

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

DIPARTIMENTO DI MEDICINA, CHIRURGIA E ODONTOIATRIA "SCUOLA MEDICA SALERNITANA"

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN "MEDICINA TRASLAZIONALE DELLO SVILUPPO E DELL'INVECCHIAMENTO ATTIVO" XXXVIII CICLO

Tesi di Dottorato

APPROCCIO INTEGRATO PER LA PREVENZIONE DI EVENTI TOSSICI NEI PAZIENTI ONCOLOGICI TRATTATI CON FLUOROPIRIMIDINE

RELATORI

Ch.ma Prof.ssa Amelia Filippelli
Ch.ma Prof.ssa Valeria Conti

CANDIDATO

Berenice Stefanelli
Matr.8861700009

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

ABSTRACT

Le fluoropirimidine, in particolare il 5-fluorouracile e la capecitabina, rappresentano farmaci chemioterapici antiblastici utilizzati in prima linea nel trattamento di diversi tumori solidi. Circa il 20-30% dei casi di tossicità da fluoropirimidine nella popolazione caucasica è attribuibile a fattori genetici, in particolare a polimorfismi del gene DPYD, che codifica per l'enzima diidropirimidina deidrogenasi, responsabile del metabolismo di questi farmaci. Sulla base di tali evidenze, l'European Medicines Agency (EMA) e l'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) raccomandano uno screening farmacogenetico pre-terapeutico, consentendo di adattare la dose alla capacità metabolica del paziente, riducendo il numero e la gravità delle reazioni avverse senza compromettere l'efficacia terapeutica.

Accanto ai fattori genetici, anche fattori non genetici, come la concomitante assunzione di più farmaci (polifarmacoterapia), contribuiscono alla variabilità di risposta al trattamento. L'invecchiamento progressivo della popolazione e l'aumento delle patologie croniche determinano una maggiore diffusione di regimi politerapici, aumentando il rischio di reazioni avverse. L'utilizzo di strumenti digitali, i cosiddetti "Drug-Drug Interaction Checkers", permette di identificare interazioni farmacologiche potenzialmente inappropriate all'interno della corretta applicazione della raccomandazione ministeriale N.17 del Ministero della Salute, contribuendo a prevenire prescrizioni inadeguate. Parallelamente, lo studio di fattori proteomici e metabolomici offre l'opportunità di

identificare nuovi target predittivi di risposta al trattamento, ampliando la comprensione dei meccanismi molecolari sottostanti la variabilità di risposta ai farmaci.

Presso l'UOC Farmacologia Clinica dell'A.O. U. "San Giovanni di Dio e Ruggi d'Aragona" di Salerno, è in corso uno studio di farmacovigilanza attiva volto a rilevare le reazioni avverse associate all'uso di fluoropirimidine.

Il presente lavoro di tesi si propone di effettuare una valutazione integrata dei fattori genetici, della polifarmacoterapia e dei determinanti omici, al fine di comprendere meglio la variabilità di risposta al trattamento e contribuire allo sviluppo di strategie terapeutiche più sicure ed efficaci.

INDICE

1) Introduzione……5

1.Le fluoropirimidine……...…5

2.Usi clinici……..……5

3.Farmacodinamica……..……10

4.Farmacocinetica……16

5.Interazioni Farmacologiche……..……18

6. Sicurezza e tollerabilità……21

7. La riconciliazione farmacologica……24

8. La Farmacogenetica delle fluoropirimidine……...27

8.1. Polimorfismi del gene DPYD…….…..…..29

8.2. Altri polimorfismi associati……..34

9. Altre “omic sciences”: Metabolomica e Proteomica…...38

10. Farmacovigilanza……40

11. Programma di oncovigilanza sulle fluoropirimidine….41

2) Scopo della tesi……42

3) Materiali e metodi……43

1.Monitoraggio clinico nell’ambito dello studio……43

2.Electronic Case Report Form……44

2.2 DDI Checkers……44

3.Criteri CTCAE……..……45

4.Criteri Recist…….……46

5.La genotipizzazione……..48

6.Estrazione DNA……..…48

7.Quantizzazione acidi nucleici…….……50

8.PCR-Real Time……..……52

9**.**Analisi metabolomiche…….....…..57

10.Analisi Statistica dei dati…….……57

5) Risultati……..…….……58

1.Caratteristiche clinico-anamnestiche della popolazione in studio……..……..…...58

2.Risultati genotipizzazione……....63

3.Rapporto UH2/U……65

4.Tossicità……66

5.Analisi Interazioni Farmaco-Farmaco……..74

6. Caso clinico di rilevante interesse…….….76

5) Discussione e conclusioni……..78

Bibliografia……83

Sitografia……88

1. INTRODUZIONE

1.1 Le fluoropirimidine

Le fluoropirimidine sono farmaci chemioterapici antitumorali appartenenti alla classe degli antimetaboliti pirimidinici (anche detti antipirimidinici). Gli antipirimidinici, inibiscono a vari livelli la sintesi delle pirimidine (citosina e timidina), interferendo con la sintesi del DNA.

Alle fluoropirimidine appartengono il 5-Fluorouracile (5-FU), capecitabina e tegafur (Rossi F. *et al.*, 2016).

1.2 Usi clinici

Il 5-FU e la capecitabina sono le fluoropirimidine maggiormente impiegate nel trattamento di tumori solidi, comprendenti quello colonrettale, gastrico, esofageo, pancreatico, mammario e testa-collo (https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer_003029_040593_RCP.pdf&sys=m0b1l3, https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/xeloda-epar-product-information_it.pdf).

Tumore colonrettale

Il 5-FU è attualmente impiegato nel trattamento adiuvante delle neoplasie del colon e del retto, in monoterapia oppure in regimi politerapici. Questi ultimi sono

basati su associazioni di 5-FU e acido folinico con farmaci quali oxaliplatino (FOLFOX), irinotecano (FOLFIRI) o entrambi oxaliplatino e irinotecano (FOLFOXIRI).

A questi possono essere aggiunti farmaci anti-EGFR, -VEGFR quali trastuzumab, cetuximab e bevacizumab in caso di tumori in stadio avanzato, ovvero con accertata presenza di metastasi a distanza (https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=foter_003029_040593_RCP.pdf&sys=m0b113, https://www.aiom.it/linee-guida-aiom-2021-tumori-del-colon/). Le indicazioni per il regime FOLFOX sono rappresentate dal trattamento adiuvante del cancro del colon allo stadio III (C di Duke) e dal trattamento di prima o seconda linea del cancro del colon allo stadio IV. L'indicazione all'utilizzo del regime FOLFIRI è rappresentata dal trattamento in prima o seconda linea del cancro colon- rettale allo stadio IV. Il regime FOLFOXIRI, invece, includendo una dose più bassa di irinotecano ed escludendo la via di somministrazione in bolo del 5-FU, si è dimostrato efficace nel cancro colon-rettale metastatico (Falcone et al., 2007).

I cicli, con cadenza bisettimanale, consistono in somministrazioni giornaliere di una doppia somministrazione di 5-FU, di cui in bolo (400 mg/m2) un'altra in infusione continua per 46 ore circa (3200 mg/m2).

Il trattamento con capecitabina in monoterapia, assunta per os in concomitanza dei pasti principali, è indicato come prima linea per il cancro del colon-retto metastatizzato, come terapia adiuvante del cancro del colon-retto allo stadio C di Duke e come terapia adiuvante del cancro del colon-retto allo stadio B, se ad alto rischio (https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/xeloda-epar-product-information_it.pdf, https://www.aiom.it/linee-guida-aiom-2021-tumori-del-colon/).

Il regime XELOX è basato sulla somministrazione di due farmaci: capecitabina e oxaliplatino, il primo assunto per os, il secondo somministrato tramite infusione. Il ciclo viene ripetuto ogni ventuno giorni, per un massimo di otto cicli.

La capecitabina viene assunta giornalmente dal paziente per quattordici giorni, due volte al giorno, seguita da sette giorni di pausa. È raccomandata l'assunzione entro trenta minuti dai due pasti principali.

La dose è generalmente di 1000 mg/m2.

Tumore gastrico e tumore della giunzione gastroesofagea

I regimi XELOX e FOLFOX sono raccomandati come terapia adiuvante, per 4-6 settimane dopo l'intervento in assenza di gravi complicanze e dopo la normalizzazione degli indicatori clinici e di laboratorio.

I regimi ECF (epirubicina, cisplatino, 5-fluorouracile) o ECX (epirubicina, cisplatino, capecitabina) sono attualmente raccomandati come chemioterapia peri-operatoria. Recentemente, la chemioterapia peri-operatoria secondo schema FLOT (5-FU, oxaliplatino, docetaxel) ha mostrato risultati eccellenti in termini di durata della remissione nei pazienti con carcinoma gastrico metastatico (https://it-m.iliveok.com/health/chemioterapia-il-cancro-gastrico_105579i15957.html).

Tumore esofageo

Il 5-fluorouracile è comunemente usato in combinazione con cisplatino; o cisplatino ed epirubicina; o epirubicina e oxaliplatino (ECF) nel carcinoma esofageo avanzato (RCP).

Tumore pancreatico

Il 5-fluorouracile viene preferibilmente usato in combinazione con acido folinico o gemcitabina nel carcinoma pancreatico avanzato. In seconda linea, un

regime FOLFOX o FOLFIRINOX può essere adottato. Il regime FOLFIRINOX comprende l'associazione di 5-FU sia sotto forma di bolo che infusione continua, oxaliplatino e irinotecano (https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer_003029_040593_RCP.pdf&sys=m0b1l3).

Tumore alla mammella

Il 5-FU è comunemente usato in regimi chemioterapici in combinazione con ciclofosfamide e metotrexato (CMF), o epirubicina, ciclofosfamide (FEC) o metotrexato e leucovorin (MFL) come trattamento adiuvante in pazienti con carcinoma mammario invasivo primario operabile e nel trattamento del carcinoma mammario avanzato o metastatico. Capecitabina in associazione a docetaxel è indicato nel trattamento di pazienti con tumore mammario localmente avanzato o metastatico dopo fallimento della chemioterapia citotossica comprendente un'antraciclina. Inoltre, capecitabina è indicato in monoterapia per il trattamento di pazienti con tumore mammario localmente avanzato o metastatico dopo fallimento di un regime chemioterapico contenente taxani e un'antraciclina o per le quali non è indicata un'ulteriore terapia con antracicline (https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer_003029_040593_RCP.pdf&sys=m0b1l3, https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/xeloda-epar-product-information_it.pdf).

Tumore della testa-collo

Il 5-fluorouracile viene preferibilmente usato in combinazione con cisplatino o carboplatino in combinazione con la radioterapia nel trattamento del carcinoma non operabile, localmente avanzato, delle cellule squamose della testa e del collo

in pazienti non precedentemente trattati e nel trattamento del carcinoma localmente ricorrente o metastatico delle cellule squamose della testa e del collo (https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer_003029_040593_RCP.pdf&sys=m0b1l3).

1.3 Farmacodinamica

Si tratta di chemioterapici antitumorali ciclo-specifici, che agiscono sulle cellule in fase di replicazione, bloccando la fase S del ciclo cellulare.

Il 5-FU (figura 1) è stato sintetizzato nel 1957 a partire da precursori aciclici dell'uracile (Heidelberg et al.,1957) e differisce da quest'ultimo per la sostituzione dell'idrogeno in posizione 5 con un atomo di fluoro. Studi sperimentali hanno dimostrato che alcuni tumori (epatomi del ratto) utilizzano l'uracile esogeno per la sintesi di acidi nucleici più attivamente dei tessuti sani (Rutman et al., 1954). Sulla base di queste osservazioni sono stati quindi

sintetizzati analoghi strutturali dell'uracile, capaci di interferire con la sintesi degli acidi nucleici e di rallentare la crescita del tumore (Heidelberg, 1975).

La capecitabina (N4-pentossicarbonil 5'-desossi-5- fluorocitidina) è il profarmaco del 5-FU (figura 1). A differenza del 5-FU, essa ha una buona biodisponibilità per via orale ed è quindi somministrata per os.

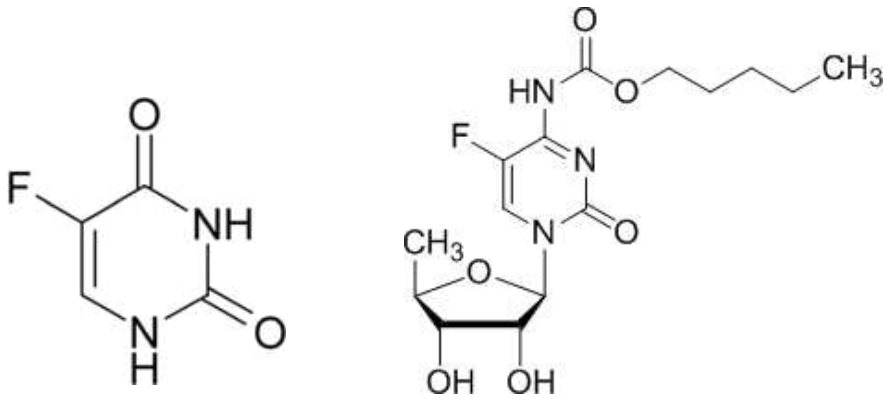


Figura 1. *Struttura chimica del 5-fluorouracile (a sinistra) e capecitabina (a destra)*

Il 5-FU acquisisce la sua attività citotossica *in vivo*, mediante la conversione, ad opera della timidina-fosforilasi e della timidina-chinasi, in 5-fluorodesossiuridilmonofosfato (FdUMP) (Figura 2).

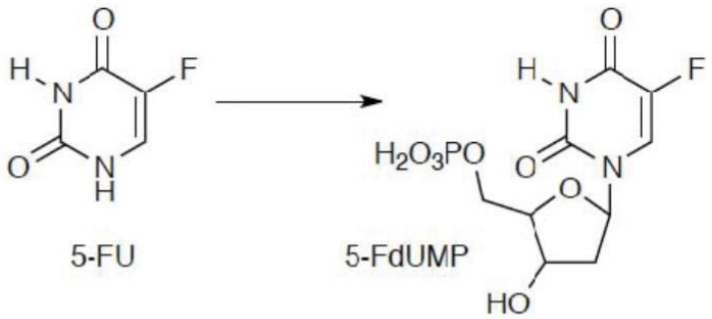


Figura 2. *Conversione del 5-FU in 5-FdUMP*

Inibizione dell'enzima timidilato sintasi

F-dUMP blocca l'enzima timidilato sintetasi (TS) arrestando la sintesi di timidina e del DNA.

L'inibizione mediata dal 5-FU avviene attraverso la formazione di un complesso ternario tra FdUMP, l'enzima TS e il cofattore N^{5-10}- metilenetetraidrofolato (5,10-CH_2THF) che si comporta da donatore di gruppi metilici (Grem, 1990) (Figura 3).

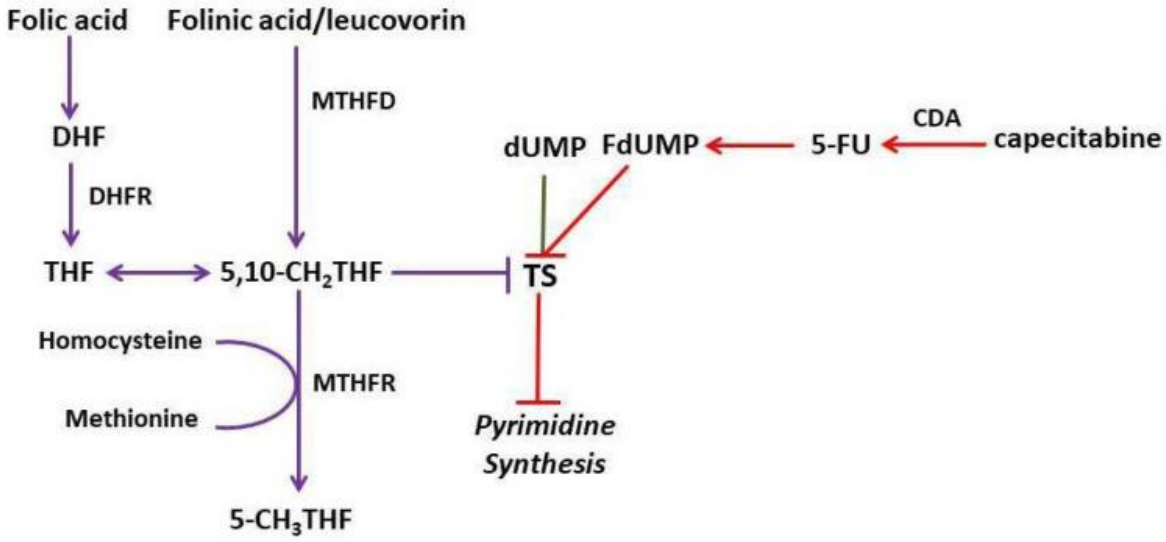


Figura 3. *Farmacodinamica delle fluoropirimidine.*

Difatti, la maggior parte delle cellule di mammifero sintetizza la deossitimidina monofosfato (dTMP) a partire da deossiuridilmonofosfato (dUMP) mediante l'enzima TS. Questo processo prevede la metilazione dell'anello pirimidinico in posizione 5 della dUMP, in presenza di folato (Figura 4).

