tubo di raccolta da 2 ml). Chiudere il tappo e centrifugare a 6000 g per 1 minuto e scartare il tubo da 2 ml che contiene il filtrato. Aggiungere 500 µl di Buffer AW1 e centrifugare a 6000 g per 1 minuto, scartare il tubo che contiene il filtrato e mettere la colonna in un nuovo tubo da 2 ml. Aggiungere 500 µl di Buffer AW2 e centrifugare a 20000 g per 3 minuti. Scartare il tubo che contiene il filtrato, inserire la colonna in un tubo nuovo e centrifugare nuovamente per 1 minuto per eliminare eventuali residui del buffer AW2. Trasferire la colonna in un tubo da 1,5 ml e scartare il tubo che contiene il filtrato. Aggiungere 200 µl di Buffer AE o acqua distillata. Incubare 5 minuti a temperatura ambiente e centrifugare a 6000 g per 1 minuto. Recuperare l'eluato (DNA estratto). Conservare a temperatura controllata (-20°C).

### ***3.3 Quantizzazione del DNA***

Il DNA estratto è stato quantizzato tramite lettura spettrofotometrica a 260 nm. 2 µl di DNA sono stati diluiti in 100 µl di acqua (fattore di diluizione 1:50). Sono state utilizzate cuvette con passo di 10 nm.

### ***3.4 PCR e analisi RFLP (Restriction fragment length polymorphism)***

Per analizzare la presenza del polimorfismo per le ripetizioni TA presenti nel promotore del gene UGT1A1, è stata condotta una reazione di amplificazione a catena (PCR) con l'utilizzo di opportuni primers.

Le sequenze dei primers senso e antisenso utilizzati (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) sono rispettivamente:

5'-AAA TTC CAG CCA GTT CAA CTG TTG TT-3' (senso) e

5'-TTT CTG CTG GAT GGC CCC AAG-3' (antisenso)

Sono stati utilizzati 200 ng di DNA genomico. La miscela di reazione è costituita da 1X High Fidelity PCR Buffer ( 600 mM TRIS-SO<sub>4</sub> pH 8.9, 180 mM ammonio solfato), 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.2 mM dNTP, 20 pmoli primer senso e 20 pmoli primer antisenso, 1.5 U Platinum taq High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in un volume finale di 50 µl.

L'amplificazione consiste nella ripetizione di una fase di denaturazione a 94°C per 1 minuto, annealing a 62°C per 1 minuto ed estensione a 72°C per 1 minuto, per 34 cicli, tra una fase di denaturazione iniziale a 94°C per 5 minuti ed un'estensione finale a 72°C per 5 minuti.

I prodotti della PCR (10 µl. per campione) sono stati analizzati tramite elettroforesi su gel di agarosio all'1% per verificare l'avvenuta amplificazione.

E' stata condotta, infine, un'analisi su gel di poliacrilammide per discriminare l'eventuale presenza delle due bande con diverso peso molecolare corrispondenti all'allele wild type (98 bp) e quello mutato (100 bp). E' stata utilizzata la poliacrilammide 19:1 (stock 30%) e il gel al 12% è stato realizzato come segue:

Gel 12%:

30% acril. 19:1	Acqua	10X TBE	10 % APS	TEMED
2,4 ml	3 ml	0,6ml	100 µl	5 µl

Sono stati caricati 20 µl campione di PCR più 4 µl di Sample buffer 6 X e i marker 10 bp (7µl) e 20 bp (7 µl).

La corsa è avvenuta a 64 volts per 5 ore. Infine, è stata effettuata una colorazione con Etidio Bromuro per 30 minuti e 30 minuti in acqua. La visualizzazione delle bande è avvenuta al transilluminatore.

Per analizzare la presenza della variante polimorfica IVS14+ 1G>A per il gene della DPD è stata condotta un'analisi RFLP, che permette di identificare la presenza dell'alterazione in base alla variazione della lunghezza dei frammenti di restrizione ottenuti dopo specifica digestione enzimatica.

Il DNA dei 32 pazienti è stato amplificato con opportuni primers (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Le sequenze dei primers senso e antisenso utilizzati sono rispettivamente:

5'-ATCAGGACATTGTGACATATGTTTC-3' (senso) e

5'-CTTGTTTTAGATGTTAAATCACACATA-3' (antisenso)

La PCR è stata condotta utilizzando 200 ng di DNA genomico. La miscela di reazione è costituita da 1X High Fidelity PCR Buffer ( 600 mM TRIS-SO<sub>4</sub> pH 8.9, 180 mM ammonio solfato), 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.2 mM dNTP, 10 pmoli primer senso e 10 pmoli primer antisenso, 1.5 U Platinum taq High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in un volume finale di 50 µl.

Il programma di amplificazione consiste nella ripetizione di una fase di denaturazione a 96°C per 1 minuto, annealing a 60°C per 1 minuto ed estensione a 72°C per 1 minuto, per 35 cicli, tra una fase di denaturazione iniziale a 96°C per 5 minuti ed un estensione finale a 72°C per 5 minuti.

I prodotti della PCR (10 µl per campione) sono stati analizzati tramite elettroforesi su gel di agarosio all'1% per verificare l'avvenuta amplificazione.

L'analisi per restrizione del prodotto di PCR è stata condotta in un volume finale di 20 µl. 10 µl di prodotto di amplificazione sono stati digeriti con 10 unità di enzima Nde I (New England Biolabs, Inc., 240 Country Road, Ipswich, MA 01938, USA) per 2 ore a 37°C.

I frammenti di DNA sono stati separati su gel d'agarosio al 3% e visualizzati con bromuro d'etidio.

### ***3.5 Sequenziamento del DNA***

La presenza del dinucleotide aggiuntivo TA nel promotore del gene UGT1A1 è stata valutata attraverso il successivo sequenziamento del DNA mediante elettroforesi capillare (ABI Prism 310) utilizzando gli stessi primers e la BigDye™ terminator mix (Applied Biosystems).

### ***3.6 Analisi Statistica***

Sono state valutate le frequenze alleliche e genotipiche per UGT1A1\*28 e DPYD\*2A per verificare l'equilibrio di Hardy-Weinberg; per confrontare le frequenze attese con quelle osservate è stato applicato il test del  $\chi^2$ .

## ***4. Risultati***

#### 4.1 Frequenza della variante allelica UGT1A1\*28

L'analisi del polimorfismo per le ripetizioni TA presenti nel promotore del gene UGT1A1, è stata condotta mediante una reazione di amplificazione a catena (PCR) con l'utilizzo di opportuni primers, come descritto nei materiali e metodi.

Inizialmente il prodotto di amplificazione è stato analizzato su gel di poliacrilamide al 12% colorato con etidio bromuro, per visualizzare le due bande con diverso peso molecolare corrispondenti all'allele wild type (con 6 ripetizioni TA) di 98 pb e a quello mutato di 100 bp (con 7 ripetizioni TA).

Per discriminare meglio l'eventuale presenza del dinucleotide TA aggiuntivo, tutti i prodotti amplificati sono stati successivamente sequenziati mediante elettroforesi capillare utilizzando gli stessi primers.

L'analisi genotipica dei 32 soggetti ha mostrato come il 34% dei pazienti analizzati fosse portatore del polimorfismo UGT1A1\*28.

Le frequenze genotipiche per (TA)<sub>6</sub>/<sub>6</sub> (UGT1A1\*1/\*1), (TA)<sub>6</sub>/<sub>7</sub> (UGT1A1\*1/\*28) e (TA)<sub>7</sub>/<sub>7</sub> (UGT1A1\*28/\*28) sono risultate rispettivamente del 66% (n = 21 pazienti), 19% (n = 6 pazienti) e 15% (n = 5 pazienti) (Tabella 7).

**Tabella 7.** Distribuzione dei genotipi di UGT1A1

<b>UGT1A1</b>	<b>Status allelico</b>	<b>N. soggetti</b>	<b>Percentuale d'espressione</b>
	*1/*1	21	66 (21/32)
	*1/*28	6	19 (6/32)
	*28/*28	5	15 (5/32)

Le frequenze alleliche di UGT1A1\*1 e della variante UGT1A1\*28 sono risultate dello 0.75 e 0.25 (Tabella 8). Nella popolazione caucasica la frequenza allelica è stimata 0.387, mentre risulta più bassa nelle regioni asiatiche circa 0.16 e più elevata nella popolazione africana 0.426 (Beutler et al 1998).

