



Università degli Studi di Pisa
Facoltà di Medicina e Chirurgia
Scuola di Specializzazione in Oncologia

Tesi di Specializzazione

**Correlazione tra i polimorfismi e l'attività della citidina deaminasi con
l'*outcome* clinico in pazienti affetti da tumore del polmone non a piccole
cellule in stadio avanzato trattati con platino/gemcitabina**

Relatore: Chiar.mo Prof. Alfredo Falcone

Candidata:

Dr. ssa Armida D'Incecco

Anno Accademico 2009/2010

A Papà, Mamma e Bruna

A Marco

*Senza la Vostra presenza rassicurante
ogni progetto sarebbe più difficile da realizzare*

A Roberto

A Daniela

A Graziella

A...

Indice

1. Riassunto	3
2. Introduzione	4
2.1 Epidemiologia e dimensione del problema	4
2.2 Trattamento dei carcinomi polmonari non a piccole cellule in stadio iniziale di malattia	7
2.3 Trattamento dei carcinomi polmonari non a piccole cellule in stadio avanzato di malattia	9
2.3.1 Trattamento chemioterapico	9
2.3.2 Ruolo dell'istologia	15
2.3.3 Farmaci a bersaglio molecolare: i farmaci anti-angiogenici	19
2.3.4 Farmaci a bersaglio molecolare: i farmaci anti-EGFR	21
2.4 Farmacogenetica	28
2.4.1 Polimorfismi del singolo nucleotide (SNPs)	30
2.4.2 Meccanismo d'azione e farmacogenetica della gemcitabina	33
3. Pazienti e metodi	44
3.1 Obiettivi dello studio	44
3.2 Selezione dei pazienti	44

3.3	Trattamento	46
3.4	Valutazioni in corso di studio	47
3.5	Metodologia di laboratorio	49
3.5.1	Estrazione del DNA	49
3.5.2	Valutazione dei polimorfismi	51
3.5.3	Disegno dei <i>primers</i>	54
3.5.4	Analisi dell'attività enzimatica della citidina deaminasi	55
3.6	Considerazioni statistiche	57
4.	Risultati	60
4.1	Caratteristiche cliniche dei pazienti	60
4.2	Caratteristiche genotipiche dei pazienti	64
4.3	Correlazione tra polimorfismi e <i>outcome</i> clinico	66
4.4	Correlazione tra genotipi della citidina deaminasi e attività enzimatica	70
4.5	Correlazione tra attività enzimatica della citidina deaminasi e <i>outcome</i> clinico	71
4.6	Analisi multivariata	74
4.7	Tossicità	76
5.	Discussione	79
6.	Bibliografia	84
7.	Appendici	99

1. Riassunto

Il tumore del polmone rappresenta la principale causa di morte per neoplasia nel Mondo e l'individuazione di parametri predittivi per la scelta del trattamento ha assunto un ruolo rilevante nella pratica clinica.

Sulla base di queste considerazioni, è stato condotto uno studio con l'obiettivo di valutare l'influenza dei polimorfismi 79A>C e 435C>T e l'attività enzimatica della citidina deaminasi (CDA) sull'*outcome* clinico di 126 pazienti affetti da tumore del polmone non a piccole cellule avanzato trattati con regimi a base di platino e gemcitabina.

Lo studio ha mostrato un prolungamento significativo del tempo alla progressione (6.0 mesi versus 3.0 mesi; P=0.001) e della sopravvivenza (11.0 mesi versus 5.0 mesi; P=0.001) nei pazienti con genotipo CDA A79A/A79C rispetto ai pazienti con genotipo C79C, e un prolungamento della sopravvivenza (10.0 mesi versus 5.0 mesi; P=0.025) ma non del tempo alla progressione (6.0 mesi versus 2.0 mesi; P=0.164) nei pazienti con genotipo CDA C435C/C435T rispetto ai pazienti con genotipo T435T.

Nei pazienti con bassa attività del CDA si è evidenziato un vantaggio in termini di risposte, sopravvivenza libera da progressione e sopravvivenza globale.

L'analisi dell'attività enzimatica del CDA, pertanto, sembra essere un promettente *biomarker* di attività ed efficacia del trattamento chemioterapico basato su platino e gemcitabina.