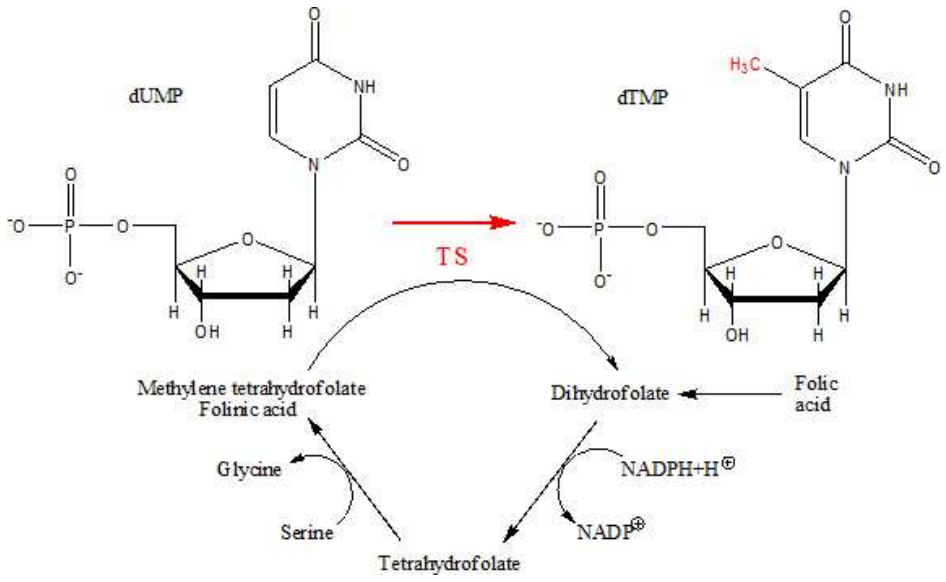


Figura 4: *Formazione di dTMP a partire da dUMP ad opera dell'enzima TS*

Altri meccanismi

Il 5-FU può interferire anche nella sintesi dell'RNA, dovuta all'incorporazione della fluorouridina trifosfato (FUTP).

Questo prevede la conversione del 5-FU in fluorouridina monofosfato (FUMP) mediante l'attività sequenziale degli enzimi uridina fosforilasi e uridina chinasi oppure direttamente tramite l'enzima orotato-fosforibosiltransferasi. (Rossi F. *et al.*,2016).

Inoltre, a partire dalla fluorouridinadifosfato (FUDP), si può avere la formazione di fluorodesossiuridinadifosfato (FdUDP) ad opera dell'enzima ribonucleotide reduttasi. La successiva formazione di fluorodesossiuridina trifosfato (FdUTP) permette l'incorporazione nel DNA al posto del normale metabolita dTTP, inibendone l'allungamento (Rossi F. *et al.*,2016).

Il 5-FU va quindi ad inibire la proliferazione tumorale agendo attraverso l'inibizione della TS, enzima fondamentale per la sintesi della base azotata timidina e attraverso la sua incorporazione come ribo- e deossiribo-nucleotide nell'RNA e nel DNA alterandone la stabilità e compromettendone la sintesi (figura 5),

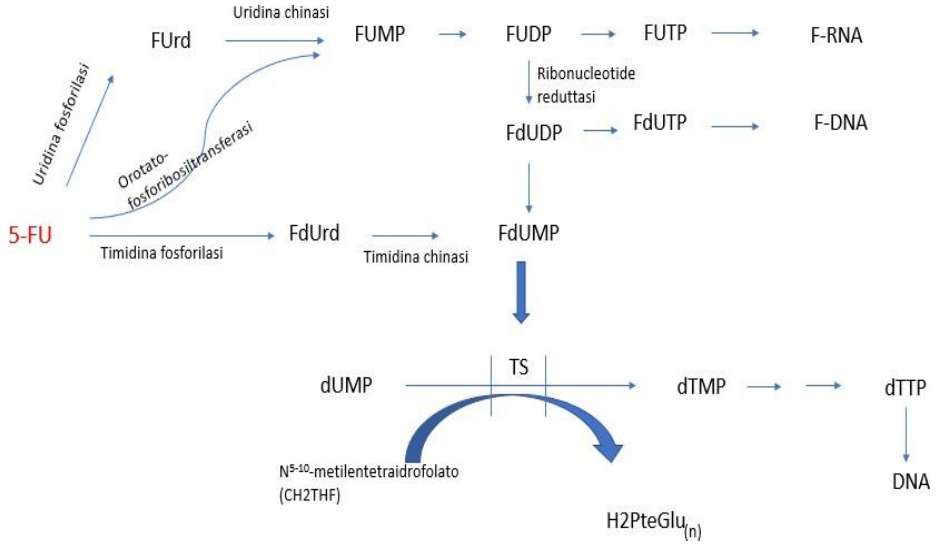


Figura 5: *Altri meccanismi d'azione del 5-FU*

1.4 Farmacocinetica

Assorbimento e distribuzione

L'assorbimento del 5-FU è incompleto e variabile, motivo per cui esso viene somministrato per via endovenosa. La capecitabina invece, essendo il suo profarmaco, viene assorbita completamente e rapidamente.

In seguito a somministrazione e.v., il 5-FU si distribuisce nella mucosa intestinale, nel midollo osseo, nel fegato, e in altri tessuti come quello cerebrale. Tuttavia, numerosi studi hanno evidenziato un tropismo per il tessuto tumorale. Il fluorouracile attraversa la placenta nel ratto. Studi effettuati in vitro sul plasma umano hanno evidenziato che la capecitabina, 5'-DFCR, 5'-DFUR e 5-FU sono legati alle proteine, principalmente all'albumina, in percentuali rispettivamente pari a 54%, 10%, 62% e 10% (https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer_003029_040593_RCP.pdf&sys=m0b1l,https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/xeloda-epar-product-information_it.pdf).

Biotrasformazione

La capecitabina è dapprima metabolizzata dalla carbossilesterasi epatica in 5'-deossi-5-fluorocitidina (5'-DFCR), che viene poi convertita in 5'-deossi-5-fluorouridina (5'-DFUR) ad opera della citidina deaminasi, localizzata principalmente nei tessuti del fegato e del tumore. Si ha poi un'ulteriore attivazione catalitica del 5'-DFUR a 5-FU ad opera della timidina fosforilasi.

Il 5-FU viene catabolizzato dall'enzima diidropirimidina deidrogenasi (DPD) nel diidro-5- fluorouracile (FUH2) molto meno tossico. La diidropirimidinasi

scinde l'anello pirimidinico per produrre acido 5-fluoro-ureidopropionico (FUPA). Infine, la β-alanina-sintasi scinde la FUPA in α-fluoro-β-alanina (FBAL) che viene eliminata nelle urine (Figura 6) (https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer_003029_040593_RCP.pdf&sys=m0b1l3,https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/xeloda-epar-product-information_it.pdf).

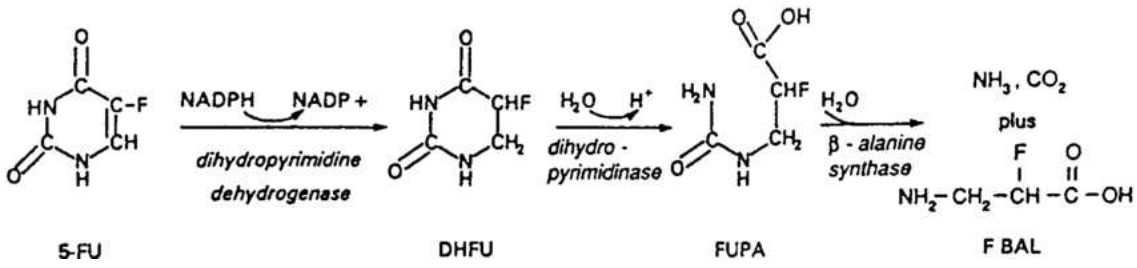


Figura 6: *Catabolismo del 5-FU*

Eliminazione

L'emivita di eliminazione (t1/2 in ore) di capecitabina, 5'-DFCR, 5'-DFUR, 5-FU e FBAL è rispettivamente di 0,85 - 1,11 - 0,66 - 0,76 e 3,23.

La capecitabina e i suoi metaboliti sono eliminati principalmente nelle urine e più del 90% è escreto durante la prima ora. I metaboliti inattivi tra cui FBAL sono escreti nelle urine nelle successive 3 - 4 ore. Non è noto se il fluorouracile sia escreto nel latte materno. L'escrezione fecale è minima (2,6%) (https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer_003029_040593_RCP.pdf&sys=m0b1l3,https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/xeloda-epar-product-information_it.pdf).

1.5 Interazioni Farmacologiche

L'uso contemporaneo di più farmaci è spesso essenziale per il raggiungimento del risultato terapeutico desiderato o per il trattamento di patologie concomitanti. La polifarmacoterapia riguarda principalmente i pazienti anziani e rappresenta un problema sempre più riconosciuto a livello mondiale. Purtroppo, molto spesso le interazioni tra più farmaci possono dare luogo a reazioni avverse (ADR), anche fatali (Sultana J, Cutroneo P, Trifirò G., 2013).

Come da RCP, le interazioni farmacologiche con le fluoropirimidine possono essere sia di natura farmacocinetica che farmacodinamica.

Tra le interazioni di natura farmacocinetica, viene annoverata un'interazione significativa associata ad aumentata tossicità da trattamento a base di fluoropirimidine con gli antivirali brivudina, sorivudina e analoghi per inibizione dell'enzima DPD. Questo è il motivo per cui tale co-somministrazione deve essere evitata e bisogna attendere almeno 4 settimane tra la fine del trattamento con brivudina, sorivudina e analoghi e l'inizio della terapia con le fluoropirimidine.

La cimetidina, il metronidazolo e l'interferone possono incrementare la tossicità del 5-FU in quanto in grado di causare aumento dei livelli plasmatici di quest'ultimo con un meccanismo non ancora del tutto noto (Drugs.com).

Nei pazienti che ricevono un trattamento combinato con fenitoina e 5-FU e capecitabina è stato riportato un aumento delle concentrazioni plasmatiche di fenitoina con conseguente comparsa di tossicità della stessa. Ciò può essere dovuto a una inibizione del CYP2C9 da parte del 5-FU (Micromedex).

La presenza di un antiacido può far aumentare la biodisponibilità della

capecitabina.

Tra le interazioni di tipo farmacodinamico, viene annoverata quella tra fluoropirimidine e acido folinico/folico per aumentata efficacia e tossicità, di riflesso.

Diarree pericolose per la vita sono state osservate con la cosomministrazione di 600 mg/m2 di fluorouracile (bolo e.v. una volta a settimana) e acido folinico.

La capecitabina, se somministrata insieme all'acido folinico, presenta una MTD di 2.000 mg/m² al giorno. Questo può essere rilevante anche con la cosomministrazione di acido folico per la loro somiglianza strutturale.

Il fluorouracile potenzia l'azione di altri farmaci citostatici e della terapia radiante, aumentando l'attività immunosoppressiva., rendendo necessario un aggiustamento del dosaggio.

Può verificarsi un aumento della cardiotossicità quando le fluoropirimidine vengono cosomministrate insieme al 5-FU. (?)

Il 5-FU può diminuire le normali difese immunitarie per cui in presenza di vaccini a base di virus, può far aumentare la replicazione di questi con aumento degli effetti collaterali e diminuire la risposta anticorpale del paziente.

La vaccinazione di questi pazienti deve essere effettuata previa valutazione dei parametri ematologici del paziente e solo con il consenso del medico che si occupa della terapia con fluorouracile.

L'uso concomitante con anticoagulanti come il warfarin può dare un aumento dell'effetto anticoagulante. La capecitabina inibisce il CYP2C9 responsabile della metabolizzazione del warfarin.

Il trattamento con 5-FU e levamisolo ha dimostrato un tasso significativamente più alto di epatotossicità (aumento della fosfatasi alcalina, transaminasi o della

bilirubina) paragonato al trattamento con il solo levamisolo per un semplice effetto additivo (Micromedex).

I diuretici tiazidici possono aumentare la mielosoppressione in pazienti che ricevono il 5-FU. Questo è stato osservato in uno studio clinico effettuato su 14 pazienti con cancro alla mammella trattati con ciclofosfamide, metotressato, 5-FU e che assumevano un diuretico tiazidico (Orr LE, 1981).

Il regime di 5-FU, ciclofosfamide, metotressato e tamoxifene può aumentare gli eventi tromboembolici in donne in post-menopausa trattate per il tumore al seno con un meccanismo ancora poco noto (Drugs.com).

Si sconsiglia la cosomministrazione di clozapina e 5-FU per aumentata agranulocitosi.

È stata osservata mucosite grave, potenzialmente pericolosa per la vita, a seguito della co-somministrazione di vinorelbina e 5-FU/acido folinico.

In presenza di interferone alfa, la MTD della capecitabina è pari a 2000 mg/m² al giorno così come in radioterapia per il carcinoma del retto.

1.6 Sicurezza e tollerabilità delle fluoropirimidine

Il 5-FU e la capecitabina sono farmaci con una elevata tossicità e un basso indice terapeutico, di conseguenza, difficilmente la risposta terapeutica si verifica senza che si manifesti qualche segno di tossicità. Per tale motivo il dosaggio deve essere personalizzato e calcolato in base alla superficie corporea (BSA) del paziente (Macdonald JS. *et al.*, 1999).

Buona parte delle ADR delle fluoropirimidine sono insite nella natura di "agente citotossico" del farmaco stesso che va ad agire sulle cellule in attiva replicazione indistintamente, ed in particolare il sistema ematopoietico e quello gastrointestinale. Le ADR correlate al trattamento più frequentemente riportate e/o clinicamente rilevanti sono state disturbi gastrointestinali (specialmente diarrea, stipsi, nausea, vomito, dolore addominale, stomatite), patologie del sistema emolinfopoietico (neutropenia), sindrome mano-piede (eritrodisestesia palmo-plantare), affaticamento, astenia, anoressia, cardiotossicità, peggioramento della disfunzione renale (https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer_003029_040593_RCP.pdf&sys=m0b1l3,https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/xeloda-epar-product-information_it.pdf).

La capecitabina differisce dal 5-FU per una minore gravità e incidenza soprattutto di mielodepressione e diarrea. Al contrario, si manifesta con maggiore frequenza la sindrome mano-piede (Rossi F. *et al.*, 2016).

Le ADR sono di seguito elencate secondo la classificazione organosistemica MedDRA. Le frequenze sono definite usando la seguente convenzione: Molto

comune (≥ 1/10) Comune (≥ 1/100,< 1/10), Non comune (≥ 1/1.000, < 1/100) Raro (≥ 1/10.000, < 1/1.000) Molto raro (< 1/10.000) Non nota (non può essere definita sulla base dei dati disponibili).

Infezioni ed infestazioni. Molto comune: infezioni. Non comune: sepsi. *Patologie del sistema emolinfopoietico.* Molto comune: insufficienza midollare (insorgenza: 7-10 giorni, nadir: 9-14 giorni, recupero: 21-28 giorni), neutropenia, trombocitopenia, leucopenia, agranulocitosi, anemia e pancitopenia. Comune: neutropenia febbrile.

Cardiotossicità. Comune: dolore toracico simile all'angina pectoris. Non comune: aritmia, infarto miocardico, ischemia miocardica, miocardite, insufficienza cardiaca, cardiomiopatia congestizia, shock cardiogeno. Molto raro: arresto cardiaco, morte cardiaca improvvisa. Non nota: tachicardia, pericardite, cardiomiopatia da stress (sindrome tako-tsubo).

Patologie gastrointestinali. Molto comune: infiammazione della mucosa (stomatite, esofagite, faringite, proctite), diarrea, nausea, vomito. Comune: enterite, dolore addominale, ulcera duodenale, duodenite, gastrite e glossite. Non comune: ulcera ed emorragia gastrointestinale (può comportare sospensione del trattamento), formazione di escara. Raro: ischemia intestinale. Non nota: possibili sclerosi intra ed extra epatiche, pneumatosi intestinale.

Disturbi del metabolismo della nutrizione. Molto comune: iperuricemia, appetito ridotto. Non comune: disidratazione. Non nota: acidosi lattica, sindrome da lisi tumorale.

Disturbi del sistema immunitario. Molto comune: immunosoppressione con un aumentato rischio di infezione. Raro: reazioni allergiche generalizzate, reazione anafilattica, shock anafilattico.

Patologie del sistema nervoso. Non comune: nistagmo, cefalea, capogiro, Parkinsonismo, sindrome piramidale, sonnolenza. Raro: ischemia cerebrale. Molto raro: sintomi di leucoencefalopatia tra cui atassia, sindrome cerebellare acuta (che può persistere anche dopo il termine del trattamento), disartria, afasia, crisi convulsiva o coma. Non nota: neuropatia periferica, letargia, encefalopatia iperammoniemica, sindrome da encefalopatia posteriore reversibile (PRES).

Patologie della cute e del tessuto sottocutaneo. Molto comune: alopecia (può verificarsi in un consistente numero di casi, soprattutto nelle donne, ma è reversibile); sindrome di eritrodisestesia palmo-piantare (sindrome mano-piede), osservata con l'infusione protratta e continua a dose elevata, inizia con la disestesia del palmo della mano e della pianta del piede e progredisce fino a provocare dolore e indolenzimento. Sono presenti gonfiore e eritema simmetrico associato della mano e del piede. Comune: dermatite. Non comune: alterazioni cutanee (ad es. cute secca, vescicola, erosione cutanea, eritema, rash maculopapulare pruritico), eruzione cutanea, orticaria, reazione di fotosensibilità, iperpigmentazione cutanea, iperpigmentazione striata o depigmentazione vicino alle vene. Cambiamenti nelle unghie (ad. es. pigmentazione blu superficiale diffusa, iperpigmentazione, distrofia ungueale, dolorabilità e ispessimento del letto ungueale, paronichia) e onicolisi. Non nota: Lupus eritematoso cutaneo.