**Tabella 8.** Frequenze alleliche

<b>UGT1A1</b>	<b>Status allelico</b>	<b>N. alleli</b>	<b>Frequenza allelica</b>
	*1	48	0.75 (48/64)
	*28	16	0.25 (16/64)

Le diverse frequenze genotipiche calcolate nei 32 soggetti analizzati non hanno dimostrato alcuna differenza statisticamente significativa rispetto a quelle previste dall'equilibrio di Hardy-Weinberg, confermando così l'attendibilità delle determinazioni genotipiche.



## 4.2 Correlazione tra presenza del polimorfismo UGT1A1\*28 e tossicità manifestata nel corso della terapia con Irinotecano

La registrazione durante il corso della terapia dei dati riguardanti gli effetti avversi manifestati dai pazienti, ha permesso di correlare i dati ottenuti dall'analisi genotipica con la tossicità osservata per ciascun paziente.

Nei 23 soggetti trattati con Irinotecano (da solo o in associazione con 5-FU) è stato possibile rilevare un aumento di neutropenia (grado 2) dal 6,7% nei soggetti omozigoti wild type, UGT1A1\*1/\*1, al 12,5% nei pazienti omo o eterozigoti per la variante allelica UGT1A1\*28 (Tabella 9).

**Tabella 9.** Correlazione tra la presenza dell'allele polimorfico UGT1A1\*28 e la tossicità manifestata

	<b>Genotipo UGT1A1*1/*1</b>	<b>Percentuale sul totale</b>	<b>Genotipi UGT1A1*1/*28 e UGT1A1*28/*28</b>	<b>Percentuale sul totale</b>
<b>Tot n. soggetti</b>	15 (6F, 9M)		8 (2F, 6M)	
<b>Tossicità</b>				
<b>Neutropenia</b>				
<b>G 1-2</b>	1(F)	6,7 (1/15)	1(M)	12,5 (1/8)
<b>G 3,4</b>	-	-	-	-
<b>Diarrea</b>				
<b>G 1-2</b>	2(1M,1F)	13,3 (2/15)	2 (M)	25 (2/8)
<b>G 3,4</b>	-	-	2 (1F, 1M)	25 (2/8)

(F = femmina, M = maschio)

Inoltre si evidenzia un incremento di tossicità a livello gastrointestinale nei soggetti portatori della mutazione sia in eterozigosi che in omozigosi.

Si è osservato un aumento della percentuale di pazienti che manifestano diarrea (grado 2 e 3), dal 13,3% nei soggetti wild type al 50% in quelli portatori del polimorfismo (in particolare dal 13,3% al 25% per diarrea G2 e dallo 0 % al 25% per diarrea G3).

Diversi sono gli studi che evidenziano un rischio più elevato di neutropenia severa nei soggetti con genotipo omozigote mutato (\*28/\*28) (Innocenti F et al, 2004; Christoph Schulz et al, 2009). Un dato interessante è emerso tuttavia dallo studio di Roth e collaboratori (Roth AD et al, 2008) nel quale il sesso femminile è considerato come fattore prognostico superiore ad UGT1A1 nel predire tossicità ematologica grave dopo trattamento con Irinotecano.

Pertanto abbiamo voluto verificare se anche nella nostra popolazione la tossicità manifestata dai soggetti wild type potesse essere associata al sesso femminile. In tabella 10 sono messe a confronto le percentuali delle frequenze alleliche tra individui di sesso diverso al fine di evidenziare la loro distribuzione nella nostra popolazione.

**Tabella 10.** Frequenze alleliche nei due sessi

<b>Sesso</b>	<b>n. soggetti</b>	<b>Status allelico</b>	<b>n. soggetti</b>	<b>Percentuale sul totale</b>
<b>Maschio</b>	21	*1/*1	13	62 (13/21)
		*1/*28	4	19 (4/21)
		*28/*28	4	19 (4/21)
<b>Femmina</b>	11	*1/*1	8	73 (8/11)
		*1/*28	2	18 (2/11)
		*28/*28	1	9 (1/11)

Nei pazienti di sesso femminile (34%) il 27% è risultato portatore della mutazione (18% in eterozigosi, 9% in omozigosi) e il 73% omozigote wild type, mentre dei soggetti di sesso maschile (66%) il 38% presenta la mutazione (19% in eterozigosi e il 19% in omozigosi) e il 62% risulta invece omozigote wild type .

I risultati non hanno mostrato quindi una differenza rilevante nell'espressione della variante polimorfica tra la popolazione di sesso femminile (n. 11 soggetti) e quella maschile (n. 21 soggetti) in accordo con la letteratura (Liu JY et al 2007).

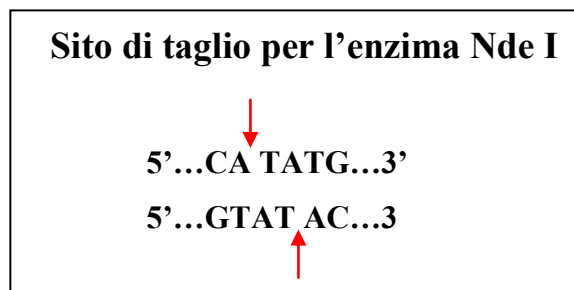
In aggiunta la tossicità rilevata nei 23 pazienti trattati con Irinotecano (solo o in associazione al 5-FU) (tabella 9) ha evidenziato negli individui con genotipo wild type la comparsa di tossicità gastrointestinale (diarrea G2) in un soggetto di sesso

maschile e in uno di sesso femminile, mentre l'unico episodio di tossicità ematologica riscontrato è associato ad un soggetto di sesso femminile (neutropenia G2). Nei soggetti portatori della mutazione (in omozigosi o in eterozigosi) si riscontra un episodio di neutropenia di grado 2 in un paziente di sesso maschile; per quanto riguarda la tossicità gastrointestinale invece un caso è associato ad un individuo di sesso femminile, i restanti tre episodi si sono verificati in soggetti di sesso maschile. Pertanto non sembra esserci un effetto del sesso per entrambe le tossicità.

### 4.3 Valutazione della presenza della variante allelica DPYD\*2A

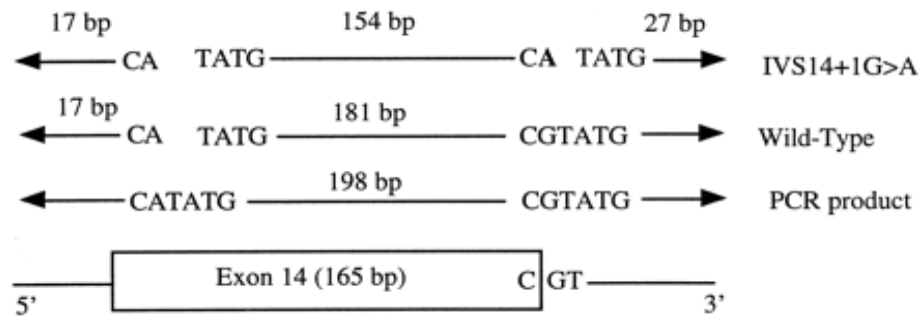
Poiché nella maggior parte dei pazienti analizzati (14 su 32) l'Irinotecano è associato in terapia con il 5-FU e 3 pazienti sono inoltre trattati solo con 5-FU e 6 con il suo profarmaco Capecitabina, è stata analizzata la presenza della variante polimorfica IVS14+1G>A per il gene della DPD in tutti i 32 pazienti. Obiettivo è stato verificare quali fossero le percentuali delle frequenze alleliche nella nostra popolazione, correlare i dati ottenuti dall'analisi genotipica con la tossicità osservata da 5-FU in ciascun paziente e evidenziare un eventuale tossicità dovuta a *sindrome farmacogenetica combinata* nei pazienti portatori del polimorfismo UGT1A1\*28.

E' stata condotta un'analisi RFLP. Il DNA dei 32 pazienti è stato amplificato con opportuni primers. Il primer antisenso contiene una variazione in una base che consente di inserire all'interno della sequenza amplificata, un sito di restrizione per l'enzima Nde I in presenza della mutazione G>A nel sito di splicing alla fine dell'esone 14.