2. Introduzione

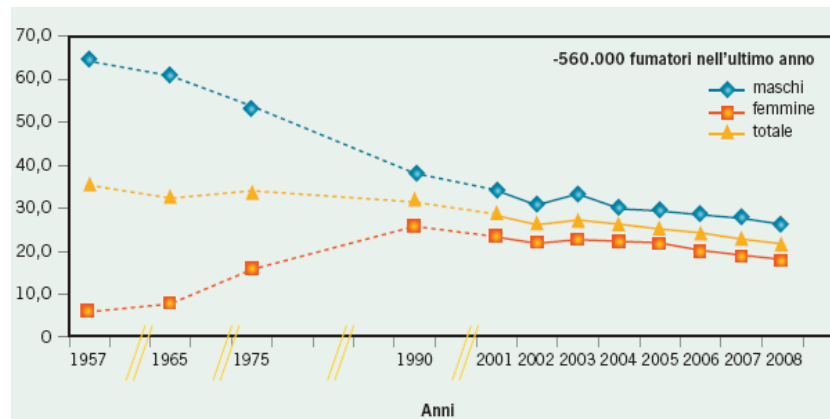
2.1 Epidemiologia e dimensione del problema

Il tumore del polmone rappresenta la principale causa di morte per cancro in Occidente (1), con oltre 1.5 milioni di nuovi casi diagnosticati nel Mondo e circa 3000 decessi al giorno (2). In Italia i nuovi casi nel 2008, valutati per conto del settore Epidemiologia e Sorveglianza dell'Istituto Superiore di Sanità, sono stati in totale 32102, con 26211 decessi. L'incidenza della patologia è andata rapidamente incrementando con un andamento esponenziale a partire dagli inizi del secolo scorso, ed attualmente raggiunge tassi di 1 nuovo caso l'anno ogni 1000 abitanti nei paesi sviluppati, rappresentando circa il 15% di tutti i casi di neoplasia. L'età media alla diagnosi è intorno ai 60 anni con un picco di incidenza di 71(3), il che rende ancora più difficile il trattamento di una patologia di per sé complessa e per la quale le terapie sono di limitata efficacia. In Italia il sesso più colpito è il maschile, con un rapporto di incidenza tra i due sessi di circa 2.5-3 a 1; negli Stati Uniti d'America questo rapporto va sempre più assottigliandosi per una riduzione dell'incidenza della patologia nel sesso maschile a partire dagli inizi degli anni '90, accompagnata da un continuo aumento della stessa nelle donne, in cui il tumore del polmone rappresenta oggi la maggiore causa di mortalità neoplastica, avendo superato anche il carcinoma mammario (2).

L'andamento dell'incidenza della patologia e le differenze fra i sessi sono imputabili al principale fattore di rischio per la malattia, ovvero il fumo di sigaretta, la cui abitudine è andata diffondendosi in Europa e negli Stati Uniti d'America durante e dopo la prima

guerra mondiale, dapprima nel sesso maschile e, recentemente, anche nel sesso femminile (Figura 1).

Figura 1. Prevalenza dei fumatori secondo le indagini DOXA condotte tra il 1957 ed il 2008.



In circa il 10% dei casi, tuttavia, il carcinoma polmonare insorge in pazienti che non hanno mai fumato. Dal punto di vista clinico, i non fumatori che sviluppano la malattia sono più frequentemente donne, con diagnosi istologica di adenocarcinoma, con un'età media più bassa rispetto ai fumatori e con una prognosi migliore. Anche da un punto di vista biologico i pazienti non fumatori presentano caratteristiche diverse rispetto ai fumatori: il non fumatore sviluppa una malattia in cui l'anomalia genetica più rilevante, da cui dipende la proliferazione tumorale, è rappresentata dalla dipendenza da un recettore per un fattore di crescita noto come *epidermal growth factor receptor* (EGFR); nei fumatori,

invece, si riscontra più comunemente una mutazione a carico dell'oncogene K-Ras.

Da un punto di vista anatomico-patologico e clinico si distinguono due forme principali di carcinoma polmonare: il carcinoma anaplastico a piccole cellule (*small cell lung cancer*, SCLC) , indicato, più generalmente, con il termine di microcitoma, che costituisce circa il 15% dei tumori polmonari, ed il carcinoma polmonare non a piccole cellule (*non-small cell lung cancer*, NSCLC), all'interno del quale si identificano tre forme principali: l' adenocarcinoma (con la sua variante bronchiolo-alveolare), il carcinoma squamoso (o epidermoide) ed il carcinoma a grandi cellule. Il carcinoma squamoso è, di solito, localizzato centralmente e, un tempo, era il tipo istologico più comune; nel corso dell' ultimo ventennio, infatti, è stato segnalato, particolarmente nel sesso femminile, un incremento nella diagnosi di adenocarcinoma, il quale, a differenza del primo, è più spesso localizzato nelle regioni polmonari periferiche ed il cui aumento di incidenza è probabilmente da imputare al maggior consumo, rispetto al passato, di sigarette con filtro.