Patologie del sistema muscoloscheletrico e del tessuto connettivo. Molto raro: debolezza muscolare. Patologie renali e urinarie Molto raro: insufficienza renale. Patologie dell'occhio: Non comune: lacrimazione aumentata, visione offuscata, disturbo del movimento oculare, neurite ottica, diplopia, acuità visiva diminuita, fotofobia, congiuntivite, blefarite, ectropion, dacriostenosi acquisita. Non nota: compromissione della visione. Disturbi psichiatrici: Non comune: umore euforico.

Raro: stato confusionale. Molto raro: disorientamento.

Patologie dell'apparato riproduttivo e della mammella. Non comune: azoospermia e disturbo dell'ovulazione. Patologie sistemiche e condizioni relative alla sede di somministrazione: Molto comune: ritardo nella guarigione delle ferite, malessere, astenia, stanchezza. Non nota: piressia, alterazione del colore della parete vascolare in prossimità dei siti di iniezione, trombosi arteriosa, sanguinamento a livello della cannula, ostruzione della cannula, embolia, fibromialgia, ascesso, infezione in sede di catetere.

Patologie vascolari. Raro: ischemia periferica, fenomeno di Raynaud, tromboembolia, tromboflebite / vene ingrossate. Non comune: ipotensione. Non nota: aneurisma, ischemia.

Patologie respiratorie, toraciche e mediastiniche. Molto comune: epistassi, broncospasmo. Non nota: dispnea. Patologie epatobiliari: Non comune: traumatismo epatocellulare. Molto raro: necrosi epatica (casi con esito fatale), sclerosi biliare, colecistite.

Esami diagnostici. Molto comune: anomalie ischemiche nell'ECG Raro: tiroxina aumentata, triiodotironina aumentata. Non nota: variazione dell'elettrocardiogramma.

1.7 La Riconciliazione Farmacologica

Nei momenti di transizione di cura (e.g. ricovero del paziente in ospedale, dimissione, trasferimento tra reparti della stessa struttura o ad altra struttura sanitaria) avvengono la maggior parte degli errori che possono causare danno al paziente comportando spesso un prolungamento della degenza o ricoveri ripetuti con l'impiego (altrimenti evitabile) di ulteriori risorse sanitarie.

(https://www.who.int/initiatives/medication-without-harm)**.**

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) raccomanda interventi per la prevenzione degli errori in terapia derivati da un'inadeguata conoscenza dei trattamenti in atto e considera la riconciliazione farmacologica una delle migliori strategie per garantire la qualità delle cure. (https://www.who.int/initiatives/medication-without-harm).

In Italia, il Ministero della Salute ha emanato una raccomandazione che fornisce indicazioni sul processo di Riconciliazione della terapia farmacologica (Raccomandazione n.17/2014) (https://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2354_allegato.pdf).

La riconciliazione farmacologica è un processo formale che permette, in modo chiaro e completo, di rilevare e conoscere la terapia seguita dal paziente, assieme ad altre informazioni cliniche, biometriche e demografiche, e consente al medico di arrivare ad una decisione prescrittiva appropriata.

La procedura prevede il coinvolgimento di un gruppo multidisciplinare costituito da figure professionali diverse che cooperano per indirizzare il paziente verso il migliore trattamento farmacologico disponibile.

La prima fase (Ricognizione) è la raccolta dei dati del paziente e delle informazioni sui medicinali assunti e si realizza attraverso un'intervista strutturata, possibilmente usufruendo di un sistema informatizzato.

Nello specifico, le informazioni da considerare sono le seguenti:

- Nome commerciale e del principio attivo;
- Forma farmaceutica;
- Dosaggio;
- Posologia giornaliera;
- Data di inizio e durata della terapia;
- Data e ora dell'ultima dose assunta;

- Via di somministrazione;

- Eventuali trattamenti sperimentali, tra cui anche l'utilizzo di farmaci off label;

- Assunzione di omeopatici, fitoterapici e integratori;

- Presenza di patologie, allergie o intolleranze;

- Terapie pregresse ed eventuali effetti indesiderati;

- Assunzione di alimenti che interferiscono con la terapia;

- Dati concernenti peso e altezza del paziente;

- Stili di vita;

- Utilizzo di dispositivi medici medicati;

- Ogni altro dato significativo e contemplato nella procedura interna.

La seconda fase (Riconciliazione) prevede il confronto tra la terapia seguita e quella che si vuole impostare in accordo con la condizione clinica del paziente.

La Scheda di Ricognizione/Riconciliazione deve essere di facile utilizzo, disponibile e conosciuta da tutti i professionisti individuati dalla procedura. Deve riportare esattamente quanto riferito o esibito dal paziente o dal familiare/caregiver oppure attestato dal medico curante, relativamente alle terapie

Farmacologiche e fitofarmacologiche in corso. Una copia deve essere trasferita al reparto che prende in carico il paziente e può essere consegnata alla dimissione quale documento integrante la lettera di dimissione da consegnare al medico di medicina generale o al pediatra di famiglia (https://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2354_allegato.pdf).

1.8 La farmacogenetica delle Fluoropirimidine

A marzo 2019, su richiesta dell'Agenzia francese di regolamentazione per i medicinali ANSM, il Comitato di Valutazione dei Rischi per la Farmacovigilanza (PRAC) ha avviato una revisione sulla sicurezza dei farmaci a base di fluoropirimidine.

Le raccomandazioni del PRAC sono state inviate al Comitato per i Medicinali per uso Umano (CHMP). Il parere del CHMP è stato trasmesso alla Commissione europea che, tra il 3 luglio e il 7 luglio 2020, ha raccomandato l'esecuzione di test per verificare l'assenza dell'enzima DPD nei pazienti che devono iniziare

la terapia a base di fluoropirimidine (https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/fluorouracil-fluorouracil-related-substances-article-31-referral-ema-recommendations-dpd-testing_it.pdf). Nei soggetti con deficit funzionale della DPD è stata dimostrata infatti una riduzione o assenza dell'attività enzimatica misurata nei leucociti del sangue periferico. I soggetti con un importante deficit dell'enzima presentano una t1/2 del 5-FU di 159 minuti con circa il 90% della dose eliminata come tale nelle urine. Questi possono rappresentare valori molto alti se paragonati ai 6-13 minuti di un soggetto con normale attività della DPD, nei quali solo il 10% della dose è escreta immodificata nelle urine (Diasio et al. 1988). Una elevata concentrazione di 5-FU, attribuibile ad una diminuzione dell'attività enzimatica DPD, accelera di circa due volte rispetto al normale la comparsa dei sintomi tossici clinicamente rilevabili. Una stretta relazione è stata dimostrata tra la concentrazione plasmatica di 5-FU ed il rischio di leucopenia e mucosite (Van Kuilenburg AB et al., 2000).

Per testare il deficit di DPD nei pazienti è possibile misurare il livello di uracile (una sostanza scomposta dalla DPD) nel sangue o verificare la presenza di alcune varianti nel gene per la DPD.

Si inserisce, in questo contesto, la farmacogenetica che studia le variazioni interindividuali nella sequenza del DNA in relazione alla risposta ai farmaci.

Sono stati evidenziati polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) a carico del gene che codifica per la DPD (DPYD), responsabili di un inefficiente metabolismo del farmaco con conseguente aumento del rischio di tossicità grave anche potenzialmente fatale.

Il gene DPYD, localizzato nella posizione 22 del braccio corto del cromosoma 1, è altamente polimorfico.

Sono stati rilevati oltre 30 diversi polimorfismi del gene DPYD e questi possono trovarsi in forma eterozigote (uno SNP su un solo allele), in forma omozigote (due SNPs identici sui due alleli) o in doppia forma eterozigote (due diversi SNPs su uno o due alleli). Sulla base di un test farmacogenetico di routine diventa possibile predire la risposta di un paziente ad un certo farmaco.

In base a tale test, il paziente avrà un genotipo compatibile con un determinato fenotipo per il quale, secondo le più recenti linee guida dei Consorzi Farmacogenetici, verranno raccomandati eventuali aggiustamenti del dosaggio di farmaco o la sospensione di quest'ultimo (https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2024/11/2024_Racc-analisi-farmacogenetiche-update.pdf, https://cpicpgx.org/guidelines/guideline-for-fluoropyrimidines-and-dpyd/, https://www.nature.com/articles/s41431-019-0540-0).

1.8.1 Polimorfismi del gene DPYD

*DPYD*2A (IVS14+1G>A, rs3918290)*

Il polimorfismo IVS14+1G>A, anche nota come *DPYD*2A, è la variante del gene DPYD più importante e più frequente. Essa consiste nella sostituzione della guanina (G) in posizione 1986 con una adenina (A) all'estremità 5' dell'introne 14 (Van Kuilenburg et al.,1997).

Tale SNP non permette il riconoscimento del sito durante lo splicing del pre-mRNA e causa la delezione dell'intero esone 14 con conseguente perdita di 164 bp. Vengono in questo modo persi circa 55 residui amminoacidici, dal 581 al 635, nella sequenza primaria della DPD. Si genera una proteina tronca e cataliticamente inattiva (Figura 7).

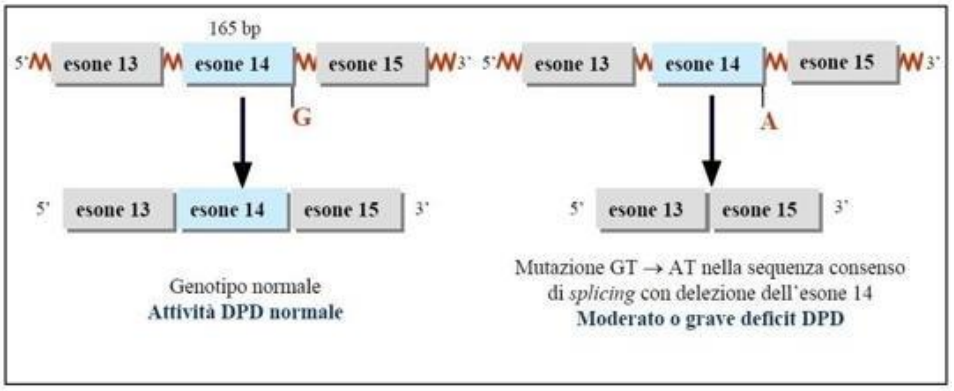


Figura 7: *Polimorfismo nel sito di splicing dell'esone 14 nel gene DPYD*

La frequenza di tale polimorfismo è dello 0,1% nella popolazione afroamericana e del 2-4% nella popolazione caucasica. Nei portatori eterozigoti di tale variante, che hanno un allele funzionale ed uno disfunzionale, si ha una riduzione dell'attività dell'enzima che va dal 30% al 70%. Un portatore omozigote, con entrambi gli alleli non funzionali, produce invece una deficienza completa dell'enzima, al punto di determinare grave tossicità in seguito a trattamento con fluoropirimidine.

Il Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) e il Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG) raccomandano una riduzione del 50% della dose di 5-FU o di capecitabina al primo ciclo di terapia in pazienti portatori eterozigoti della variante *DPYD**2A. Nel caso in cui questi ultimi, siano omozigoti per la variante *DPYD**2A, viene sconsigliata la somministrazione delle fluoropirimidine.

*DPYD*13 (1679T>G; I560S rs55886062)*

La mutazione 1679T>G, anche nota come *DPYD**13, è caratterizzata dalla sostituzione amminoacidica Ile560Ser nel sito di legame per il FAD, interferendo con il legame di tale cofattore. La conseguenza funzionale di questa variante non è ancora ben nota ma sembra determinare destabilizzazione in una regione sensibile dell'enzima.

L'SNP *DPYD**13 si presenta nella popolazione caucasica con una frequenza che varia dallo 0,07% allo 0,1% (Henricks L. M. et al., 2015). Si prevede che un genotipo eterozigote per c.1679T>G abbia una riduzione del 40-50% dell'attività della DPD mentre la variante in omozigosi sembra comportare una perdita di

attività di circa il 75% e dunque una inattivazione enzimatica quasi completa.

Diverse metanalisi dimostrano che il polimorfismo *DPYD**13 aumenta il rischio di tossicità grave globale di circa quattro volte e, più dettaglio, di 9 e 5 volte per la tossicità ematologica e gastrointestinale rispettivamente. (Henricks L. M. et al., 2015). Per i pazienti eterozigoti *DPYD**13 è consigliabile adottare una riduzione del dosaggio di 5-FU o capecitabina del 50%, analogamente a quanto succede per la variante *DPYD**2A (https://cpicpgx.org/guidelines/guideline-for-fluoropyrimidines-and-dpyd/).

c.2846A>T (D949V; rs67376798)

Il polimorfismo c.2846A>T causa il cambiamento amminoacidico Asp949Val a livello di un cluster ferro-zolfo dell'enzima DPD. La conseguenza di tale cambiamento è una interferenza con il legame del cofattore o nel trasporto di elettroni. La frequenza con cui questa variante si presenta va da 0,1 a 1,1% negli afroamericani e nei caucasici rispettivamente. Studi *in vitro* hanno dimostrato che il polimorfismo c.2846A>T in omozigosi determina una riduzione del 59% dell'attività enzimatica rispetto alla forma wild-type mentre, la stessa variante, in eterozigosi comporta una riduzione del 25%. Questo suggerisce che nonostante l'attività enzimatica sia ridotta non è comunque paragonabile alla riduzione che si verifica nella mutazione *DPYD**2A. Diversi studi e due metanalisi hanno comunque dimostrato una associazione tra questa variante polimorfica ed un aumento di grave tossicità associata al trattamento con fluoropirimidine (Henricks L. M. et al.,2015). Per tale motivo, anche nei mutati c.2846A>T è consigliata una riduzione del dosaggio di 5-FU o capecitabina del 50% (https://www.aiom.it/wp-

content/uploads/2024/11/2024_Racc-analisi-farmacogenetiche-update.pdf,

https://cpicpgx.org/guidelines/guideline-for-fluoropyrimidines-and-dpyd/,

https://www.nature.com/articles/s41431-019-0540-0).

c.1129-5923C>G *(rs75017182)*

La variante c.1129-5923C>G, situata in profondità nell'introne 10, introduce un sito di splice criptico e la produzione parziale di un trascritto non funzionale. Questa variante è in linkage disequilibrium con il polimorfismo c.1236G>A (rs56038477) presente nell'introne 11. Questo assetto genotipico è indicato come aplotipoB3. Negli europei, HapB3 con c.1129-5923C>G è la variante DPYD a funzione ridotta più comune con frequenza del 4,7%.

c.1129-5923C>G è responsabile di uno splicing aberrante sul pre-mRNA. La conseguenza di ciò è l'inserimento di un frammento di 44 bp all'interno di un mRNA maturo, con la conseguente formazione di un codone di stop precoce.

La variante c.1236G>A produce circa la metà della riduzione dell'attività DPD determinata dal polimorfismo DPYD*2A e dunque in un paziente eterozigote una riduzione del 25-50% è raccomandata (https://cpicpgx.org/guidelines/guideline-for-fluoropyrimidines-and-dpyd/). Non esistono molti dati sulla sicurezza del trattamento con fluoropirimidine in pazienti omozigoti per la variante c.1236G>A/HapB3; tuttavia, le linee guida raccomandano una riduzione della dose del 50% (https://cpicpgx.org/guidelines/guideline-for-fluoropyrimidines-and-dpyd/).

*DPYD**6 (*c.2194G>A, rs1801160)*

Sebbene la variante non sinonima c.2194G>A (p.V732I, DPYD*6) non sia associata a una marcata riduzione dell'attività della DPD come le altri varianti sopramenzionate (https://cpicpgx.org/guidelines/guideline-for-fluoropyrimidines-and-dpyd/), le attuali linee guida AIOM-SIF ne raccomandano lo screening, seppure dopo che è iniziato il trattamento chemioterapico (https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2024/11/2024_Racc-analisi-farmacogenetiche-update.pdf).

In particolare, è stato osservato che tale variante sia associata a tossicità da fluoropirimidine prevalentemente ematologica. (Del Re M. *et al.*, 2019, Boige V. et al., 2016, Ruzzo A. *et al.*, 2017).

Recenti evidenze a fronte di un'aumentata incidenza di tossicità a livello ematologico e gastrointestinale nei soggetti portatori di queste varianti rispetto ai wild-type, raccomandano lo screening prima di iniziare la terapia (Ardizzone et al., 2024).

1.8.2 Altri polimorfismi associati alla farmacogenetica delle fluoropirimidine

La carenza di DPD può non essere legata ad una alterazione del gene DPYD ma anche alla presenza di altri polimorfismi, ancora in fase di studio.

TS

La Timidilato Sintasi è un enzima chiave nella sintesi dei nucleotidi ed è il bersaglio molecolare principale del 5-FU. La sua espressione può essere influenzata da tre varianti geniche. La prima è caratterizzata da una variabilità nel numero di ripetizioni (2 o 3) di una sequenza di 28 basi situata nel promotore del gene TYMS chiamata TSER (dove per TSER si intende *TS promoter enhancer region*).