La digestione enzimatica permette di identificare la mutazione IVS14+1G>A poiché genera nella sequenza mutata frammenti di lunghezza diversa rispetto a quelli ottenuti dalla sequenza wild type.

Come controllo positivo dell'efficienza di digestione per Nde I è stato inserito un sito di restrizione aggiuntivo per tale enzima nella regione 5' dell'amplificato grazie all'uso di un primer senso contenente una sostituzione in una base (A>T).

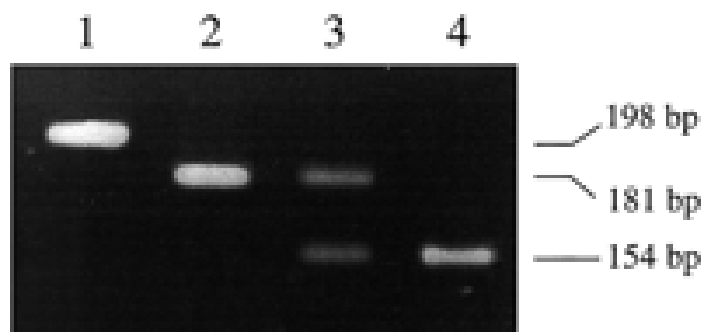


**Fig. 8** Siti di taglio per Nde I nei diversi alleli.

In questo modo il frammento non digerito avrà una lunghezza pari a 198 bp, dopo digestione l'allele wild type darà due frammenti di 181 bp e 17 bp (Fig.8 e 9).

Diversamente l'allele contenente la mutazione G>A nel sito di splicing dell'esone 14 produrrà tre frammenti di 17 bp, 154 bp, e 27 bp dopo digestione con Nde I.

Così nel caso in cui la mutazione si presenti in eterozigosi si evidenzieranno quattro frammenti di 181 bp, 17 bp, 154 bp, e 27 bp.



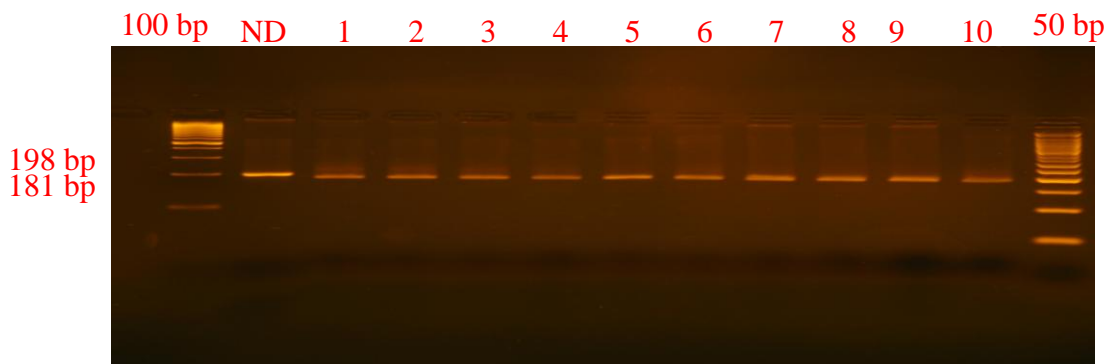
**Fig. 9** Elettroforesi rappresentativa dei prodotti della digestione con Nde I su gel d'agarosio al 3%. 1: frammento non digerito (198 bp); 2: omozigote wilde type (181 bp e 17 bp); 3: eterozigote (181 bp, 154 bp, 27 bp e 17 bp); 4: omozigote mutato (154 bp, 27 bp e 17 bp).

La figura 10 è un'analisi rappresentativa (10 soggetti) ottenuta tramite elettroforesi su gel d'agarosio al 3% del risultato riscontrato in tutti i pazienti.

Nella prima linea è indicato il prodotto dell'amplificazione non digerito (ND) di peso molecolare pari a 198 bp.

I campioni digeriti (da 1 a 10) mostrano tutti una banda di 181 bp, quella di 17 bp non si evidenzia nel gel.

Tutti i 32 campioni esaminati hanno mostrato lo stesso risultato. In nessuno è stata riscontrata la presenza della variante polimorfica IVS14+1G>A indicando che si tratta di soggetti omozigoti wild type, con una frequenza allelica del 100%.



**Fig. 10** Elettroforesi su gel d'agarosio al 3% di 10 campioni amplificati per DPD digeriti con Nde I.

Non è stata osservata tossicità rilevante in nessuno dei 9 soggetti esaminati trattati con il 5-FU o il suo pro farmaco, Capecitabina.

Questi dati sono in accordo con quelli riportati in letteratura. La variante DPYD\*2A risulta presente solo nella popolazione caucasica dove è comunque molto rara, mediamente intorno allo 0,7% (Ridge et al, 1998). Non è stata invece evidenziata né nella popolazione giapponese né in quella afro-americana (Sulzyc-Bielicka V et al, 2008).

Pertanto è ragionevole, dato il numero dei soggetti analizzati, che non sia stata riscontrata nel nostro campione di pazienti.

## ***5. Discussione e conclusioni***

Lo scopo della ricerca proposta è stato quello di analizzare la presenza delle varianti alleliche UGT1A1\*28 della UDP-glucuronosiltrasferasi (UGT) e DPYD\*2A della diidropirimidina deidrogenasi (DPD) in soggetti con tumore colon rettale sottoposti a trattamento con Irinotecano e 5-Fluorouracile (o il suo profarmaco Capecitabina) e correlare il diverso genotipo dei soggetti con gli eventuali effetti tossici manifestati nel corso della terapia.

L'uso di Irinotecano in associazione con il 5-Fluorouracile (5-FU) e acido folico trova largo impiego oggi nella terapia del carcinoma del colon retto (CRC).

Il 5-Fluorouracile (5-FU) è uno dei chemioterapici antitumorali più utilizzati in terapia. La sua ampia diffusione dovuta all'efficacia clinica e alla buona tollerabilità ha messo tuttavia in evidenza l'insorgenza di effetti tossici di particolare gravità in una piccola percentuale di pazienti (<1%).

I soggetti che hanno sviluppato tossicità particolarmente gravi dopo la somministrazione di 5-FU hanno presentato un difetto metabolico consistente in un ridotto catabolismo e inattivazione del 5-FU a 5-fluoro-5,6-diidrouracile (5-FDHU) (Diasio RB et al, 1988; Bocci G. et al, 2000).

L'enzima che regola tale tappa metabolica è la diidropirimidinadeidrogenasi (DPD), un enzima citosolico ubiquitario, presente in molti tessuti tra cui il fegato, la mucosa intestinale ed i leucociti del sangue periferico (Diasio RB, Lu Z, 1994). La DPD agisce riducendo il doppio legame dell'anello pirimidinico e formando il 5-fluoro-5,6-diidrofluorouracile (5-FDHU). Pazienti con bassa attività enzimatica della DPD per la presenza di suoi polimorfismi non sono in grado di inattivare con efficienza il 5-FU, con il risultato di un accumulo del farmaco che può causare gravi tossicità ematologiche, neurologiche e gastrointestinali (Van Kuilenburg ABP et al, 2000; Gamelin E et al, 1999).

Sebbene un'alta percentuale delle tossicità da 5-FU osservate possano essere dovute a deficienze enzimatiche distinte dalla DPD (polimorfismi a carico del gene della Timidilato Sintetasi e/o del gene dell'enzima Metiltetraidrofolico-reduttasi) (Pullarkat ST et al, 2000; Toffoli G et al, 2000) ed esistano numerose mutazioni del gene DPD che possono portare all'assenza totale di attività enzimatica, la variante allelica, conosciuta anche come allele DPYD\*2A, è presente in circa l'1% (Ridge SA et al, 1998) della popolazione generale e rende conto di circa il 50% di tutte le deficienze di DPD. Tale mutazione ha come

risultato la sintesi di un enzima funzionalmente inattivo trasmesso in modo autosomico recessivo.