La variante allelica del gene TYMS caratterizzata da due ripetizioni (2R) è

stata associata alla risposta del trattamento a base di fluoropirimidine sia in termini di tossicità che in termini di risposta tumorale, di sopravvivenza e di tempo alla progressione, in pazienti trattati con fluoropirimidine (Rosmarin D. *et al*., 2014; Chua W. *et al.*, 2011). La seconda variante del gene TYMS è data da uno SNP G>C nell'allele 3R (3R G>C SNP) mentre la terza variante presenta una delezione di 6 paia di basi nella regione 3'-UTR del gene TYMS (TS1494del6) (Schaerer, D. et al., 2020). In particolare, gli aplotipi 2RG/2RG, 2RG/3RC e 3RC/3RC formati da TSER e dallo SNP G>C sono associati a bassi livelli di espressione del gene TYMS a loro volta associati a una migliore risposta al trattamento in termini di efficacia (Lima, A. et al., 2014). La variante TSER 2R/3R è stata associata a maggiore tossicità in una coorte di pazienti con cancro del colon-retto a sottoposti a regime chemioterapico a base di capecitabina (Rosmarin D. *et al*., 2014).

MTHFR

La metilenetetraidrofolato reduttasi è il principale enzima coinvolto nella conversione del 5,10- metilenetetraidrofolato a 5-metilenetetraidrofolato. A sua volta il 5-metilenetetraidrofolato permette la ri-metilazione dell'omocisteina a metionina, richiesta, quest'ultima, per la metilazione dell'acido nucleico. Il 5,10-metilenetetraidrofolato è anche uno dei componenti del complesso ternario di inibizione della TS insieme alla TS stessa e al 5-dUMP.

Per questo motivo, le varianti del gene MTHFR sono responsabili dei livelli di 5,10-metilenetetraidrofolato e possono svolgere un ruolo importante nell'attività citotossica del 5-FU. (Chua W. et al.,2011).

Sono stati identificati due polimorfismi responsabili dell'alterazione dell'attività enzimatica di MTHFR: SNP 677C>T e SNP1298A>C.

La variante 677C>T consiste in una sostituzione della citosina con la timina alla posizione 677, che determina lo scambio di alanina con valina al residuo 222 del sito catalitico dell'enzima. La variante 1298A>C è caratterizzata dalla sostituzione di glutammina con alanina nel codone 429 del dominio di regolazione enzimatico.

Entrambi i polimorfismi sono stati associati ad una ridotta attività dell'enzima MTHFR, con conseguente incremento dei livelli di omocisteina ed alterazione della distribuzione intracellulare dei folati. Essendo i folati target del trattamento con fluoropirimidine, tali polimorfismi possono alterare il risultato clinico di una terapia con tali farmaci. (Chua W. et al., 2011). Inoltre, livelli elevati nel sangue di omocisteina sono associati a un aumentato rischio trombotico (Zaric BL. et al., 2019). Il ruolo di questi polimorfismi come fattori di rischio per la trombosi è ancora da chiarire (Moll S, Varga EA., 2015).

Le varianti di MTHFR 677C>T e 1298A>C possono aumentare la tossicità di 5-FU sia incrementando i livelli intracellulari di 5,10-metilenetetraidrofolato sia aumentando la formazione e la stabilità del complesso ternario inibente l'enzima TS.

1.9 Altre “omic sciences”: Metabolomica e Proteomica

Dopo il successo del progetto genoma umano concluso nel 2003, la genetica molecolare e l’analisi genomica hanno subìto un forte sviluppo. Negli ultimi due decenni, il suffisso “omic” dall’iniziale “Genomica”si è esteso a discipline che, attraverso lo sviluppo di tecnologie high-throughput, studiano diversi livelli di complessità biologica (DNA, mRNA, proteine, metaboliti, ecc.). L’integrazione di queste discipline nel Servizio Sanitario Nazionale (SSN), contemplata per la prima volta nella conferenza Stato-Regioni 2013 (4.10/2013/32 (Servizio III) Intesa ai sensi dell’articolo 8, comma 6, della legge 5 giugno 2003, n. 131), ha permesso la diffusione su larga scala della medicina personalizzata che vede come fine ultimo la scelta della terapia più efficace e sicura per il paziente, sulla base del suo corredo biologico.

Lo sviluppo della ricerca sul proteoma ha aperto la strada all’approccio metabolomico, finalizzato a misurare i metaboliti, composti a basso peso molecolare derivati dall’espressione delle singole proteine (Bujak et al., 2015).

Contrariamente al genoma o al proteoma, la composizione del metaboloma umano non è ancora stata definita completamente. Esistono alcuni approcci di ricerca sia non mirati, untargeted che mirati, targeted che sono emersi nell'analisi del metaboloma: il metabolic footprinting, untargeted, che si concentra sui metaboliti extracellulari; il metabolic fingerprinting, untargeted che si concentra sui metaboliti intracellulari e il metabolic profiling, targeted che comporta una preselezione di un insieme di metaboliti, o una classe specifica di composti, che potrebbero partecipare a un percorso mirato (Bujak R et al., 2015).

Tra le tecniche utilizzate vanno annoverate la spettrometria di massa gas e liquida

(GC-MS; LC-MS); risonanza magnetica nucleare (Nuclear Magnetic Resonance, NMR); gas cromatografia e cromatografia liquida e HPLC (Cromatografia liquida ad alte prestazioni) (Bujak R et al., 2015).

Le evidenze di metabolomica nel trattamento con fluoropirimidine hanno riguardato principalmente la valutazione delle concentrazioni plasmatiche di uracile (U) e del rapporto diidropirimidina/uracile (UH_2/U) (Conti V. et al., 2020). Questi parametri sono stati proposti come biomarcatori pretrattamento sensibili e predittivi della tossicità da fluoropirimidine, poiché riflettono indirettamente l'attività della dihidropirimidina deidrogenasi (DPD), l'enzima chiave nel catabolismo del 5-fluorouracile (Boisdron-Celle M. et al., 2007; Van Staveren M.C. et al., 2013).

E' stata osservata una relazione tra la tossicità indotta dalle FP e un fenotipo DPD caratterizzato da un basso rapporto [UH2]/[U] (Gamelin, E. et al., 1999).

In particolare, Kristensen ha proposto un valore inferiore a 4 per identificare i pazienti a rischio di tossicità (Kristensen, M.H. et al., 2010).

Altri autori hanno fissato il valore limite a 6, specificando che i pazienti portatori di un allele funzionale e uno non funzionale del DPYD (cioè eterozigoti) hanno un rapporto UH2/U compreso tra 1,5 e 6, mentre quelli che sono portatori di due alleli non funzionali (cioè omozigoti) hanno un valore vicino a 0, corrispondente a una carenza completa di DPD (Thomas F. et al, 2016).

Lo studio di Campanella et al. (Campanella B. et al., 2022) ha misurato le concentrazioni di diidrouracile da campioni di salvia mediante cromatografia liquida ad alta prestazione in fase inversa (RP-HPLC-UV detector). Il metodo utilizzato, sebbene più economico e meno invasivo rispetto ai precedenti, non ha consentito di rilevare concentrazioni apprezzabili del metabolita in esame,

suggerendo che esso non rappresenti il principale metabolita presente nella saliva.

1.10 Farmacovigilanza

Secondo la definizione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, la Farmacovigilanza rappresenta tutte "le attività intraprese per raccogliere, archiviare, identificare, analizzare, valutare e informare sui rischi e benefici dei medicinali al fine di mantenere, modificare, sospendere o revocare la loro autorizzazione all'immissione in commercio, o qualsiasi altra azione regolatoria". Tutte queste attività vengono effettuate per tutto l'intero ciclo di vita di un medicinale a partire dallo stadio pre-autorizzativo (https://www.who.int/teams/regulation-prequalification/regulation-and-safety/pharmacovigilance).

Tuttavia, è soprattutto nello stadio post-autorizzativo, di "real world", che la Farmacovigilanza si avvale dell'utilizzo di una cospicua mole di dati sulla sicurezza provenienti dalla popolazione stessa.

Molteplici sono le fonti da cui vengono ricavati tali dati: segnalazioni di sospette reazioni avverse (spontanee e non spontanee), studi clinici, letteratura scientifica, rapporti di industrie farmaceutiche, ecc. (https://www.aifa.gov.it/en/farmacovigilanza1).

Inoltre, programmi e studi di farmacovigilanza attiva finanziati dall'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) sono condotti al fine di migliorare le attuali conoscenze sui farmaci relativamente al loro profilo di sicurezza e utilizzo nella pratica clinica (https://www.aifa.gov.it/en/farmacovigilanza1).

1.11 Programma di oncovigilanza sulle fluoropirimidine

Nel contesto dei progetti di Farmacovigilanza attiva, un programma di oncovigilanza basato sulla rilevazione delle ADR di grado severo associate all'utilizzo di chemioterapia a base di fluoropirimidine per il trattamento dei pazienti con tumori solidi è stato disegnato.

Si tratta di uno studio multicentrico nazionale di natura osservazionale, prospettico, no-profit, della durata di due anni a cui partecipano le U.O. afferenti alle Regioni Campania (Regione capofila), Molise, Veneto e Liguria. Lo studio è attualmente in corso presso l'U.O.C di Farmacologia Clinica dell'A.O.U. "San Giovanni di Dio e Ruggi d'Aragona" di Salerno (Centro Coordinatore).

L'obiettivo primario è quello di realizzare nelle regioni interessate, un programma di oncovigilanza basato sulla rilevazione delle ADR di grado severo associate all'utilizzo di chemioterapia a base di fluoropirimidine per il trattamento dei pazienti con tumori solidi.

Tra gli obiettivi secondari rientrano l'analisi delle ADR di grado severo in pazienti con tumori solidi in trattamento con fluoropirimidine a genotipo noto in relazione ad eventuali polimorfismi del gene DPYD; la diffusione del messaggio sull'importanza della segnalazione di ADR nell'area oncologica; la ricerca di altri biomarcatori utili per la personalizzazione della terapia.

2 SCOPO DELLA TESI

Nell'ambito del sopracitato studio di farmacovigilanza attiva, in qualità di dottoranda afferente al settore della Farmacologia Clinica, ho partecipato sia alle attività laboratoriali sia a quelle cliniche, acquisendo una visione complessiva dei molteplici fattori che influenzano la risposta al trattamento farmacologico con fluoropirimidine. Il presente lavoro di tesi si propone pertanto di effettuare una valutazione integrata dei fattori genetici, della polifarmacoterapia e dei determinanti omici, al fine di comprendere meglio la variabilità di risposta al trattamento e contribuire allo sviluppo di strategie terapeutiche più sicure ed efficaci.

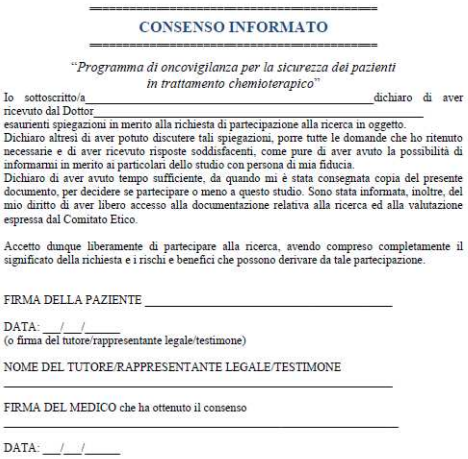
3 MATERIALI E METODI

3.1 Monitoraggio clinico nell'ambito dello studio

Vengono esclusi i pazienti già sottoposti a trattamento con fluoropirimidine e/o coloro che non firmano il consenso informato (Figura 8) e/o ritirano quest'ultimo durante il periodo dello studio. Sono inclusi nello studio i pazienti con età >18 anni, che afferiscono all'U.O di Oncologia dell'AOU "San Giovanni di Dio e Ruggi d'Aragona" di Salerno.

Si tratta di pazienti oncologici con diagnosi di tumori solidi a genotipo noto e non noto, che iniziano il trattamento chemioterapico a base di fluoropirimidine, in monoterapia o in associazione.

I pazienti che decidono di partecipare allo studio, accettano di sottoporsi a un costante monitoraggio clinico da parte sia dell'Unità di Oncologia che di Farmacologia Clinica.



CONSENSO INFORMATO

"Programma di oncovigilanza per la sicurezza dei pazienti in trattamento chemioterapico"

Io sottoscritto/a _____dichiaro di aver ricevuto dal Dottor_____
esaurienti spiegazioni in merito alla richiesta di partecipazione alla ricerca in oggetto.
Dichiaro altresì di aver potuto discutere tali spiegazioni, porre tutte le domande che ho ritenuto necessarie e di aver ricevuto risposte soddisfacenti, come pure di aver avuto la possibilità di informarmi in merito ai particolari dello studio con persona di mia fiducia.
Dichiaro di aver avuto tempo sufficiente, da quando mi è stata consegnata copia del presente documento, per decidere se partecipare o meno a questo studio. Sono stata informata, inoltre, del mio diritto di aver libero accesso alla documentazione relativa alla ricerca ed alla valutazione espressa dal Comitato Etico.

Accetto dunque liberamente di partecipare alla ricerca, avendo compreso completamente il significato della richiesta e i rischi e benefici che possono derivare da tale partecipazione.

FIRMA DELLA PAZIENTE _____

DATA: __/__/_____
(o firma del tutore/rappresentante legale/testimone)

NOME DEL TUTORE/RAPPRESENTANTE LEGALE/TESTIMONE
_____

FIRMA DEL MEDICO che ha ottenuto il consenso
_____

DATA: __/__/_____

Figura 8: *Consenso Informato*

3.2 Electronic Case Report Form

Ai pazienti arruolati viene assegnato un codice univoco valido per un centro.

I dati demografici anamnestici e clinici vengono registrati in una apposita scheda di raccolta dati elettronica (*Electronic Case Report form, eCRF*). Sono state create due eCRF: una per il basale e un'altra per il follow up (Figura 9).



Figura 9: *eCRF al basale (sinistra) e al follow up (destra)*

Particolare attenzione è riservata alla registrazione sia dei farmaci inclusi nel regime chemioterapico somministrato sia degli altri farmaci, fitofarmaci,

supplementi dietetici non oncologici assunti concomitantemente.

I parametri del basale sono confrontati con quelli post-terapia, nella quale sono annotate, in aggiunta, le possibili tossicità da farmaco comparse in seguito ai cicli di terapia.

3.2.1 DDI Checkers

La registrazione dei farmaci concomitanti è essenziale per poter individuare specifiche interazioni farmaco-farmaco (DDI) e predire la potenziale comparsa di reazioni avverse correlate. L'UOC di Farmacologia Clinica usa specifici tools informatici ovvero DDI Checkers a tal scopo. DDI Checkers quali *Drugs.com, Medscape, WebMD, Liverpool Cancer, Drugbank, Lexicomp* e *Micromedex* vengono consultati.

Tali strumenti permettono di registrare tutti i farmaci assunti dai pazienti e identificano potenziali DDI da causare reazioni avverse. In base alla gravità di queste ultime, le potenziali interazioni vengono classificate in maggiori, moderate e minori.

Dati della letteratura e di real life sono le fonti di cui si servono questi tools per poter dare questo risultato.

3.8 Criteri CTCAE

La risposta al trattamento in termini di tossicità è valutata secondo i criteri CTCAE (Common Terminology Criteria in Adverse Events). Questi criteri sviluppati dal National Cancer Institute (NCI) sono utilizzati negli studi clinici per

fornire una standardizzazione e una coerenza nella definizione della tossicità correlata al trattamento chemioterapico.

Sono stati pubblicati diversi aggiornamenti del CTCAE, la versione 5.0, pubblicata nel 2018, è quella più recente ed usata in questo studio.

Gli eventi avversi sono suddivisi in ordine alfabetico per gruppi di patologia e in cinque gradi di tossicità crescente sulla base della descrizione dell'evento (**Figura 10**).

Gastrointestinal disorders					
CTCAE Term	**Grade 1**	**Grade 2**	**Grade 3**	**Grade 4**	**Grade 5**
Diarrhea	Increase of <4 stools per day over baseline; mild increase in ostomy output compared to baseline	Increase of 4 - 6 stools per day over baseline; moderate increase in ostomy output compared to baseline; limiting instrumental ADL	Increase of >=7 stools per day over baseline; hospitalization indicated; severe increase in ostomy output compared to baseline; limiting self care ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death

Definition: A disorder characterized by an increase in frequency and/or loose or watery bowel movements.
Navigational Note: -

Figura 10: *Estratto dei CTCAE*

3.4 Criteri RECIST

Pubblicati nel 2000, i criteri RECIST (*Response Evaluation Criteria in Solid Tumors)* sono utilizzati per valutare la risposta delle neoplasie ai trattamenti chemioterapici andando a registrare le variazioni dimensionali del tumore primario e delle eventuali lesioni secondarie. Per fare ciò va utilizzato lo stesso tipo di esame e lo stesso metodo di valutazione sia prima di iniziare la terapia (valutazione basale), che ai successivi follow-up. Tra le tecniche utilizzabili troviamo la TAC (*Tomografia Assiale Computerizzata*), ad oggi considerata la più riproducibile, e la RMN (*NuclearMagneticResonance*), la quale è però caratterizzata da un maggior numero di variabili nell'acquisizione dell'immagine che possono quindi inficiare la corretta valutazione dimensionale. Si procede selezionando le "lesioni target", massimo due per organo e cinque in totale. Le lesioni target sono selezionate in

base alle loro dimensioni (lesioni con diametro maggiore più lungo) e devono essere riproducibili in misurazioni successive. La somma dei diametri di tutte le lesioni target (il diametro maggiore per le lesioni non linfonodali e il diametro minore per i linfonodi patologici) deve essere calcolata alla valutazione basale e utilizzata come riferimento per le successive valutazioni per stabilire la risposta della componente misurabile della neoplasia. Tutte le lesioni non identificate come lesioni target devono essere individuate come non bersaglio ed essere registrate alla valutazione basale (F. Grossi, 2013). Il trattamento chemioterapico può dare tipi di risposta in termini di efficacia differenti a seconda del paziente:

-Risposta completa (CR): scomparsa di tutte le lesioni target. Qualsiasi linfonodo patologico (target o non target) deve avere il diametro minore che si è ridotto a una lunghezza < 10mm.

-Risposta parziale (PR): almeno una diminuzione del 30% nella somma dei diametri delle lesioni target, prendendo come riferimento la somma dei diametri alla valutazionebasale.

-Malattia stabile (SD): riduzione o aumento nella somma dei diametri insufficiente per definirsi PR o PD.

-Progressione di malattia (PD): almeno un aumento del 20% nella somma dei diametri delle lesioni target, prendendo come riferimento la maggior riduzione ottenuta durante il trattamento o la valutazione basale, se questa è la somma minore.

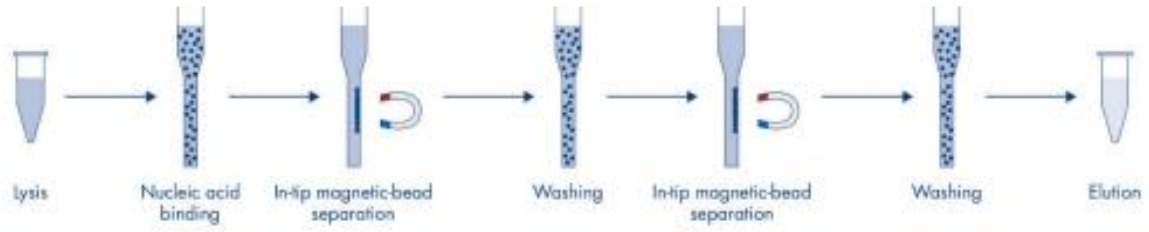
3.6 Genotipizzazione

3.7 Estrazione del DNA

Le analisi farmacogenetiche sono effettuate di routine presso l'UO di Farmacogenetica afferente all'UOC di Farmacologia Clinica dell'Azienda Ospedaliera Universitaria (AOU) di Salerno. Ogni analisi parte da una estrazione del DNA a partire da sangue intero contenuto in provetta con EDTA come anticoagulante. L'estrazione consta di vari passaggi che permettono la lisi delle cellule, il legame del DNA alla silice, il lavaggio del DNA dai residui cellulari e la sua eluizione. L'estrazione viene effettuata in maniera automatizzata con estrattore Qiagen "EZ1 Advanced XL". Tramite questo strumento, possono essere estratti fino a 14 campioni di sangue in 20 minuti.

Dopo la lisi del DNA, quest'ultimo viene isolato dai lisati in un solo passaggio, legandosi alla superficie di silice di biglie in presenza di un sale caotropico. Le biglie vengono separate dai lisati utilizzando un magnete in maniera tale che il DNA possa essere poi efficacemente lavato ed eluito in un tampone di eluizione.

Figura 11: *Workflow estrazione Dna EZ1 Blood (Qiagen)*



Il worktable dell'estrattore contiene due vani necessari per contenere le cartucce di reagenti e i campioni.

Tutti i reagenti necessari per l'estrazione sono contenuti in cartucce sigillate con pellicola che vengono caricate in apposito rack. Ogni cartuccia ha dieci pozzetti di reagenti e due posizioni vuote.

In un altro rack vengono caricati il tubo con i 200 µl di sangue intero, i puntali con i portapuntali e il tubo di eluizione destinato al DNA e l'elution buffer.

Il worktable contiene anche un sistema di riscaldamento per controllare la temperatura dei campioni.

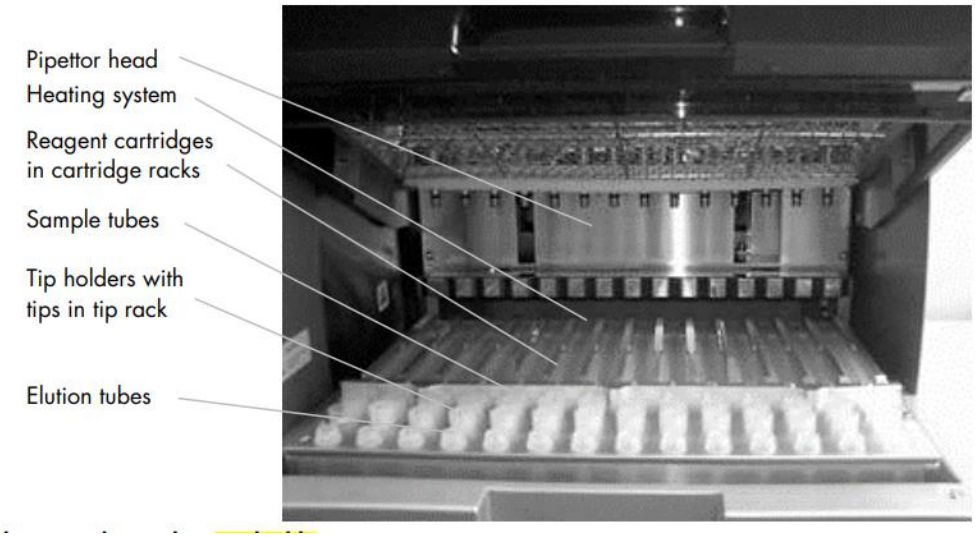


Figura 12: *Worktable EZ1 Advance (Qiagen)*

Tutte le fasi di elaborazione sono eseguite dallo strumento, dalla perforazione delle cartucce di reagenti per poter permettere il prelievo e la dispensazione di questi nei tubi all'eluizione degli acidi nucleici puri.

3.8 Quantizzazione del DNA

La determinazione della concentrazione di DNA ottenuto dall'estrazione viene effettuata tramite spettrofotometro.

Il metodo spettrofotometrico sfrutta la capacità degli acidi nucleici di assorbire, mediante le basi azotate, la luce UV con un massimo di assorbimento ad una lunghezza d'onda di 260 nm. Il valore di assorbimento è direttamente proporzionale alla concentrazione di soluto che assorbe la luce.

Per effettuare la quantizzazione si tara lo strumento con il ''bianco''. A tale scopo viene utilizzato proprio l*'Elution Buffer*, essendo questo presente in soluzione con il DNA estratto.

Si inseriscono circa 3 µl di *Elution Buffer* all'interno di una cuvetta di quarzo e la si inserisce all'interno dello spettrofotometro. La quantizzazione del bianco dovrà dare come assorbanza 0 ng/µl.

A questo punto si procede allo stesso modo utilizzando il DNA estratto e si calcola la relativa assorbanza. Insieme all'assorbanza viene calcolato anche il grado di purezza del DNA, determinando il rapporto tra l'assorbanza a 260 nm, lunghezza d'onda alla quale assorbono gli acidi nucleici, e l'assorbanza a 280 nm, lunghezza d'onda alla quale assorbono le proteine. Il DNA per poter essere considerato puro deve avere un rapporto 260 nm/280 nm compreso tra 1,7 -1,8. Un valore maggiore di 2 indica che il campione è contaminato da RNA, un valore minore di 1,6 indica la contaminazione con proteine.

Conoscere la concentrazione del DNA estratto è fondamentale per poter effettuare l'analisi di genotipizzazione eseguita tramite saggio di discriminazione

allelica in Real-Time-PCR.

3.9 PCR-RealTime

La PCR-*RealTime*, anche nota come *Quantitative* PCR o qPCR, è un metodo che simultaneamente amplifica e quantifica il DNA dopo ogni ciclo di amplificazione. L'amplificazione avviene con una reazione a catena della polimerasi (*Protein Chain Reaction*, PCR). La *RealTime* differisce dalla PCR classica proprio perché permette un'analisi in tempo reale. Ad ogni reazione di PCR, il prodotto raddoppia ad ogni ciclo e sono necessari parecchi cicli affinché l'amplificato sia rilevabile, quindi il diagramma della fluorescenza assume una tendenza sigmoide. Alla fine dei cicli di PCR i substrati della reazione iniziano a mancare e la curva si appiattisce. Il punto della curva in cui la fluorescenza comincia ad aumentare è chiamato il ciclo soglia (valore di Ct). Confrontando i valori di Ct si può calcolare la concentrazione dell'acido nucleico che si vuole quantificare.

I metodi più comuni per la quantificazione includono l'uso di colorazioni fluorescenti intercalanti (metodo efficace ed economico, tuttavia non specifico) nella doppia elica di DNA a doppio-filamento (ds) o di oligonucleotidi modificati del DNA (sonde) che sono fluorescenti dopo ibridati con il materiale genetico.

L'utilizzo di sonde rivelatrici di fluorescenza è il metodo più accurato e affidabile, ma anche il più costoso. Le sonde sono basate su uno stampo di DNA e di RNA specifico. Esse sono disegnate in modo da appaiarsi nella zona compresa fra due *primers* (*forward* e *reverse*) e contengono un colorante fluorescente, il *reporter* (che cresce in maniera proporzionale alla quantità di prodotto di PCR nella reazione), all'estremità 5' ed un colorante spegnitore (o smorzante, *quencher*),

all'estremità 3'. Un esempio è rappresentato dal metodo TaqMan (da PacMan, il *videogame*), in cui la quantificazione del DNA è affidata alla rilevazione del *reporter*.

In condizioni di normale appaiamento sonda-DNA stampo, fino a che la sonda resta intatta, la fluorescenza emessa dal *reporter* viene assorbita totalmente dal *quencher*. Nel momento in cui la DNA-polimerasi incontra la sonda appaiata, comincia a degradarla grazie alla sua attività esonucleasica 5' → 3'. Questo allontanamento tra *reporter* e *quencher* pone fine all'attività di assorbimento e il reporter inizia ad emettere una fluorescenza che aumenterà ad ogni ciclo. L'aumento di fluorescenza (e quindi di sonda degradata) sarà proporzionale alla quantità di amplificato.

Nel laboratorio di farmacogenetica dell'AOU di Salerno la PCR-*RealTime* viene impiegata per analizzare polimorfismi del gene DPYD, utilizzando o lo strumento *Real-Time PCR System, QuantStudio3* della *Applied Biosystem* **(figura 13A)** o l'*EasyPGX* della *diatech pharmacogenetics* **(figura 13B)** usando kit certificati IVD.



A. B.

Figura 13: *Strumenti utilizzanti nel laboratorio A.O.U. "San Giovanni di Dio e Ruggi D'Aragona".* ***A.*** *Real-Time PCR System, QuantStudio3* ***B.*** *EasyPGX*

Con la *QuantStudio3* usiamo kit CE IVD della ditta Realgene. Ognuno di essi contiene:

- Oligo Mix: due *primers* (*forward* e *revers*) e le due sonde, una per l'allele *wild type* ed una per l'allele mutato.
- Taq Mix: DNA polimerasi, i dNTPs, il tampone di reazione ed il *Passive Reference.*
- Controllo Negativo (CTR-): acqua.
- Controllo Positivo (CTR+): DNA umano di riferimento, a genotipo noto. Può essere omozigote, eterozigote o wild type per la mutazione in esame.

La reazione di amplificazione richiede una concentrazione di DNA totale di partenza compresa tra 10 e 20 ng/µl, per cui il DNA precedentemente estratto va eventualmente diluito e poi caricato in una piastra da 96 **(figura 19)** e riempiendo per ciascun pozzetto con:

- 12,5 µl di Taq Mix
- 7,5 µl di Oligo Mix
- 5 µl di CTR+ o CTR- o DNA

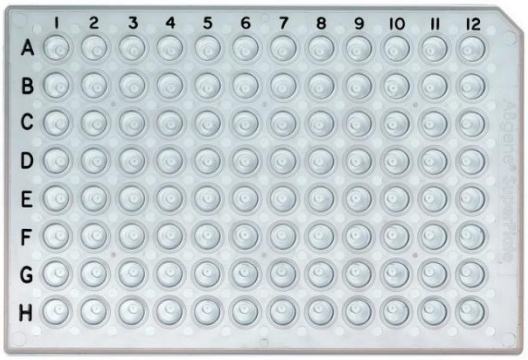


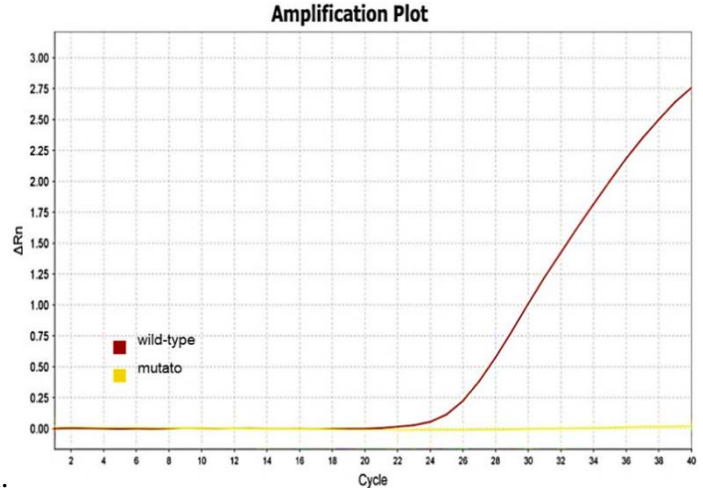
Figura 14: *Esempio di piastra da 96 utilizzata nella QuantStudio 3*

Terminata la dispensazione, si sigilla la piastra con un apposito foglio adesivo

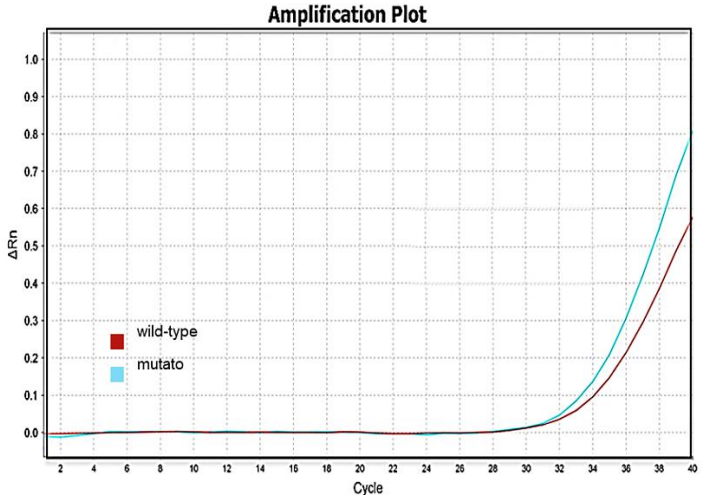
(*film*), la si centrifuga a 4100g per 1,5 minuti e la si posiziona nel termociclatore della PCR-RealTime.

Si setta lo strumento in base al polimorfismo ricercato, impostando il profilo di temperatura corretto, il volume di reazione (25 µl) ed il numero di cicli di PCR a cui devono essere sottoposti i campioni (40 cicli). È necessario anche indicare alla macchina in quali dei 96 pozzetti troverà i campioni da analizzare, quali polimorfismi ricercare. In fine si indicano in quali pozzetti sono stati posizionati i controlli. Al termine della corsa di PCR *Real-time* si ottiene una curva che può assumere aspetti diversi in base al risultato. Nella **figura 15** sono riportati tre esempi per capire le differenze tra gli *output* della macchina.

A.



B.



C.

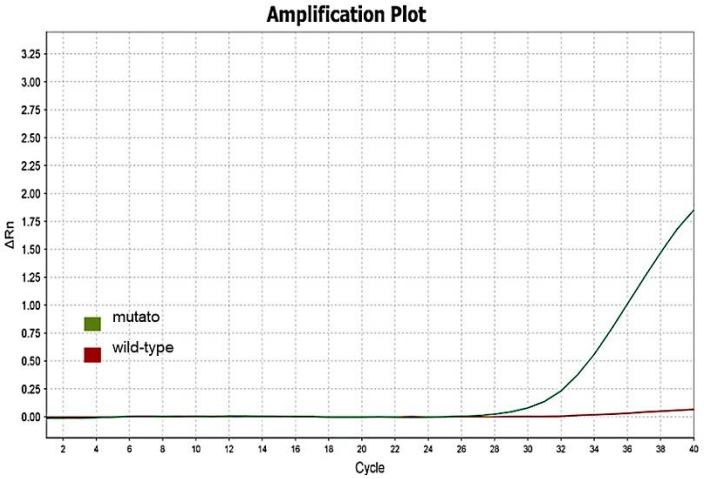


Figura 15: ***A.*** *curva di un campione wild-type (un picco).* ***B.*** *curva di un campione eterozigote (due picchi).* ***C.*** *curva di un campione omozigote mutato (picco opposto a quello della figura A).*

I kit che vengono usati nella EasyPGX, invece, sono composti da strip da 8 pozzetti, precaricati con la forma anidra di tutto il necessario per l'esecuzione del test. Il kit *EasyPGX ready DPYD* contiene i cinque saggi per il rilevamento dei polimorfismi del gene DPYD mediante discriminazione allelica.