Diversi farmaci sono stati studiati in associazione o meno con il 5-FU per cercare di migliorare la sopravvivenza in pazienti affetti da carcinoma metastatico del colon-retto in fase avanzata, tra questi l'Irinotecano (CPT-11) riveste un ruolo principale. Tuttavia nonostante l'Irinotecano sia dotato di potente attività antitumorale, il suo impiego clinico è fortemente limitato dal verificarsi di gravi reazioni avverse quali diarrea e mielosoppressione. Recenti evidenze suggeriscono che la farmacocinetica e la tossicità dell'Irinotecano risulti essere determinata dalla variabilità genetica a livello della regione TATA box del promotore del gene uridin-difosfo-glucuroniltrasferasi di tipo 1A (UGT1A).

Il metabolita attivo dell'Irinotecano, SN-38, viene inattivato in forma di glucuronide a livello epatico (SN-38G) dall'enzima UGT1A1. E' stata individuata una correlazione tra un polimorfismo nella regione promotore del gene che codifica per UGT1A1 e fenotipo metabolizzatore lento.

La presenza della variante allelica polimorfica, nota come UGT1A1\*28, caratterizzata dall'introduzione di un dinucleotide extra timidina-adenina a livello della regione TATA box del promotore del gene, determina una diminuzione del trascritto mRNA con conseguente riduzione dell'attività enzimatica, aumento dei livelli del metabolita attivo SN-38 e possibile insorgenza di gravi effetti indesiderati.

In particolare, tra i pazienti trattati con Irinotecano, quelli aventi genotipo UGT1A1\*28/\*28 e UGT1A1\*1/\*28 mostrano una maggiore severità di effetti avversi, tra cui diarrea e neutropenia, rispetto a pazienti con genotipo UGT1A1\*1/\*1 richiedendo quindi una riduzione della dose del farmaco.

E' stato osservato come la presenza del genotipo UGT1A1\*28/\*28 determina un aumento del rischio di neutropenia non solo dopo somministrazione di Irinotecano ad alto ( $\geq 250$  mg/m<sup>2</sup>) e medio dosaggio (150-250 mg/m<sup>2</sup>), ma anche nel caso di regimi chemioterapici comprendenti basse (<150 mg/m<sup>2</sup>) dosi. Tuttavia la modalità dose-dipendente del grado di glucuronazione di SN-38 spiega come il rischio di neutropenia nei pazienti UGT1A1\*28/\*28 possa aumentare considerevolmente quando l'Irinotecano viene somministrato ad alto dosaggio (Hu ZY et al, 2010 A).



Nel caso di regimi chemioterapici comprendenti Irinotecano a dosaggio alto e dosaggio medio sembra pertanto essere giustificata la raccomandazione di riduzione della dose iniziale di Irinotecano nei pazienti UGT1A1\*28/\*28, dato l'aumentato rischio sia di neutropenia che di diarrea di grado severo, mentre nel caso di basse dosi la decisione di ridurre la dose nei pazienti UGT1A1\*28/\*28 dovrebbe tener conto anche dell'eventuale presenza di fattori clinici associati al rischio di tossicità da Irinotecano (bassa conta basale di neutrofili, sesso femminile), o altri fattori genetici di rischio (UGT1A1\*93, ABCC1 IV11-48C>T) (Hu ZY et al, 2010 B).

L'analisi della variante allelica UGT1A1\*28 e lo screening per la mutazione della DPD, IVS14+ 1G>A, in soggetti con CRC che necessitano di un trattamento chemioterapico con Irinotecano, in monoterapia o associato con il 5-FU, risulta pertanto di particolare interesse nella pratica clinica oncologica per individuare i pazienti che possono risentire meno della tossicità del chemioterapico.

Lo studio si è proposto di esaminare il DNA proveniente da 32 pazienti neoplastici con carcinoma del colon retto, per caratterizzare la presenza di tali polimorfismi. Questo ha consentito di valutare la correlazione tra presenza del polimorfismo UGT1A1\*28 e tossicità da Irinotecano, e quella tra il polimorfismo DPYD\*2A e tossicità da 5-Fluorouracile, evidenziando eventualmente anche tossicità da *sindrome farmacogenetica combinata* dovuta alla copresenza di tali polimorfismi nello stesso soggetto trattato con i due farmaci in associazione (Steiner M et al, 2005).

La peculiarità dello studio è data dal fatto che è condotto su soggetti di razza siciliana, poiché non esistono ancora dati sulla frequenza allelica di queste varianti in tale popolazione.

Nella prima fase del progetto è stato effettuato il reclutamento dei pazienti, costituita una banca biologica per la conservazione dei campioni e allestito un archivio informatizzato per la raccolta dei dati clinico-patologici relativi a ciascun paziente. Questo è stato possibile grazie alla collaborazione con il gruppo clinico e di ricerca del reparto di Oncologia del Policlinico "P. Giaccone" di Palermo.

Sono stati arruolati 32 soggetti, dei quali 11 (34%) di sesso femminile e 21 (66%) di sesso maschile, tutti con CRC metastatico. 9 pazienti sono stati sottoposti a trattamento con Irinotecano da solo, 14 ad Irinotecano in associazione con 5-FU e

acido folinico, 3 con 5-FU (in associazione con oxalipatino e acido folinico) e 6 con Capecitabina (5 in associazione con oxalipatino e 1 da sola).

Il 34% dei pazienti analizzati è risultato portatore del polimorfismo UGT1A1\*28, e le frequenze genotipiche per (TA)6/6 (UGT1A1\*1/\*1), (TA)6/7 (UGT1A1\*1/\*28) e (TA)7/7 (UGT1A1\*28/\*28) sono state rispettivamente del 66% (n = 21 pazienti), 19% (n = 6 pazienti) e 15% (n = 5 pazienti).

Le frequenze alleliche di UGT1A1\*1 e della variante UGT1A1\*28 sono risultate così dello 0.75 e 0.25.

Nella popolazione caucasica la frequenza genica di (TA)7/7 è stimata circa tra il 5-15% (frequenza allelica 0.387), mentre risulta più bassa nelle regioni asiatiche 1,2-5% (frequenza allelica 0.16) e più elevata nella popolazione africana 12-27% (frequenza allelica 0.426) (Beutler et al 1998; Liu JY et al, 2007; Hugo Girard et al, 2008).

La frequenza allelica risultata dal nostro studio è inferiore rispetto quella riportata in altre popolazioni caucasiche. Questo potrebbe dipendere dal numero limitato di campioni esaminati o rappresentare invece una peculiarità della nostra popolazione composta da soggetti siciliani. Pertanto questo dato richiederebbe un ulteriore approfondimento con l'ausilio di una casistica più ampia.

Correlando i dati ottenuti dall'analisi genotipica con la tossicità osservata nei 23 soggetti trattati con Irinotecano (9 da solo, 14 in associazione con 5-FU) è stato possibile rilevare un aumento di neutropenia (grado 2) dal 6,7% nei soggetti omozigoti wild type, UGT1A1\*1/\*1, al 12,5% nei pazienti omo o eterozigoti per la variante allelica UGT1A1\*28.

Un incremento di tossicità notevole è stato riscontrato invece a livello gastrointestinale nei soggetti portatori della mutazione sia in eterozigosi che in omozigosi. Le percentuali di pazienti che manifestano diarrea (grado 2 e 3) passano da 13,3% nei soggetti wild type al 50% in quelli portatori del polimorfismo.

Alcuni autori hanno mostrato come il sesso femminile sia spesso un fattore prognostico superiore ad UGT1A1 nel predire tossicità (neutropenia di grado elevato) dopo trattamento con Irinotecano (Roth AD et al, 2008).

Considerando le differenze nelle percentuali tra individui di sesso diverso nel nostro campione di pazienti, nei soggetti di sesso femminile (34%) il 27% è risultato portatore della mutazione e il 73% omozigote wild type, mentre dei

soggetti di sesso maschile (66%) il 38% presenta la mutazione e il 62% risulta invece omozigote wild type.

E' noto che la distribuzione dei genotipi per UGT1A1 non varia con il sesso nella popolazione caucasica (Liu JY et al, 2007). Anche nel nostro campione non sembra esserci una differenza nella distribuzione delle varianti alleliche tra i due sessi.