4.0 Analisi metabolomiche

Un altro obiettivo del progetto di oncovigilanza è quello di valutare l'attività dell'enzima DPD mediante la misurazione del rapporto $[UH_2]/[U]$.

Per ottenere tale valore, le aliquote di plasma collezionate da ciascun prelievo periferico vengono analizzate presso il laboratorio di farmacocinetica e tossicologia dell'UOC Farmacologia Clinica mediante HPLC accoppiata a spettrometria di massa.

Da ciascun prelievo periferico, oltre alle aliquote di plasma, vengono raccolti anche Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) con l'obiettivo di individuare altri biomarcatori metabolici che possano predire tossicità, risposta terapeutica o variazioni nell'attività enzimatica della DPD. Questi campioni sono analizzati presso il laboratorio spin off "Theoreo srl" mediante gas cromatografia e cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa.

4.1 Analisi statistica

La dimensione del campione è valutata sulla base del livello atteso di precisione della stima della proporzione di ADR gravi in pazienti con fluoropirimidine, che afferiscono alle UO partecipanti.

Considerando che circa il 20% dei pazienti in terapia con i farmaci in studio sviluppa almeno una ADR grave (di grado 3-4) stimato con un intervallo di confidenza al 95% con un'ampiezza del 7.5% è ritenuta necesssaria una popolazione in studio di 462 soggetti..

I metodi statistici applicati in questo studio per descrivere i risultati includono analisi di statistica descrittiva (frequenze assolute, relative, moda, mediana). Fisher test, analisi di regressione logistica e altre analisi di statistica inferenziale.

5.0 RISULTATI

5.1 Caratteristiche clinico-anamnestiche della popolazione in studio

I risultati di seguito esposti si riferiscono a 109 pazienti arruolati nello studio "PROGRAMMA DI ONCOVIGILANZA PER LA SICUREZZA DEI PAZIENTI IN TRATTAMENTO CHEMIOTERAPICO". La popolazione seguita in media per 7 cicli di chemioterapia è rappresentata da 48 donne (44%) e 61 uomini (56%). La tabella 1 mostra le caratteristiche clinico-anamnestiche della popolazione in studio.

Tabella 1: *Caratteristiche clinico-anamnestiche della popolazione in studio*

		N	%
Sesso	Maschio	61	56
	Femmina	48	44
Età	Minima	29	
	Massima	82	
	Media	65	
Superficie corporea	Media	1,6	
Tipo di tumore	Colon	68	62.4
	Retto	17	15.6
	Sigma	12	11
	Gastrico	13	12
	Cieco	1	0.92
Stadio tumore	IV	36	33
	<IV	73	67
Regime chemioterapico prescritto	FOLFOX	35	32
	FOLFOX+ Beva	12	11
	FOLFOX+Cetu	14	13
	FOLFIRINOX	1	1
	FOLFIRINOX+Beva	1	1
	XELOX	36	33
	XELOX+Beva	8	7
	XELOX+Cetu	1	1
	5-FU	1	1
Comorbidità	Media	1.4	
	Ipertensione	34	31
	Diabete	20	18
	Insufficienza cardiaca	4	4
	Dislipidemia	12	11
	Fibrillazione atriale	4	4
F.	Media	2	

concomitanti	Inibitori di pompa	24	22
	Beta Bloccanti	19	17
	ACE inibitori	10	9
	ASA	15	14
	Sartani	4	4
	Calcio Antagonisti	6	5
	Ipoglicemizzanti	14	13
	Statine	15	14

Abbreviazioni: FOLFOX (5-Fluorouracile+oxaliplatino); FOLFIRINOX (5-Fluorouracile+oxaliplatino+irinotecano); XELOX (capecitabina+ oxaliplatino); 5-FU (fluorouracile); Beva (Bevacizumab); Cetu (Cetuximab); ASA (acido acetilsalicilico)

Come riportato in tabella, l'età media della popolazione è di 65 anni; il paziente più giovane reclutato ha 29 anni, il più anziano 82.

Ogni paziente in media riporta 1.2 comorbidità di cui le più frequenti sono ipertensione (31%), diabete (18%) e dislipidemia (11%).

Ogni paziente assume in media 2 farmaci concomitanti non oncologici. La categoria di farmaci maggiormente utilizzata è quella degli inibitori di pompa protonica (22%) seguita dai beta-bloccanti (17%), dall'acido acetilsalicilico (14%), ipoglicemizzanti (13%) e statine (14%).

Diciannove pazienti fanno uso anche di supplementi dietetici. Nello specifico, si tratta di integratori a base di ferro e vitaminici (vitamina D e vitamine del gruppo B principalmente).

5.2 Risultati delle analisi farmacogenetiche

Si eseguono analisi farmacogenetiche mirate alla valutazione della risposta terapeutica alle Fluoropirimidine e agli altri farmaci inclusi nei protocolli chemioterapici. La genotipizzazione restituisce i seguenti risultati.:

-105 pazienti (96,3%) sono wild-type (wt) per ciascuno dei cinque polimorfismi DPYD *2A, DPYD *13, DPYD c.2846 A>T, DPYD c.1129-5923C>G, DPYD*6;

-3 pazienti (2,7%) sono eterozigoti per DPYD *2A, DPYD c.1129-5923C>G e DPYD*6. In particolare, 1 paziente per DPYD*2A, 1 paziente con doppia eterozigosi per DPYD c.1129-5923C>G e DPYD*6; 1 paziente con DPYD*6;

-1 paziente (1%) è omozigote mutato per DPYD*6.

Su 40 pazienti viene eseguita anche l'analisi farmacogenetica di risposta all'irinotecano, in particolare della variante genica UGT1A1*28. Venticinque pazienti (62,5%) sono risultati eterozigoti per questa variante; dieci pazienti (25%) hanno genotipo wt e cinque pazienti (12,5%) hanno genotipo omozigote mutato. L'analisi del polimorfismo GSTP1 A313G è valutata su 101 pazienti. 55 (54,4%) avevano genotipo eterozigote mutato, 34 (33,7%) avevano genotipo wt e 12 (12%) avevano genotipo omozigote mutato. L'analisi di ulteriori polimorfismi associati alla risposta ai farmaci derivati del platino (*XRCC1* G28152A, *ERCC1* C8092A, *ERCC1* T19007C) viene effettuata su 70 pazienti.

Per il polimorfismo *XRCC1* G28152A, 21 pazienti (30%) presentano il genotipo eterozigote mutato, mentre 9 (13%) il genotipo omozigote mutato. Per il polimorfismo *ERCC1* C8092A, 25 pazienti (35,7%) risultavano eterozigoti mutati e 2 (2,95%) omozigoti mutati. Per il polimorfismo *ERCC1* T19007C, 37 pazienti (53%) mostravano il genotipo eterozigote mutato e 3 (4%) il genotipo omozigote mutato.

Per quanto riguarda l'analisi dei polimorfismi *MTHFR* C677T e *MTHFR* A1298G, tra i 77 pazienti esaminati, 38 (49%) presentano il genotipo eterozigote, 21 (27,2%) il genotipo wt e 18 (23,4%) il genotipo omozigote mutato per il polimorfismo *MTHFR* C677T. Per quanto riguarda il polimorfismo *MTHFR* A1298G, 41 (53,2%) pazienti risultano wt, 31 (40%) pazienti risultano eterozigoti e 5 (6,8%) omozigoti mutati.

Del gene TYMS vengono analizzati sia la variante con 2/3 ripetizioni di una sequenza di 28 basi-TSER che lo SNP C>G. Su un totale di 109 pazienti, 47 (43,1%) presentano il genotipo TSER 2R/3R, 32 (29,4%) il genotipo TSER 3R/3R e 30 (27,5%) il genotipo TSER 2R/2R.

L'analisi dello SNP C>G è tuttora in corso; al momento sono stati analizzati 22 pazienti, dei quali 11 (10,1%) risultano eterozigoti mutati e 6 (5,5%) omozigoti mutati.

5.3 Rapporto UH2/U

La media del rapporto UH2/U è di 5,58 ± 2,7 e il valore minimo è 1,27 e il massimo è 14,27.

5.4 Tossicità

Centoquattro pazienti presentano almeno una tossicità; tra questi, 22 presentano eventi di grado superiore a 2 secondo i criteri CTCAE. Le tossicità osservate, in linea con quanto riportato in letteratura, sono principalmente di tipo ematologico, gastrointestinale e neurologico/cutaneo.

Le tossicità sono state classificate in base alla severità (grado ≤2 vs grado >2) e al tempo di insorgenza, distinguendo tra quelle insorte durante i cicli C1–C4 e quelle dopo il ciclo C4 (Figure 16-23). Le tossicità ematologiche più frequenti sono la trombocitopenia (56%), anemia (53%), neutropenia (52%) e leucopenia (44%). Per quanto riguarda la trombocitopenia, la forma di grado ≤2 è la più comune (97,6%, Figura 16). Nei primi quattro cicli di trattamento, la trombocitopenia di grado ≤2 è più frequente rispetto a quella di grado >2 (57,1% vs 2,4%, Figura 17), tendenza che si è mantenuta anche dopo il quarto ciclo (78,6% vs 2,4%, Figura 18). L'anemia è di grado ≤2 (100%, Figura 16), insorta prevalentemente durante i primi quattro cicli (80% vs 62,5%, Figure 17–18). Per quanto riguarda la neutropenia, il 74,4% dei casi è di grado ≤2 (Figura 16). Durante i primi quattro cicli, la neutropenia di grado ≤2 è risultata più frequente rispetto a quella di grado >2 (46,2% vs 33%, Figura 17), con analoga distribuzione anche dopo il quarto ciclo (43,6% vs 18%, Figura 18). Infine, la leucopenia è di grado ≤2 nel 97% dei casi e solo nel

6% dei casi come grado >2 (Figura 16). In entrambe le fasi del trattamento (C1–C4 e post-C4) si è riscontrata una maggiore incidenza di leucopenia di grado ≤2 (66,7% e 51,5% vs 6,1% e 3%, Figure 17–18).

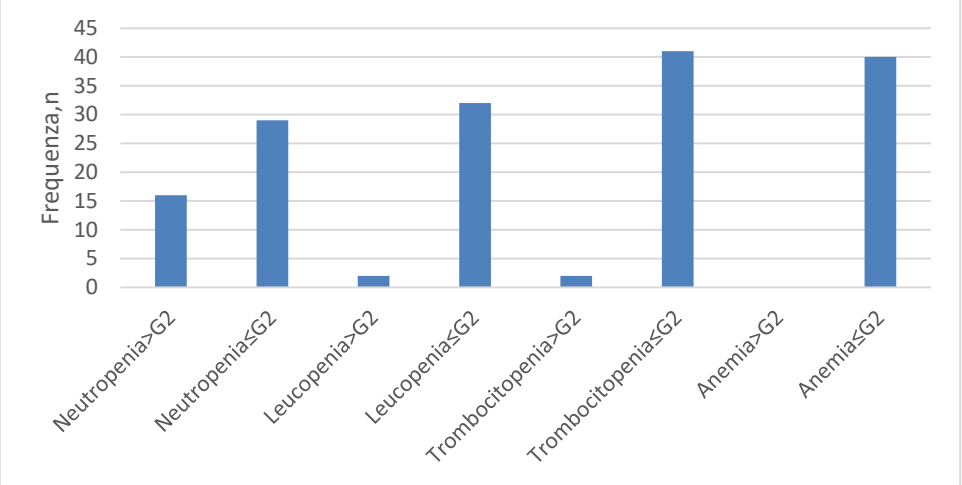


Figura 16: *Tossicità ematologiche suddivise per grado >2 vs grado ≤2*

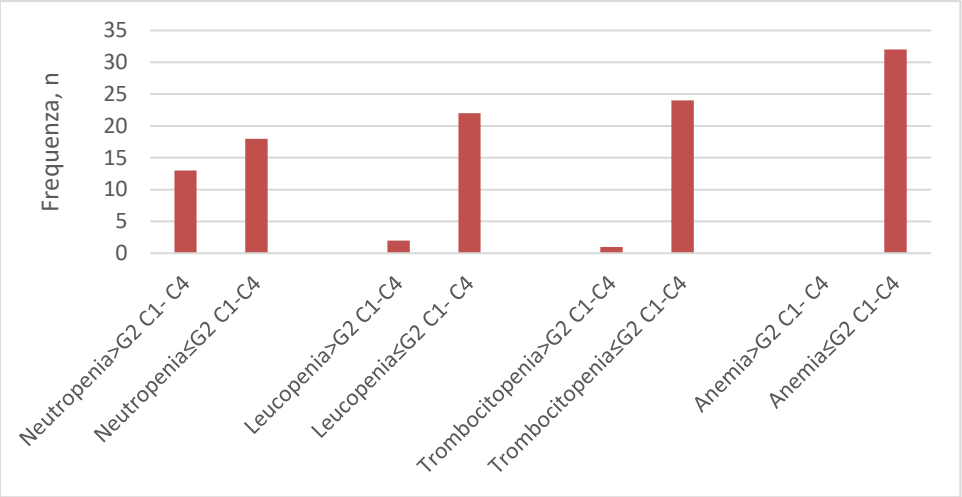


Figura 17: *Tossicità ematologiche suddivise per grado >2 vs grado ≤2 insorte durante C1–C4*

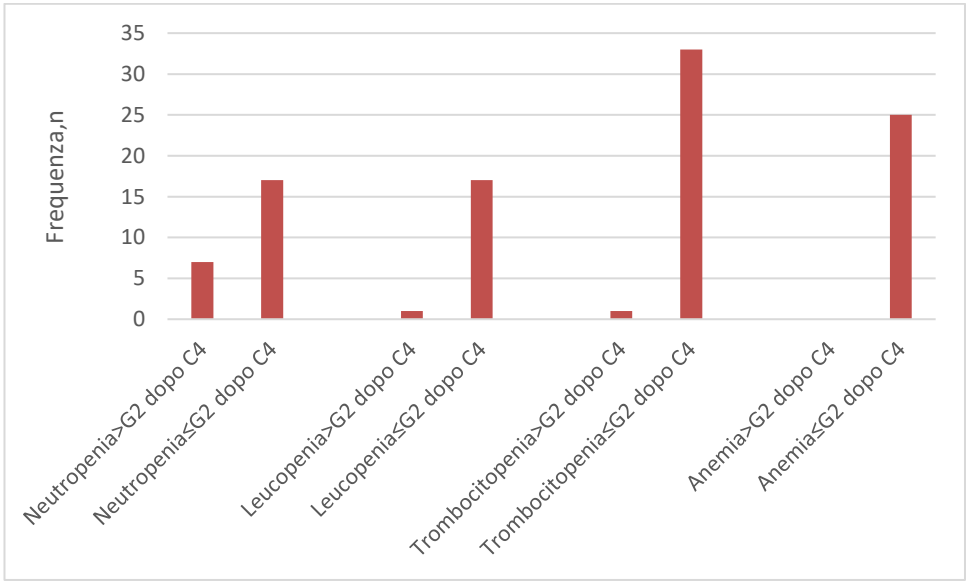


Figura 18: *Tossicità ematologiche suddivise per grado >2 vs grado ≤2 insorte dopo C4*

Tra le tossicità gastrointestinali, la diarrea (66%) è la più frequente seguita da nausea(48%), stipsi (42%) e vomito (29%). Quelle più frequenti, si manifestano con grado ≤2, sia durante i primi quattro cicli che dopo (Figure 19-21). Non vengono rilevati stipsi di grado >2 durante i quattro cicli (Figura 20) né vomito di grado >2 dopo i quattro cicli (Figura 21).

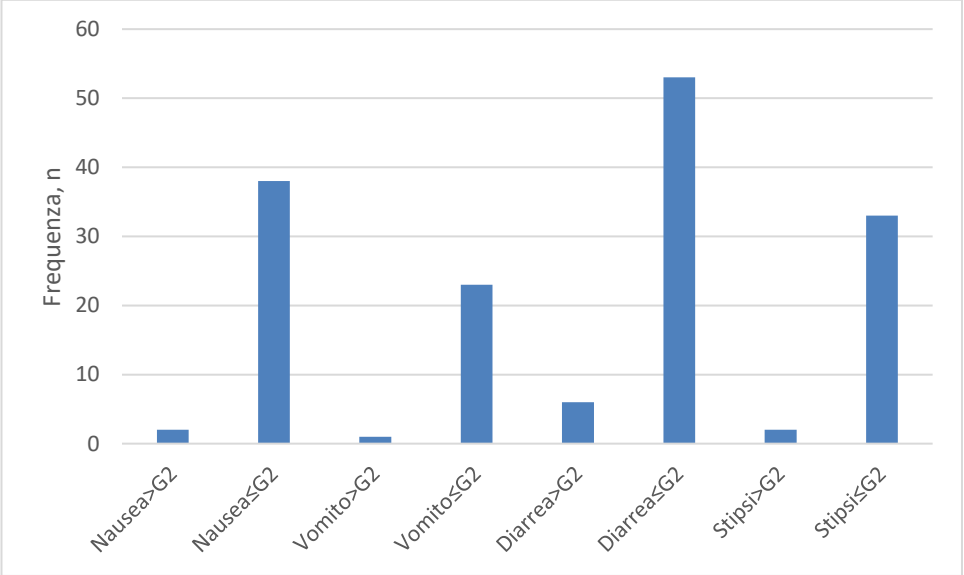


Figura 19: *Tossicità gastrointestinali suddivise per grado >2 vs grado ≤2*

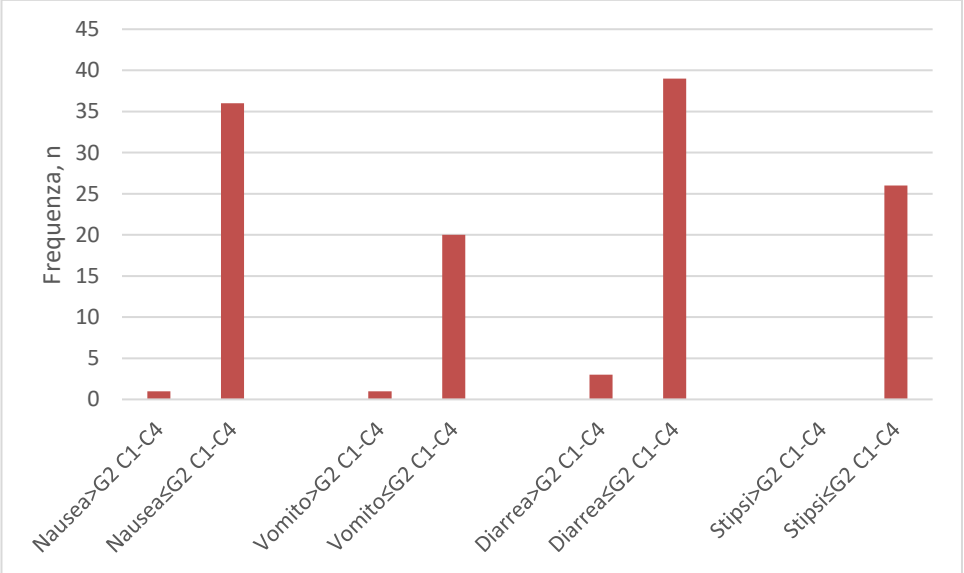


Figura 20: *Tossicità gastrointestinali suddivise per grado >2 vs grado ≤2*

insorte durante C1-C4

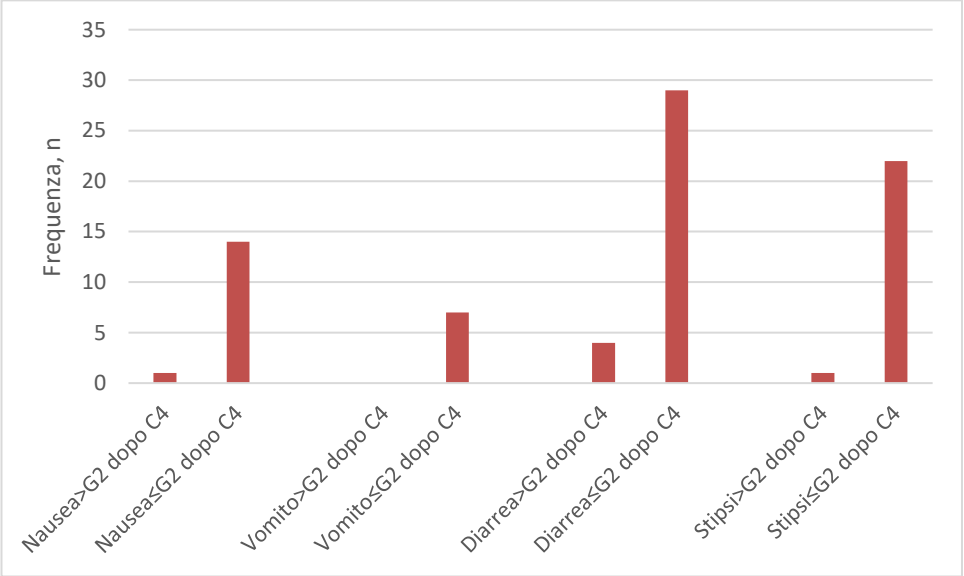


Figura 21: *Tossicità gastrointestinali suddivise per grado >2 vs grado ≤2 insorte dopo C4*

Tra le tossicità neurologiche e cutanee, la più frequente è la parestesia (50%), seguita da mucosite (29%), sindrome mano-piede (21%) e rash cutanei (16%). La parestesia di grado ≤2 è quella che si manifesta con maggiore frequenza rispetto a quella di grado >2 (100% vs 3%, Figura 22), sia durante i primi quattro cicli di trattamento (78% vs 1%, Figura 23) sia dopo il quarto ciclo (75% vs 3%, Figura 24). Non vi sono casi di sindrome mano-piede di grado >2 dopo i quattro cicli di trattamento (Figura 24).

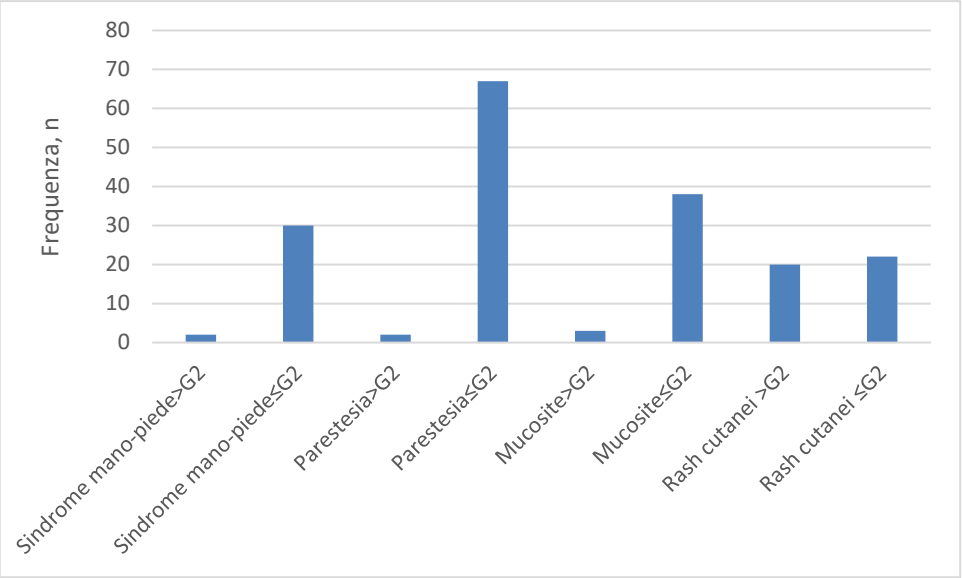


Figura 22: *Tossicità neurologiche/cutanee suddivise per grado >2 vs grado ≤2*

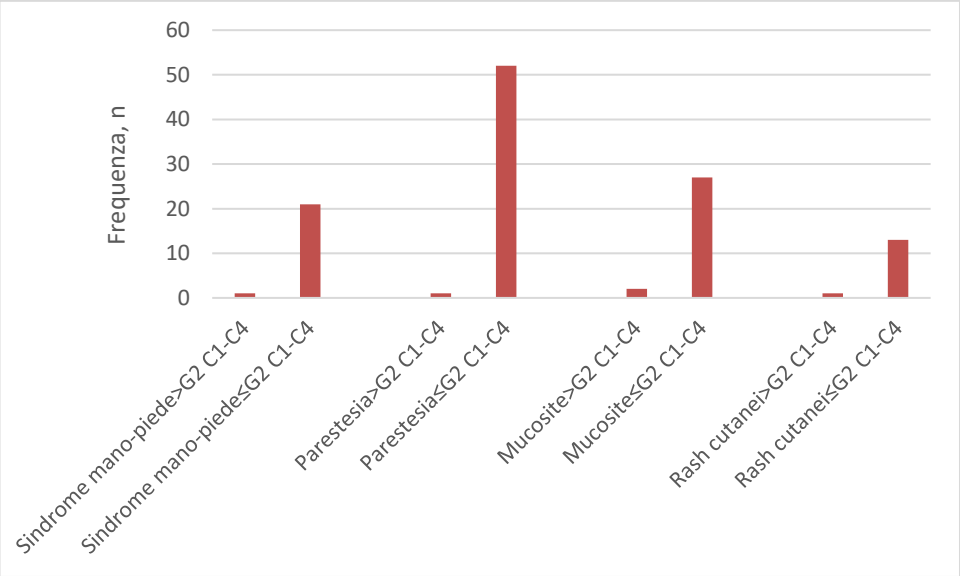


Figura 23: *Tossicità neurologiche/cutanee suddivise per grado >2 vs grado ≤2 insorte durante C1-C4*

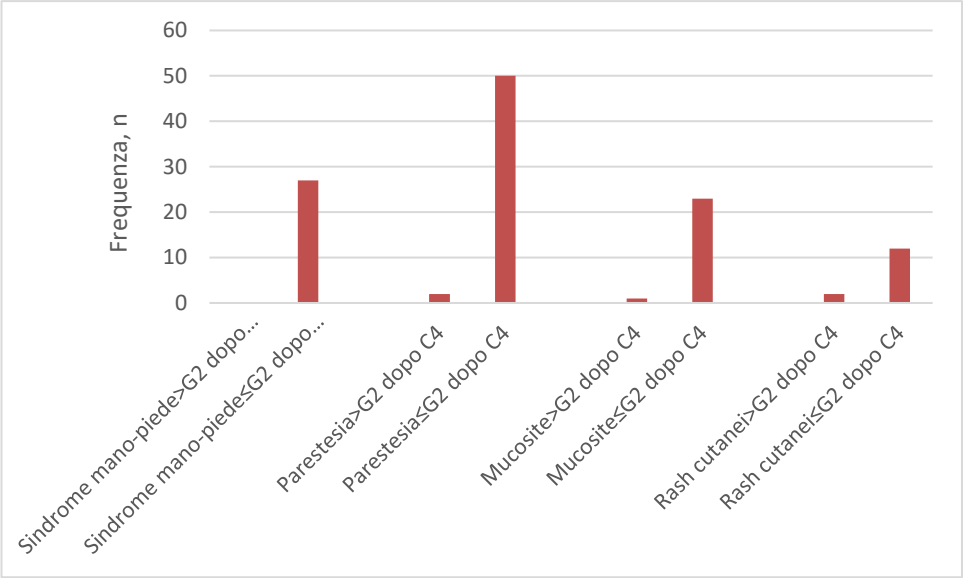


Figura 24: *Tossicità neurologiche/cutanee suddivise per grado >2 vs grado ≤2 insorte dopo C4*

Nei 4 pazienti mutati le tossicità riscontrate sono riportate nella Tabella 2.

Tabella 2: *Tossicità riscontrate nei pazienti portatori delle varianti del gene DPYD*

Paziente (n)	***Genotipo***	***Tossicità (Grado)***
1	*DPYD* *1/*2A	Trombocitopenia ≤G2 dopo C4; diarrea ≤G2 durante C1-C4 e dopo C4.
2	*DPYD*c.1129-5923C>G /*6	Neutropenia > G2 durante C1-C4; trombocitopenia ≤G2 durante C1-C4.
3	*DPYD* *1/*6	Nausea ≤G2 durante C1-C4.
4	*DPYD*6/*6	Leucopenia ≤G2

	durante C1-C4; trombocitopenia ≤G2 dopo C4; nausea ≤G2 durante C1-C4; diarrea nausea ≤G2 durante C1-C4; parestesia ≤G2 durante C1-C4 e dopo C4; mucosite >G2 durante C1-C4 e ≤G2 dopo C4.

In tutti i pazienti vengono effettuati aggiustamenti del dosaggio del farmaco in accordo con le linee guida, sulla base del genotipo DPYD. Per i pazienti 1 e 2 sono disponibili anche i valori del rapporto UH_2/U, pari rispettivamente a 5,15 e 9,85. Una maggiore incidenza di tossicità, sebbene di grado ≤2, si riscontra nel paziente 4, omozigote mutato per *DPYD**6. Inoltre, è rilevata una neutropenia di grado >2 nei primi quattro cicli di trattamento nel paziente 2, avente genotipo eterozigote composto.

5.5 Analisi Interazioni Farmaco-Farmaco

In tutti i pazienti è identificata almeno una interazione farmaco-farmaco potenzialmente associata a outcome clinici avversi.

Tre potenziali interazioni di tipo farmacodinamico coinvolgenti capecitabina e/o 5-FU con acido folico, acido folinico e ferro sono identificate con un grado di severità maggiore. Il meccanismo consiste in un potenziamento degli effetti antitumorali della fluoropirimidina.

In un paziente è identificata una potenziale interazione farmacodinamica con grado di severità maggiore per aumento del rischio di sviluppo di sindrome serotoninergica conseguente all'assunzione di farmaci antagonisti del recettore serotoninergico 5-HT3 come ondansetron e farmaci antidepressivi come vortioxetina.

Una interazione tra telmisartan e litio è segnalata con un grado di severità maggiore per un aumento delle concentrazioni sieriche del litio.

L'interazione farmacodinamica tra 5-FU e oxaliplatino, valutata nella maggiorparte della nostra popolazione, viene identificata con un grado di severità moderata per potenziamento dell'effetto antiproliferativo e antitumorale.

E' valutata anche una potenziale interazione con grado di severità moderato tra 5-FU e idroclorotiazide a causa di un aumento della soppressione midollare di cui il meccanismo non è ancora noto.

L’interazione tra ondansetron e oxaliplatino può dare allungamento del tratto QT e ha un grado di severità moderata.

Due interazioni, di cui una tra l’acido acetilsalicilico e insulina e farmaci ipoglicemizzanti e un’altra con zofenopril e farmaci ipoglicemizzanti sono identificate con grado di severità moderata per una marcata ipoglicemia.

L’interazione tra ramipril e acido acetilsalicilico è identificata con grado di severità moderata per un marcato effetto ipotensivo.

5.6 Caso clinico di rilevante interesse

Una paziente donna, caucasica, di 73 anni con adenocarcinoma di III stadio del colon destro è stata sottoposta a emicolectomia destra con linfoadenectomia in un ospedale universitario di Roma. L'anamnesi della paziente comprendeva fibrillazione atriale e rigurgito aortico di grado II. I farmaci assunti comprendono esomeprazolo 20 mg/die, verapamil 40 mg/die, flecainide 100 mg/die, apixaban 2,5 mg/die, ezetimibe 10 mg/die, indapamide 2,5 mg/die e lovastatina 10 mg/die. La paziente è stata ricoverata presso l'Unità di Oncologia dell'Ospedale Universitario di Salerno per iniziare la terapia adiuvante. In base alle caratteristiche clinicopatologiche e allo stadio del tumore, la paziente è stata sottoposta a un regime chemioterapico adiuvante CAPOX che consisteva in un'infusione endovenosa di 2 ore di oxaliplatino (130 mg/m2) il primo giorno e di capecitabina orale (1000 mg/m2, due volte al giorno) dal giorno 1 al 14, ogni tre settimane. Considerando la sua superficie corporea (BSA), la paziente ha assunto 3000 mg di capecitabina al giorno e 195 mg di oxaliplatino.

Dopo due cicli di chemioterapia, la paziente ha riportato diarrea di grado 3 e HFS di grado 3 secondo i CTCAE versione 5.0. Pertanto, la dose di capecitabina è stata ridotta da 1000 mg/m2 due volte al giorno a 625 mg/m2 due volte al giorno e l'oxaliplatino da 130 mg/m2 a 100 mg/m2. Inoltre, è stata interrotta la somministrazione di lovastatina ed ezetimibe. In seguito a queste modifiche, le condizioni cliniche del paziente sono migliorate e sono state segnalate solo ADR di grado 1 (nausea, diarrea, parestesia e congiuntivite). Dopo il settimo ciclo di chemioterapia, secondo il RECIST v. 1, una tomografia computerizzata (TC) ha dimostrato l'assenza di lesioni tumorali, ulteriormente confermata da una TC eseguita nel settembre 2020 e nel marzo 2021 durante il follow-up. Effettuando

una ricognizione retrospettiva di tutti i farmaci e gli integratori, i farmacologi clinici hanno rivelato che gli oncologi non erano a conoscenza del fatto che la paziente stesse assumendo ferro e integratori multivitaminici prima di iniziare la chemioterapia a base di capecitabina. I folati erano contenuti in questi integratori sia come acido folico 400 mcg insieme a ferro 21 mg, vitamina C 75 mg, acerola 300 mg, sia come acido folico 100 mcg insieme alle vitamine B1 1,4 mg, vitamina B2 1,6 mg, vitamina B3 18 mg, vitamina B6 3 mg, vitamina B12 1,5 mcg e vitamina B5 9 mg. Dal momento che il paziente ha interrotto il trattamento con agenti lipidici, i farmacologi clinici hanno deciso di monitorare i livelli di colesterolo LDL e totale. In effetti, i livelli di LDL erano aumentati a 107 mg/dL, superando il valore di cut-off di 55 mg/dL, raccomandato per i pazienti ad altissimo rischio di malattie cardiovascolari, come questo paziente. La paziente non era portatrice degli SNP DPYD raccomandati, ma presentava altri polimorfismi suggeriti come associati alla tossicità legata al FP. In particolare, era omozigote per entrambi i geni TSER 2R/2R e MTHFR c.1298CC. Il rapporto UH2/U è di 7,66. Per identificare le potenziali interazioni clinicamente rilevanti sono stati utilizzati cinque DDI-checkers (*Drugs.com, Drugbank, Medscape, Micromedex, WebMD e Lexicomp*). I tools utilizzati hanno potuto identificare un aumento del rischio di tossicità in seguito alla somministrazione concomitante di capecitabina e integratori di folato.