Correlando la tossicità evidenziata nei soggetti con genotipo wild type con il sesso è stata osservata tossicità gastrointestinale (diarrea G2) in un soggetto di sesso maschile e in uno di sesso femminile. L'unico episodio di tossicità ematologica riscontrato (neutropenia G2) è invece associato ad un individuo di sesso femminile. Questo risultato potrebbe essere in accordo con i dati di Roth e collaboratori ma in realtà anche in questo caso l'ampliamento della casistica potrà consentire di confermare l'eventuale valore prognostico di tossicità, dopo trattamento con Irinotecano, del sesso femminile e darne una stima statisticamente significativa nella nostra popolazione.

Nei soggetti portatori della mutazione (in omozigosi o in eterozigosi) è stato registrato un episodio di neutropenia di grado 2 in un paziente di sesso maschile. Per quanto riguarda la tossicità gastrointestinale un caso è associato ad un individuo di sesso femminile, i restanti tre episodi sono a carico di soggetti di sesso maschile. Si può così concludere che pur considerando l'estrema esiguità dei dati non sembra ci sia un effetto del sesso, per entrambe le tossicità, in seguito a trattamento con Irinotecano.

Il genotipo UGT1A1\*1/\*28 o UGT1A1\*28/\*28 conferisce, quindi, un'alta probabilità di tossicità ematologica e gastrointestinale alle dosi usuali di Irinotecano (somministrazione a basso/medio dosaggio), tuttavia non spiega completamente casi di severa neutropenia e diarrea. D'altra parte è noto che altri fattori genetici e non genetici possono contribuire ad aumentare il rischio di tossicità indotta da Irinotecano nei pazienti. In particolare diversi studi mostrano il coinvolgimento di altri polimorfismi in geni che regolano la farmacocinetica e la farmacodinamica dell'Irinotecano influenzandone l'efficacia e la sua sicurezza; si tratta, ad esempio, delle varianti genetiche degli enzimi del citocromo P450 (CYP) e dei geni che codificano per la P-glicoproteina (ABCB1/MDR1).

Inoltre, in relazione alla provenienza etnica dei pazienti, è interessante notare come alcuni studi hanno indicato, ad esempio, come nella popolazione asiatica il

polimorfismo UGT1A1\*6 potrebbe avere un ruolo sinergico con il polimorfismo UGT1A1\*28 nella capacità di riduzione dell'attività enzimatica (Sai K, et al, 2008, Jada SR et al, 2007, Onoue M et al, 2009).

Bisognerebbe certamente tenere in considerazione che probabilmente la valutazione di una singola variante genetica non è sufficiente per stabilire quale possa essere il migliore trattamento da somministrare al paziente. Recentemente, infatti, il ruolo predittivo di tossicità ematologica è stato suggerito anche per altre varianti di UGT1A1, come il genotipo UGT1A7\*3/\*3 (Leslie E. Carlini, 2005).

Per UGT1A7, sono state descritte otto varianti alleliche, tuttavia solo quelle dall'UGT1A7\*1 al \*4 sono state identificate nella popolazione caucasica. La completa mancanza o una grave riduzione dell'attività enzimatica è riportata per la variante UGT1A7\*3, mentre una sostanziale riduzione è stata dimostrata per UGT1A7\*2 e UGT1A7\*4 (Guillemette C. et al, 2000). Inoltre la variante UGT1A7\*3 nella popolazione caucasica rappresenta un importante fattore di rischio per diversi tipi di tumore (nella cavità orale, al fegato, al colon e al pancreas) (Zheng Z et al, 2001; Vogel A et al, 2001; Strassburg CP, 2002; Ockenga J et al, 2003).

UGT1A è l'enzima deputato al catabolismo della bilirubina. La presenza in forma omozigote della variante polimorfica UGT1A1\*28, determinando una riduzione del 70% dell'attività enzimatica, è responsabile della sindrome di Gilbert, una delle cause più comuni di iperbilirubinemia nei soggetti caucasici (Monaghan G. et al, 1996; Raijmakers M.T.M. et al, 2000). Diverse varianti alleliche di UGT che in aggiunta alla UGT1A1\*28 sono associate a ridotta attività enzimatica non portano ad un danno epatico clinicamente rilevante, ma sono state oggetto di uno studio intensivo negli ultimi anni in quanto sembrano giocare un ruolo rilevante nel regolare il metabolismo anche di diversi farmaci non chemioterapici come statine, buprenorfina, estrogeni, che ne rappresentano dei substrati (Brian Burchell, 2000). In particolare UGT1A1, UGT1A3 e UGT2B7 sono responsabili della glucuronidazione di buprenorfina e norbuprenorfina. E' riportato come la presenza del polimorfismo UGT1A1\*28 è associata a riduzione del 28% della glucuronidazione della buprenorfina influenzandone la sua farmacocinetica (Rouguieg K et al, 2010).

Inoltre, è noto che gli inibitori delle proteasi di HIV, tra cui Indinavir e Azatanavir, pur non essendone substrato, sono in grado di inibire l'attività di

UGT1A e in maggior misura della variante UGT1A1\*28. La somministrazione di tali farmaci in soggetti portatori di polimorfismi di UGT1A potrebbe quindi portare ad una eccessiva riduzione di attività enzimatica, con effetti clinicamente rilevanti, causando la comparsa di iperbilirubinemia in pazienti HIV positivi trattati con inibitori delle proteasi (Lankisch TO et al, 2006).

Studi successivi hanno (Lankisch TO et al, 2009) confermato tali osservazioni, dimostrando inoltre che il rischio di iperbilirubinemia in pazienti trattati con Indinavir aumentava anche in presenza di altre varianti alleliche di UGT, tra cui UGT1A3-66T/C, UGT1A7-57T/G e UGT1A7N129K/R131K. Inoltre nei soggetti omozigoti per tutte le varianti alleliche considerate, compresa quella nota UGT1A1\*28, si osservava un aumento del rischio di insorgenza di iperbilirubinemia di grado severo (grado 4) pari al 100%. L'aplotipo derivante, presente nei soggetti omozigoti per tutte le 4 varianti genetiche considerate, è quindi un predittore sensibile della comparsa di tossicità nei pazienti trattati con inibitori delle proteasi. Per tali motivi, lo studio della variante polimorfica UGT1A1\*28 anche in soggetti non oncologici che manifestano particolari tossicità da farmaco potrebbe risultare utile e nello specifico, prevedere la comparsa di patologie quale la sindrome di Gilbert in quei soggetti sottoposti a trattamento cronico con Indinavir o altri inibitori delle proteasi.

L'analisi della variante allelica polimorfica IVS14+ 1G>A per il gene della DPD in tutti i 38 soggetti arruolati ha permesso di verificare quali fossero le percentuali della frequenze alleliche nella nostra popolazione. Tutti i pazienti sono risultati omozigoti wild type, con una frequenza allelica quindi del 100%. Non è stata evidenziata tossicità rilevante nei 9 soggetti trattati con 5-FU o Capecitabina in accordo con i risultati ottenuti dall'analisi genotipica dei pazienti.

La presenza della variante DPYD\*2A, evidenziata solo nella popolazione caucasica (Sulzyc-Bielicka V et al, 2008), è molto rara. In particolare è stata osservata una frequenza dello 0,2% in Polonia, 0,68% in Portogallo, 0,56% in Germania, 0,69% in Scozia, 0,65% in Turchia, 1,11% in Finlandia. La presenza del polimorfismo non è stata invece riscontrata né nella popolazione giapponese né in quella afro-americana (Sulzyc-Bielicka V et al, 2008).

I nostri risultati sono in accordo con i dati riportati in letteratura. Essendo molto rara è ragionevole, dato il numero dei soggetti analizzati, che tale variante allelica non sia stata individuata nel nostro campione di pazienti.

Questo ci lascia concludere che potrebbe essere la sola presenza del polimorfismo per l'enzima UGT ad influenzare la comparsa di aumentata tossicità nei pazienti trattati con Irinotecano e 5-FU, escludendo pertanto la possibilità di una *sindrome farmacogenetica combinata* nei soggetti analizzati portatori del polimorfismo UGT1A1\*28 (Steiner M et al 2005).

In conclusione i dati conseguiti, sebbene ottenuti da un numero limitato di soggetti, consentono comunque di considerare il significato di uno screening genetico per i pazienti sottoposti a trattamento con Irinotecano (da solo o in associazione a 5-FU) e in maniera prospettica, anche di quei soggetti con carcinoma del colon retto metastatico che seguono altri schemi terapeutici ma potrebbero successivamente essere sottoposti a trattamento con tale agente. Questo al fine di stabilire preventivamente chi può risentire più della terapia antitumorale con Irinotecano e individuare correttamente le dosi di farmaco da adoperare.

Appare comunque chiaro alla luce di quanto detto come ci siano numerose variabili da considerare nella personalizzazione della terapia su base farmacogenetica. Sebbene i polimorfismi genetici possano essere associati a scarsa efficacia e reazioni avverse ai farmaci, la loro effettiva rilevanza clinica deve essere ulteriormente approfondita.

Risultati più attendibili potrebbero derivare da un approccio fondato sullo studio di molteplici polimorfismi attraverso l'analisi di linkage su ampie regioni del genoma, piuttosto che dalla genotipizzazione di singoli geni, possibilmente attraverso l'uso di sistemi di analisi con microarrays.

Bisogna inoltre nuovamente ricordare che non soltanto le alterazioni genetiche a carico dell'ospite, ma anche quelle che caratterizzano le cellule neoplastiche possono influenzare la risposta ai farmaci antitumorali. E' importante quindi tenere in considerazione il fatto che il genoma del tumore è caratterizzato da un'elevata instabilità genetica e può, acquisendo durante la sua crescita moltissime mutazioni, influenzare l'aggressività tumorale e la sua farmaco-sensibilità o resistenza condizionando l'efficacia della terapia.

Pertanto l'approfondimento della conoscenza e delle tecniche di farmacogenetica potrà consentire di arrivare ad una personalizzazione dei trattamenti, cioè alla somministrazione di farmaci o combinazioni di essi, che siano efficaci per ciascun paziente, tenendo conto del suo specifico patrimonio genetico e delle

caratteristiche genetiche tumorali, permettendo di ottenere così la migliore risposta farmacologica possibile e una ridotta tossicità.

## ***6. Bibliografia***



- Ando Y. Polymorphisms of UDP glucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: a pharmacogenetic analysis. *Cancer Res* (2000) 60, 6921
- André T, Tournigand C, Achille E, Tubiana-Mathieu N, Lledo G, Raoul Y, Carola E, Flesch M, Muron T, Boutan-Laroze A, Guérin Meyer V, Boaziz C, Maigre M, Ganem G, Mousseau M, Mounedji-Boudiaf L, de Gramont A. Adjuvant treatment of colon cancer MOSAIC study's main results. *Bull Cancer* (2006) 1:93
- Astler V.B., F.A. Coller: The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* (1954) 136:846-851
- Bajetta E, Rimassa L, Di Bartolomeo M. Le fluoropirimidine: dal fluorouracile alle nuove molecole. *Argomenti di Oncologia* (1996) 17: 1-17
- Barratt PL, Seymour MT, Stenning SP, Georgiades I, Walker C, Birbeck K, Quirke P; DNA markers predicting benefit from adjuvant fluorouracil in patients with colon cancer: a molecular study. *Lancet* (2002) 2;360:1381-91
- Beutler E, Gelbart T, Demina A. Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? *Proc Natl Acad Sci USA* (1998) 95:8170-4.
- Bocci G, Danesi R, Di Paolo AD, Innocenti F, Allegrini G, Falcone A, Melosi A, Battistoni M, Barsanti G, Conte PF, Del Tacca M. Comparative pharmacokinetic analysis of 5-fluorouracil and its major metabolite 5-fluoro-5,6-dihydrouracil after conventional and reduced test dose in cancer patients. *Clinical Cancer Research* (2000) 6:3032-7
- Bonadonna G, Robustelli, Della Cuna G, Valagussa P. *Medicina Oncologica*, ottava edizione, Masson, Milano (2007)
- Bourke RS, West CR, Cheda G, Tower DB. Kinetics of entry and distribution of 5-fluorouracil in cerebrospinal fluid and brain following intravenous injection in a primate. *Cancer Res* (1973) 33: 1735-1740
- Brian Burchell, Matt Soars, Gemma Monaghan, Andy Cassidy, Debbie Smith, Brian Ethell Drug-mediated toxicity caused by genetic deficiency of UDP-glucuronosyltransferases *Toxicology Letters* (2000) 112–113, 333–340

- Christoph Schulz, Volker Heinemann, Andreas Schalhorn, Nikolas Moosmann, Thomas Zwingers, Stefan Boeck, Clemens Giessen, Hans-Joachim Stemmler. UGT1A1 gene polymorphism: Impact on toxicity and efficacy of irinotecan-based regimens in metastatic colorectal cancer. *World J Gastroenterol* (2009) 28; 15: 5058-5066
- Cohen JL, Irwin LE, Marshall GJ, Darvey H, Baterman JR. Clinical pharmacology of oral and intravenous 5-fluorouracil (NSC-19893). *Cancer Chemotherapy Report* (1974) 58:723-731
- Collins JM, Dedrick RL, King FG, Speyer JL, Myers CE. Nonlinear pharmacokinetic models for 5-fluorouracil in man: intravenous and intraperitoneal routes. *Clin Pharmacol Ther* (1980) 28: 235-243
- Danesi R, De Braud F, Fogli S, Di Paolo A, Del Tacca M. Pharmacogenetic determinants of anti-cancer drug activity and toxicity. *Trends in Pharmacological Sciences* (2001) 22:420-6
- Daniel Vallbø hmer, Dong Yun Yang, Hidekazu Kuramochi, D. Shimizu, Kathleen D. Danenberg, Jan Lindebjerg, Jens Nederby Nielsen, Anders Jakobsen and Peter V. Danenberg. DPD is a molecular determinant of capecitabine efficacy in colorectal cancer *International Journal of Oncology* (2007) 31: 413-418
- Diasio RB, Beavers TL, Carpenter JT. Familial deficiency of dihydropyrimidine dehydrogenase. Biochemical basis for familial pyrimidinemia and severe 5-fluorouracil- induced toxicity. *J Clin Invest* (1988) 81, 47–51.
- Diasio RB, Lu Z. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity and fluorouracil chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology* (1994) 11: 2239-2242
- Dukes C.E.: The classification of cancer of the rectum. *J Pathol*, (1932) 35:323-332
- E.M.J. van der Logt, S.M. Bergevoet, H.M.J. Roelofs, Z.van Hooijdonk1, R.H.M. te Morsche, T.Wobbes, J.B. de Kok, F.M.Nagengast and W.H.M.Peters Genetic polymorphisms in UDP-glucuronosyltransferases and glutathione S-transferases and colorectal cancer risk. *Carcinogenesis* (2004) 25; 12: 2407-2415

- Fernandez-Salguero P., Kimura S., Gonzalez F.J., Yamada K. Assignment of the dihydropyrimidine dehydrogenase gene to chromosome region 1p22 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* (1994) 24: 613-614
- Gamelin E, Boisdron-Celle M, Guérin-Meyer V, Delva R, Lortholary A, Genevieve F, Larra F, Ifrah N, Robert J. Correlation between uracil and dihydrouracil plasma ratio, 5-FU pharmacokinetic parameters, and tolerance in patients with advanced colorectal cancer: a potential interest for predicting 5-FU toxicity and determining optimal 5-FU dosage. *J Clin Oncol* (1999) 17: 1105
- Garcia-Albeniz X, Chan AT. Aspirin for the prevention of colorectal cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* (2011) 25: 461-72
- Goodman & Gilman: Le Basi Farmacologiche della Terapia. Undicesima Edizione. L.L.Brunton, J.S. Lazo K.L.Parker. McGraw-Hill (2006) 93-115
- Goto M, Masuda S, Saito H, Uemoto S, Kiuchi T, Tanaka K, Inui K. C3435T polymorphism in the MDR1 gene effects the enterocyte expression level of CYP3A4 rather than Pgp in recipients of living-donor liver. *Pharmacogenetics* (2002) 12: 451-457
- Grem JL, Yee LK, Venzon DJ, Takimoto CH, Allegra CJ. Inter- and intraindividual variation in dihydropyrimidine dehydrogenase activity in peripheral blood mononuclear cells. *Cancer Chemotherapy Pharmacology* (1997) 40: 117-25
- Guillemette C, Ritter Jk, Auyeung DJ, Kessler FK, Housman DE. Structural heterogeneity at the UDP-glucuronosyltransferase 1 locus: functional consequences of three novel missense mutations in the human UGT1A7 gene. *Pharmacogenetics* (2000) 10: 629-644
- Hitre E, Budai B, Adleff V, Czeglédi F, Horváth Z, Gyergyay F, Lövey J, Kovács T, Orosz Z, Láng I, Kásler M, Kralovánszky J. Influence of thymidylate synthase gene polymorphisms on the survival of colorectal cancer patients receiving adjuvant 5-fluorouracil *Pharmacogenet Genomics.* (2005) 15:723-30