Inoltre, il riassunto delle caratteristiche del prodotto della capecitabina afferma che la tossicità può aumentare quando questa viene co-somministrata con acido folinico/LV. In particolare, la MTD utilizzata in combinazione con acido folinico/LV è di 2000 mg/m2 al giorno. Il rischio di un aumento della tossicità correlata alla capecitabina può verificarsi anche con gli integratori di folati, a causa della somiglianza tra acido folinico/LV e acido folico.

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati si riferiscono a una popolazione composta da 109 soggetti di cui 48 donne (44%) e 61 uomini (56%) con un'età media di 66 anni. La diagnosi principale è quella di tumore al colon. La maggiorparte segue un regime chemioterapico a base di capecitabina e oxaliplatino (XELOX). Di questi 109 pazienti, solo cinque pazienti sono portatori dei polimorfismi DPYD*2A, DPYD c.1129-5923C>G e DPYD c.2194G>A per i quali l'oncologo ha provveduto con l'aggiustamento del dosaggio di FP sin dal primo ciclo. Per quanto riguarda il gene TYMS, su un totale di 109 pazienti, 47 (43,1%) presentano il genotipo TSER 2R/3R e l'analisi dello SNP C>G su 22 pazienti ha messo in evidenza che 11 (10,1%) risultano eterozigoti mutati. L'aplotipo risultante preponderante, 2RG/3RC è associato a una bassa espressione del gene TYMS e predittore di sensibilità al trattamento. Secondo la metanalisi di Rosmarin et al. il polimorfismo TSER e la delezione di 6 paia di basi nella regione 3'-UTR del gene TYMS insieme a *DPYD**2A, *DPYD* c.2846A>T possono essere considerati predittori di tossicità in pazienti con diagnosi di tumore al colon-retto e sottoposti a un regime chemioterapico a base di capecitabina. Non è stata tuttavia dimostrata una associazione con la tossicità del 5-FU in monoterapia o dei regimi chemioterapici a base di 5-FU.

Nel presente studio l'analisi della terza variante del gene TYMS non è stata effettuata ma è previsto di eseguirla in futuro.

In seguito al monitoraggio clinico, sono osservate diverse tossicità sia nei pazienti con genotipo wt sia in quelli mutati.

Tra le tossicità a carico del sistema emolinfopoietico, la più frequente è la trombocitopenia, seguita da anemia, neutropenia e leucopenia, tutte prevalentemente di grado ≤2. Non è stato riportato alcun caso di anemia di grado superiore a 2.

Per quanto riguarda le tossicità gastrointestinali, le manifestazioni più comuni includono diarrea, nausea, stipsi e vomito, anch'esse per lo più di grado ≤2, sia durante i primi quattro cicli di trattamento sia nei successivi. Non sono registrati episodi di stipsi o vomito di grado >2.

Tra le tossicità neurologiche e cutanee, la più frequente è la parestesia, seguita da mucosite, sindrome mano-piede e rash cutanei, tutte di grado ≤2.

Nei pazienti mutati sono osservate tossicità di grado >2: uno con genotipo DPYD*c.1129-5923C>G /*6, che ha sviluppato neutropenia, e uno con genotipo DPYD*6/*6, che ha manifestato mucosite. Quest'ultimo, inoltre, ha presentato un numero complessivamente maggiore di tossicità rispetto agli altri pazienti mutati. Sebbene le linee guida AIOM-SIF raccomandino lo screening della variante *6 soltanto in presenza di tossicità, nel nostro laboratorio tale analisi viene eseguita preventivamente, prima dell'inizio della chemioterapia.

La presenza di tali varianti geniche è coerente con una ridotta attività dell'enzima DPD nel primo caso (stimata tra il 30% e il 70%) e assente nel secondo. Il rapporto UH2/U identificato nei pazienti 1 e 2 mutati è variabile, non rispettando cut-off quali 4 o 6. Tuttavia, il valore medio generale riscontrato nella popolazione è di 5,58.

Sono pazienti che hanno almeno una comorbidità di cui le principali sono ipertensione, diabete e dislipidemia. Ogni paziente ha in media due farmaci concomitanti e alcuni usano supplementi dietetici a base di vitamine (Vitamine gruppo B principalmente) e/o minerali.

Dall'analisi dei DDI-checkers, tre potenziali interazioni di tipo farmacodinamico coinvolgenti capecitabina e/o 5-FU con acido folico, acido folinico, ferro sono identificate con un grado di severità maggiore.

In merito a ciò, il caso clinico osservato è emblematico. Per favorire la risoluzione delle tossicità alla paziente, è stato ridotto il dosaggio dei farmaci oncologici e sono stati sospesi i farmaci ipolipidemizzanti, senza tuttavia considerare la sospensione del solo supplemento a base di acido folico.

Questo apre la strada a due importanti riflessioni.

È opinione comune considerare 'innocuo' tutto ciò che è naturale o quantomeno ciò che non sia prescritto dal medico. Ciò giustifica un uso incontrollato di supplementi dietetici in concomitanza alle terapie farmacologiche prescritte.

Oltre a vitamine e minerali sono spesso impiegati come costituenti di supplementi dietetici piante medicinali (botanicals) e loro derivati.

La gran parte delle conoscenze sugli effetti salutistici delle piante si basa soprattutto sull'esperienza maturata attraverso il loro uso tradizionale, tuttavia l'introduzione in commercio di preparati diversi da quelli tradizionali, come ad esempio gli estratti secchi ad alto titolo o integratori che contengono diversi componenti, pone il problema specifico della sicurezza d'impiego di tali preparati. Non solo, solitamente i supplementi dietetici possono essere acquistati senza alcun

obbligo di ricetta anche su internet, derivanti da filiere di produzione e/o distribuzione non controllate. Alla luce di ciò, azioni di farmaco- e fito-vigilanza devono essere favorite e implementate maggiormente nella pratica clinica al fine di evitare ADR gravi (https://www.iss.it/rapporti-covid-19/-/asset_publisher/btw1J82wtYzH/content/id/5423875).

Sicuramente, è necessario partire da una ricognizione di tutti i farmaci e parafarmaci assunti dal paziente.

Nelle CRF elettroniche dello studio, una particolare attenzione viene posta alla registrazione di tutti i farmaci e parafarmaci.

Non sempre il medico e il paziente sono inclini nel partecipare attivamente a tale processo. Difatti, solo dopo una attenta ricognizione di tutti i farmaci e parafarmaci assunti dal paziente, il medico può arrivare alla migliore scelta prescrittiva, effettuando così un'azione di riconciliazione farmacologica.

La riconciliazione farmacologica è considerata dall'OMS come una delle migliori strategie per garantire una migliore qualità delle cure (https://www.who.int/publications/m/item/high5s-standard-operating-protocol-medication-reconciliation). Anche il Ministero della Salute con la raccomandazione n.17, favorisce interventi di riconciliazione farmacologica, definendo quest'ultima come "processo formale che permette, in modo chiaro e completo, di rilevare e conoscere la terapia farmacologica seguita assieme ad altre informazioni relative al paziente e consente al medico prescrittore di valutare con attenzione se proseguirla, variarla o interromperla in toto o in parte" (https://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2354_allegato.pdf)

In tale contesto, il ruolo della farmacologia clinica è fondamentale.

Il disegno e lo svolgimento di studi di farmacologia clinica, che prevedano un attento monitoraggio clinico dei pazienti, unitamente allo studio e alla valutazione dei fattori influenzanti la risposta alle terapie, permettono di raccogliere evidenze tali da indirizzare il clinico verso una medicina personalizzata e dunque appropriata, sicura e sostenibile.

BIBLIOGRAFIA

- Ardizzone A, Bulzomì M, De Luca F et al. (2024) Curr Issues Mol Biol. Dihydropyrimidine Dehydrogenase Polymorphism c.2194G>A Screening Is a Useful Tool for Decreasing Gastrointestinal and Hematological Adverse Drug Reaction Risk in Fluoropyrimidine-Treated Patients. 46:9831-9843.
- Boige V, Vincent M, Alexandre P et al. (2016) JAMA Oncol. DPYD genotyping to predict adverse events following treatment with flourouracil-based adjuvant chemotherapy in patients with stage III colon cancer: a secondary analysis of the PETACC-8 randomized clinical trial. 2:655–62. 38.
- Boisdron-Celle M., Remaud G., Traore S. et al. (2007) Cancer Lett. 5-Fluorouracil-Related Severe Toxicity: A Comparison of Different Methods for the Pretherapeutic Detection of Dihydropyrimidine Dehydrogenase Deficiency. 249:271–282.
- Bujak R, Struck-Lewicka W, Markuszewski MJ et al. (2015) J Pharm Biomed Anal. Metabolomics for laboratory diagnostics. 10;113:108-20.
- Campanella B., Lomonaco T, Benedetti E. et al. (2022) Int J Environ Res Public Health. Fast, Direct Dihydrouracil Quantitation in Human Saliva: Method Development, Validation, and Application. 19(10):6033.
- Chua W., KhoPS., Moore MM. et al. (2011) Critical Reviews in Oncology/Hematology. Clinical, laboratory and molecular factors predicting chemotherapy efficacy and toxicity in colorectal cancer. 224–250.

– Conti V, De Bellis E, Manzo V et al. (2020) J Pers Med. A Genotyping/Phenotyping Approach with Careful Clinical Monitoring to Manage the Fluoropyrimidines-Based Therapy: Clinical Cases and Systematic Review of the Literature. 10(3):113.

– Del Re M., Cinieri S., Michelucci A. et al. (2019) The pharmacogenomics journal. DPYD*6 plays an important role in fluoropyrimidine toxicity in addition to DPYD*2A and c.2846A>T: a comprehensive analysis in 1254 patients. 19(6), 556–563.

– Diasio RB., Beavers TL.,Carpenter JT., (1988), J Clin Invest, Familial deficiency of dihydropyrimidine dehydrogenase. Biochemical basis for familial pyrimidinemia and severe 5fluorouracil- induced toxicity., 81(1): 47–51.

– Falcone A, Ricci S, Brunetti I et al. (2007) . J Clin Oncol. Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest. 25:1670–1676

– Gamelin E., Boisdron-Celle M., Guérin-Meyer, V. et al. (1999) J. Clin. Oncol. Correlation between Uracil and Dihydrouracil Plasma Ratio, Fluorouracil (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. 17, 1105–1110.

– Grem J.L., LK Yee, DJ Venzon et al., (1997) Cancer Chemotherapy Pharmacology Inter- and intraindividual variation in dihydropyrimidine dehydrogenase activity in peripheral blood mononuclear cells,40: 117-25

– Heidelberger C., (1975), Fluorinated pyrimidines and their

nucleosides. ,in Antineoplastic and immunosuppressive agents, parte II, pp. 193-231, Sartorelli e Johns (editori), Springer-Verlag, NewYork

- Heidelberger C., Chaudhuri NK., Danneberg P., Mooren D., Griesbach L., Duschinsky R., Schnitzer RJ., Pleven E., Scheiner J., (1957), Nature, Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds 179:663-6

- Henricks L. M., C.ATC Lunenburg, D. Meulendijks et al. (2015) Pharmacogenomics. Translating DPYD genotype into DPD phenotype: using the DPYD gene activity score. 16(11): 1275–1284

- Lima A., Seabra V., Martins S., et al. (2014). Mol Biol Rep. Thymidylate synthase polymorphisms are associated to therapeutic outcome of advanced non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. 41(5):3349–3357.

- Macdonald JS., (1999), Oncology (Williston Park), Toxicity of 5-fluorouracil. 13(7 Suppl3):33-4.

- Moll S, Varga EA. (2015), Circulation, Homocysteine and MTHFR Mutations. 132(1):e6-9.

- Kristensen, M.H.; Pedersen, P.; Mejer, J. (2010) J. Int. Med. The Value of Dihydrouracil/Uracil Plasma Ratios in Predicting 5-Fluorouracilrelated Toxicity in Colorectal Cancer Patients. Res. 2010, 38, 1313–1323.

- Romiti A., Roberto, M., D'Antonio, C. et al. (2016) Anticancer Drugs. The TYMS-TSER polymorphism is associated with toxicity of low-dose capecitabine in patients with advanced gastrointestinal cancer. 27, 1044–1049

- Rosmarin D., Palles C., Church D. et al. (2014) J. Clin. Oncol.

Genetic Markers of Toxicity from Capecitabine and Other Fluorouracil-Based Regimens: Investigation in the QUASAR2 Study, Systematic Review, and Meta-Analysis. 32, 1031–1039

- Rossi, F., Cuomo, V., Riccardi, C., (2016), Farmacologia. Principi di base e applicazioni terapeutiche, Minerva Medica, Italia
- Rutman RJ., Cantarow A., Paschkis KE., (1954), Cancer Research, Studies in 2-Acetylaminofluorene Carcinogenesis III. The Utilization of Uracil-2-C14 by Preneoplastic Rat Liver and Rat Hepatoma,14(2):119-23
- Ruzzo A, Graziano F, Galli F et al. (2017) Br J Cancer. Dihydropyrimidine dehydrogenase pharmacogenetics for predicting fluoropyrimidine-related toxicity in the randomised, phase III adjuvant TOSCA trial in high-risk colon cancer patients.117:1269–77.
- Schaerer, D., Froehlich, T.K., Hamzic, S. et al. (2020) J. Pers. Med. A Novel Nomenclature for Repeat Motifs in the Thymidylate Synthase Enhancer Region and Its Relevance for Pharmacogenetic Studies, 10, 181
- Schwab M., Zanger U.M., Marx C.et al. (2008) J Clin Oncol. Role of genetic and nongenetic factors for fluorouracil treatment related severe toxicity: a prospective clinical trial by the German 5-FU Toxicity Study Group. 26:2131–8. 36.
- Sultana J, Cutroneo P, Trifirò G. (2013) J Pharmacol Pharmacother. Clinical and economic burden of adverse drug reactions. 4(Suppl 1):S73-7.
- Thomas F., Hennebelle I., Delmas C. et al. (2016) Clin. Pharmacol. Ther. Genotyping of a Family with a Novel Deleterious DPYD Mutation Supports the Pretherapeutic Screening of DPD Deficiency with Dihydrouracil/Uracil Ratio. 99, 235–241

– Toffoli G, Giodini L, Buonadonna A. et al. (2015) Int J Cancer. Clinical validity of a DPYD-based pharmacogenetic test to predict severe toxicity to fluoropyrimidines. 137:2971–80

– Van Staveren M.C., Jan Guchelaar H., Van Kuilenburg A.B.P., et al. (2013) Pharm. J. Evaluation of Predictive Tests for Screening for Dihydropyrimidine Dehydrogenase Deficiency. 13:389–395.

– Van Kuilenburg AB., Vreken P., Beex LV. et al.(1997) Eur J Cancer. Heterozygosity for a point mutation in an invariant splice donor site of dihydropyrimidine dehydrogenase and severe 5-fluorouracil related toxicity.33(13):2258-64

– Zaric BL, Obradovic M, Bajic V et al. (2019). Curr Med Chem. Homocysteine and Hyperhomocysteinaemia. 26(16):2948-2961.

SITOGRAFIA

- 5-Fluorouracile, Riassunto Caratteristiche Prodotto: https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer_003029_040593_RCP.pdf&sys=m0b1l3
- Capecitabina, Riassunto Caratteristiche Prodotto:https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/xeloda-epar-product-information_it.pdf
- CONFERENZA STATO-REGIONI DEL 13.03.2013: Intesa tra il Governo, le Regioni e le Province autonome di Trento e di Bolzano sul documento recante: "Linee di indirizzo su la genomica in sanità pubblica". 4.10/2013/32 (Servizio III) Intesa ai sensi dell'articolo 8, comma 6, della legge 5 giugno 2003, n. 131
- Farmacovigilanza, AIFA: https://www.aifa.gov.it/en/farmacovigilanza1
- Farmacovigilanza, OMS: https://www.who.int/teams/regulation-prequalification/regulation-and-safety/pharmacovigilance
- Indicazioni alla terapia con 5-Fluorouracile per il cancro gastrico:https://it-m.iliveok.com/health/chemioterapia-il-cancro-gastrico_105579i15957.html
- Linee guida AIOM 2021 per tumori del colon: https://www.aiom.it/linee-guida-aiom-2021-tumori-del-colon/
- Medication without Harm, OMS: https://www.who.int/initiatives/medication-without-harm

– Raccomandazione per la riconciliazione della terapia farmacologica, Ministero della Salute: https://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2354_allegato.pdf

– Raccomandazione EMA Luglio 2020 sul test farmacogenetico DPYD:https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/fluorouracil-fluorouracil-related-substances-article-31-referral-ema-recommendations-dpd-testing_it.pdf

– Raccomandazioni per analisi farmacogenetica fluoropirimidine CPIC: https://cpicpgx.org/guidelines/guideline-for-fluoropyrimidines-and-dpyd/

– Raccomandazioni per analisi farmacogenetica fluoropirimidine DPWG: https://www.nature.com/articles/s41431-019-0540-0

– Raccomandazioni per analisi farmacogenetiche AIOM-SIF anno 2019: https://www.aiom.it/raccomandazioni-2019-per-analisi-farmacogenetiche/

– Rapporto Supplementi dietetici Istituto Superiore di Sanità: https://www.iss.it/rapporti-covid-19/-/asset_publisher/btw1J82wtYzH/content/id/5423875

– Riconciliazione Farmacologica, OMS: https://www.who.int/publications/m/item/high5s-standard-operating-protocol-medication-reconciliation

– Riconciliazione Farmacologica, raccomandazione Ministero della Salute:https://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2354_allegato.pdf