- Hu ZY, Qi Yu ,Qi Pei and Cheng Guo. Dose-Dependent Association between UGT1A1\*28 Genotype and Irinotecan-Induced Neutropenia: Low Doses Also Increase Risk. *Clin Cancer Res* (2010 A) 16:3832-42
- Hu ZY, Qi Yu, Yuan-Sheng Zhao. Dose-dependent association between UGT1A1\*28 polymorphism and irinotecan-induced diarrhoea: A meta-analysis. *Eur J Cancer* (2010 B) 46:1856-65
- Hugo Girard, Lesley M. Butler, Lyne Villeneuve, Robert C. Millikan, Rashmi Sinha, Robert S. Sandler, and Chantal Guillemette. UGT1A1 and UGT1A9 functional variants, meat intake, and colon cancer, among Caucasians and African Americans. *Mutat Res.* (2008) 26; 644: 56–63.
- Hustert E, Haberl M, Burk O, Wolbold R, He YQ, Klein K, Nuessler AC, Neuhaus P, Klattig J, Eiselt R, Koch I, Zibat A, Brockmöller J, Halpert JR, Zanger UM, Wojnowski L. The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics* (2001) 11: 773-779
- Innocenti F, Undevia SD, Iyer L, Chen PX, Das S, Kocherginsky M, Karrison T, Janisch L, Ramírez J, Rudin CM, Vokes EE, Ratain MJ. Genetic variants in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan. *J Clin Oncol.* (2004) 22:1382–1388.
- Jada SR, Lim R, Wong CI, Shu X, Lee SC, Zhou Q, Goh BC, Chowbay B. Role of UGT1A1\*6, UGT1A1\*28 and ABCG2 c.421C>A polymorphisms in irinotecan-induced neutropenia in Asian cancer patients. *Cancer Sci* (2007) 98:1461-7
- Johnson MR, Wang K, Tillmanns S, Albin N, Diasio RB. Structural organization of the human dihydropyrimidine dehydrogenase gene. *Cancer Res* (1997) 57: 1660-1663
- Labianca R, Beretta GD, Kildani B, Milesi L, Merlin F, Mosconi S, Pessi MA, Prochilo T, Quadri A, Gatta G, de Braud F, Wils J. Colon cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* (2010 A) 74:106-33
- Labianca R, Merelli B. Screening and diagnosis for colorectal cancer: present and future. *Tumori.* (2010 B) 96:889-901. Review

- Lankisch TO, Moebius U, Wehmeier M, Behrens G, Manns MP, Schmidt RE, Strassburg CP. Gilbert's disease and atazanavir: from phenotype to UDP-glucuronosyltransferase haplotype. *Hepatology*. (2006) 44:1324-32
- Lankisch TO, Behrens G, Ehmer U, Möbius U, Rockstroh J, Wehmeier M, Kalthoff S, Freiberg N, Manns MP, Schmidt RE, Strassburg CP. Gilbert's syndrome and hyperbilirubinemia in protease inhibitor therapy--an extended haplotype of genetic variants increases risk in indinavir treatment. *J Hepatol*. (2009) 50:1010-8
- Leslie E, Carlini, Neal J, Meropol, John Bever, Michael L. Andria, Todd Hill, Philip Gold, Andre Rogatko, Hao Wang, and Rebecca L. Blanchard UGT1A7 and UGT1A9 Polymorphisms Predict Response and Toxicity in Colorectal Cancer Patients Treated with Capecitabine/Irinotecan *Clinical Cancer Research* (2005) 11: 1226–1236
- Liu JY, Qu K, Sferruzza AD, Bender RA. Distribution of UGT1A1\*28 polymorphism in Caucasian and Asian populations in the US: a genomic analysis of 138 healthy individuals. *Anticancer Drugs* (2007) 18:693-6
- Machover D. Developments of fluoropyrimidines as inhibitors of thymidylate synthase: pharmacologic and clinical aspects. *J Surg Oncol* (1991) suppl 2:42-49
- Macphee IA, Fredericks S, Mohamed M, Moreton M, Carter ND, Johnston A, Goldberg L, Holt DW. Tacrolimus pharmacogenetics: the CYP3A5\*1 allele predicts low dose-normalized tacrolimus blood concentrations in whites and south Asians. *Transplantation* (2005) 79: 499-502
- Maguire JH, Dudley KH. Partial purification and characterization of dihydropyrimidinase from calf and rat liver. *Drug Metabolism and Disposition* (1978) 6: 601-610
- Meinsma R, Fernandez-Salguero P, Van Kuilenburg ABP, Van Gennip AH, Gonzalez FJ. Human polymorphism in drug metabolism: mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene results in exon skipping and thymine uraciluria. *DNA Cell Biol* (1995) 14: 1-6

- Monaghan,G, Ryan M, Seddon R, Hume R, Burchell B. Genetic variation in bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene promoter and Gilbert's syndrome. *Lancet* (1996) 347:578-581
- Muller M: Pharmacogenomics and drugs response. *Intern J Clin Pharm Ther* (2003) 41:231-40
- Naguib FMN, el Kouni MH, Cha S. Enzymes of uracil catabolism in normal and neoplastic tissue. *Cancer Res* (1985) 45: 5404-5412
- NIH Consensus Conference on adjuvant therapy for patients with colon and rectum cancer. *Journal of the American Medical Association* (1990) 264 :1444-1450
- Onoue M, Terada T, Kobayashi M, Katsura T, Matsumoto S, Yanagihara K, Nishimura T, Kanai M, Teramukai S, Shimizu A, Fukushima M, Inui K UGT1A1\*6 polymorphism is most predictive of severe neutropenia induced by irinotecan in Japanese cancer patients. *Int J Clin Oncol.* (2009) 14:136-42
- Ockenga J, Vogel A, Teich N, Keim V, Manns MP, Strassburg CP. UDP glucuronosyltransferase (UGT1A7) gene polymorphisms increase the risk of chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology* (2003) 124: 1802-1808
- Provenzani A, Notarbartolo M, Labbozzetta M, Poma P, Biondi F, Sanguedolce R, Vizzini G, Palazzo U, Polidori P, Triolo F, Gridelli B, D'Alessandro N. The effect of CYP3A5 and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on tacrolimus dose requirements in Caucasian liver transplant patients. *Ann Transplant* (2009) 14:23-31
- Provenzani A, Notarbartolo M, Labbozzetta M, Poma P, Vizzini G, Salis P, Caccamo C, Bertani T, Palazzo U, Polidori P, Gridelli B, D'Alessandro N. Influence of CYP3A5 and ABCB1 gene polymorphisms and other factors on tacrolimus dosing in Caucasian liver and kidney transplant patients. *Int J Mol Med* (2011) 28:1093-102
- Pullarkat ST, Stoehlmacher J, Ghaderi V, Xiong YP, Ingles SA, Sherrod A, Warren R, Tsao-Wei D, Groshen S, Lenz HJ. Thymidylate synthase gene

polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy. *Pharmacogenomics J* (2000) 1: 65-70

- Punt CJH. New drugs in treatment of colorectal carcinoma. *Cancer* (1998) 83: 679-689
- Raijmakers, M.T.M, Jansen PL, Steegers EA, Peters WH. Association of human liver bilirubin UDP-glucuronyltransferase activity with a polymorphism in the promoter region of the UGT1A1 gene. *J. Hepatol.* (2000) 33: 348--351
- Ridge SA, Sludden J, Wei X, Sapone A, Brown O, Hardy S, Canney P, Fernandez Salguero P, Gonzales FJ, Cassidy J, McLeod HL. Dihydropyrimidine dehydrogenase pharmacogenetics in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* (1998) 77: 497-500
- Rossi F. - Cuomo V.- Riccardi C. *Farmacologia: Principi di base e applicazioni terapeutiche.* Edizione Minerva Medica (2005) 29-32
- Roth AD, Yan P, Dietrich D, Fiocca R, Bodoky G, Labianca R, Cunningham D, Van Cutsem E, Bosman F, Tejpar S. Is the UGT1A\*28 homozygosity the strongest predictor for severe hematotoxicity in patients with 5-fluorouracil (5-FU)-irinotecan (IRI)? Results of the PETACC 3 - EORTC 40993 - SAKK 60/00 trial comparing IRI/5-FU/folinic acid (FA) to 5-FU/FA in stage II - III colon cancer (COC) patients (Abstract No. 4036). *J Clin Oncol.* (2008) 112-26.
- Rougieg K, Picard N, Sauvage FL, Gaulier JM, Marquet P. Contribution of the different UDP-glucuronosyltransferase (UGT) isoforms to buprenorphine and norbuprenorphine metabolism and relationship with the main UGT polymorphisms in a bank of human liver microsomes. *Drug Metab Dispos.* (2010) 38:40-5
- Sai K, Sawada J, Minami H. Irinotecan pharmacogenetics in Japanese cancer patients: roles of UGT1A1\*6 and \*28. *Yakugaku Zasshi* (2008) 128: 575-84. Review
- Sakaeda T, Nakamura T, Okumura K. Pharmacogenetics of MDR1 and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs. *Pharmacogenomics* (2003) 4: 397-410

- Shiotani T, Weber G. Purification and properties of dihydrothymine dehydrogenase from rat liver. *J Biol Chem* (1981) 256: 219-224
- Steiner M, Seule M, Steiner B, Bauer I, Freund M, Köhne CH, Schuff-Werner P. 5-Fluorouracil/irinotecan induced lethal toxicity as a result of a combined pharmacogenetic syndrome: report of a case. *J Clin Pathol* (2005) 58: 5535
- Stephens JC, Schneider JA, Tanguay DA, Choi J, Aharya T, Stanley SE, Jiang R, Messer CJ, Chew A, Han JH, Duan J, Carr JL, Lee MS, Koshy B, Kumar AM, Zhang G, Newell WR, Windemuth A, Xu C, Kalbfleisch TS, Shaner SL, Arnold K, Schulz V, Drysdale CM, Nandabalan K, Judson RS, Ruano G, Vovis GF. Haplotype variation and linkage disequilibrium in 313 human genes. *Science* (2001) 293:489-49
- Strassburg C.P., Mans MP, Tukey RH. Expression of the UDP-glucuronosyltransferase 1A locus in human colon. Identification and characterization of the novel extrahepatic UGT1A8. *J. Biol. Chem.* (1998) 273: 8719-8726
- Strassburg CP. Polymorphisms of human UDP-glucuronosyltransferase(UGT) 1A7 gene in colorectal cancer. *Gut* (2002) 50: 851-856
- Sulzyc-Bielicka Violetta, Agnieszka Bińczak-Kuleta, Wiesawa Pioch, Józef Kadny, Katarzyna Gziut, Dariusz Bielicki, Andrzej Ciechanowicz. 5-Fluorouracil toxicity-attributable IVS14+1G>A mutation of the dihydropyrimidine dehydrogenase gene in Polish colorectal cancer patients. *Pharmacological Report* (2008) 60:238-242
- Tejpar S., F. Bosman, M. Delorenzi, R. Fiocca, P. Yan, D. Klingbiel, D. Dietrich, E. Van Cutsem, R. Labianca and A. Roth. Microsatellite instability (MSI) in stage II and III colon cancer treated with 5FU-LV or 5FU-LV and Irinotecan (PETACC 3-EORTC 40993-SAKK 60/00 trial). *Journal of Clinical Oncology* (2009). ASCO Annual Meeting Proceedings Vol 27
- Thervet E, Anglicheau D, King B, Schlageter MH, Cassinat B, Beaune P, Legendre C, Daly AK. Impact of cytochrome P450 3A5 genetic polymorphism on tacrolimus doses and concentration-to dose ratio in renal transplant recipients. *Transplantation* (2003) 76: 1233-1235



- Toffoli G, Veronesi A, Boiocchi M, Crivellari D. MTHFR gene polymorphism and severe toxicity during adjuvant treatment of early breast cancer with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil (CMF). *Ann Oncol* (2000) 11: 373–374
- Van Cutsem E, Twelves C, Cassidy J, Allman D, Bajetta E, Boyer M, Bugat R, Findlay M, Frings S, Jahn M, McKendrick J, Osterwalder B, Perez-Manga G, Rosso R, Rougier P, Schmiegeler WH, Seitz JF, Thompson P, Vieitez JM, Weitzel C, Harper P; Xeloda Colorectal Cancer Study Group. Oral capecitabine compared with intravenous fluorouracil plus leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer: results of a large phase III study. *J Clin Oncol* (2001) 19: 4097-4106
- Van Kuilenburg André B.P. Dihydropyrimidine dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-fluorouracil. *European Journal of Cancer* (2004) 40:939-950
- Van Kuilenburg ABP, Van Lenthe H, Wanders RJ, Van Gennip AH. Subcellular localization of dihydropyrimidine dehydrogenase. *Biol Chem* (1997 A) 378: 1047-1053
- Van Kuilenburg ABP, Vreken P, Beex LVAM, Meinsma R, Van Lenthe H, De Abreu RA, van Gennip AH. Heterozygosity for a point mutation in an invariant splice site donor of dihydropyrimidine dehydrogenase and severe 5-fluorouracil related toxicity. *Eur J Cancer* (1997 B) 33: 2258-2264
- Van Kuilenburg ABP, Haasjes J, Richel DJ, Zoetekouw L, Van Lenthe H, De Abreu RA, Maring JG, Vreken P, van Gennip AH. Clinical implications of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency in patients with severe 5-fluorouracil-associated toxicity: identification of new mutations in the DPD gene. *Clin Cancer Res* (2000) 6: 4705
- Vesell ES. Genetic and environmental factors causing variation in drug response. *Mutat Res* (1991) 247:241–257
- Vesell ES. Advances in pharmacogenetics and pharmacogenomics. *J Clin Pharmacol* (2000) 40:930–938
- Vreken P, Van Kuilenburg AB, Meinsma R, Smit GP, Bakker HD, De Abreu RA, van Gennip AH. A point mutation in an invariant splice donor site leads to exon

skipping in two unrelated Dutch patients with dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *J Inher Metab Dis* (1996 A) 19: 645- 654

- Vreken P, Van Kuilenburg ABP, Meinsma R, Van Gennip AH. Identification of novel point mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene. *J Inher Metab Dis* (1996 B) 19 (suppl. 1): 8-15
- Vogel A, Kneip S, Barut A, Ehmer U, Tukey RH, Manns MP, Strassburg CP. Genetic link of hepatocellular carcinoma with polymorphisms of the UDP-glucuronosyltransferase UGT1A7 gene. *Gastroenterology* (2001) 121: 1136-1144
- Walliser S, Redmann K. Effect of 5-fluorouracil and thymidine on the transmembrane potential and zeta potential of HeLa cells. *Cancer Res* (1978) 38: 3555-3559
- Walko CM and Lindley C. Capecitabine: a review. *Clin Ther* (2005) 27: 23-44.
- Wei X, McLoed HL, McMurrough J, Gonzalez FJ, Fernandez-Salguero P. Molecular basis of the human dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and 5-fluorouracil toxicity. *J Clin Invest* (1996) 98: 610-615
- Wilson KS, Malfair Taylor SC. Raltitrexed: optimism and reality. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* (2009) 5:1447-54
- Zheng H, Zeevi A, Schuetz E, Lamba J, McCurry K, Griffith BP, Webber S, Ristich J, Dauber J, Iacono A, Grgurich W, Zaldonis D, McDade K, Zhang J, Burckart GJ. Tacrolimus dosing in adult lung transplant patients is related to cytochrome P4503A5 gene polymorphism. *J Clin Pharmacol* (2004) 44: 135-140
- Zheng Z, Park JY, Guillemette C, Schantz SP, Lazarus P. Tobacco carcinogen-detoxifying enzyme UGT1A7 and its association with orolaryngeal cancer risk. *J Natl Cancer Inst* (2001) 93: 1411-1418