Ancora oggi la diagnosi delle neoplasie polmonari è solitamente tardiva e in oltre il 75% dei casi la malattia viene diagnosticata in fase localmente avanzata o metastatica; anche per questo motivo la sopravvivenza dopo diagnosi si attesta su circa il 10% dei pazienti vivi a 5 anni dalla diagnosi, modificandosi notevolmente in base ai fattori prognostici ed, in particolare, allo stadio di malattia.

La stadiazione del carcinoma polmonare secondo il sistema TNM è un mezzo universalmente accettato per stimare la prognosi, definire la terapia e per valutarne i risultati. Tale sistema

classificativo trova attualmente consenso universale, è routinariamente applicato alla pratica clinica ed è stato recentemente aggiornato con un importante lavoro dell'*International Association for the Study of Lung Cancer* (IASLC) (4) (appendice I).

2.2 Trattamento dei carcinomi polmonari non a piccole cellule in stadio iniziale di malattia

La scelta del trattamento dei carcinomi non a piccole cellule dipende principalmente dallo stadio di malattia alla diagnosi e dalle caratteristiche del paziente in esame.

I tumori polmonari non a piccole cellule allo stadio clinico I e II sono considerati neoplasie allo stadio precoce e beneficiano di un trattamento chirurgico resettivo. La sopravvivenza globale a 5 anni è del 65%, con percentuali di circa il 71% per lo stadio IA e del 57% per lo stadio IB.

In questi stadi il tipo di chirurgia dipende dalla localizzazione e dalla dimensione del tumore primitivo: nel caso di lesioni periferiche l'intervento di scelta è la lobectomia, mentre l'exeresi sublobare è da riservare a quei casi con deficit funzionale respiratorio; per le lesioni centrali, invece, è frequentemente necessario ricorrere alla pneumonectomia o alla lobectomia con broncoplastica al fine di raggiungere la radicalità.

Il *Lung Cancer Study Group* ha riportato nel 1995 i risultati di uno studio randomizzato prospettico che confrontava la resezione limitata con la lobectomia in pazienti con NSCLC allo stadio I con lesione localizzata in periferia (5). In questo studio i pazienti con resezione limitata hanno presentato un aumento tre volte superiore

del tasso di recidiva locale, un 75% di aumento del tasso di recidiva locale e a distanza ed un incremento del 50% del tasso di mortalità per neoplasia.

Nei pazienti non operabili per motivi internistici e/o di funzionalità respiratoria, la radioterapia convenzionale o stereotassica consente di ottenere buoni risultati in termini di controllo locale di malattia e sopravvivenza.

Se nello stadio IA la chemioterapia adiuvante non va somministrata senza alcun dubbio, controversie esistono per lo stadio IB; in particolare, i dati riportati nello studio CALGB 9633 (6) e nello studio JBR.10 (7), nonostante siano complessivamente negativi, sottolineano come ci sia un vantaggio a favore del trattamento adiuvante in pazienti con diametro tumorale > 4 cm.

Nello stadio II l'approccio chirurgico rappresenta ancora la prima opzione terapeutica; tuttavia la chirurgia da sola ottiene una sopravvivenza globale a 5 anni intorno al 35-40%, per cui in questo stadio di malattia un trattamento chemioterapico postoperatorio può conferire un ulteriore vantaggio in sopravvivenza per pazienti in buone condizioni generali, senza significative comorbidity e che abbiano avuto una buona ripresa fisica dopo l'intervento chirurgico.

Nello stadio IIIA di malattia con interessamento dei linfonodi mediastinici omolaterali alla lesione polmonare (N2), il trattamento prevede un approccio multidisciplinare con integrazione della chirurgia, della chemioterapia e della radioterapia; solitamente in caso di malattia linfonodale minima, può essere presa in considerazione la chirurgia come prima opzione, seguita da una chemioterapia adiuvante in pazienti selezionati ed eventualmente da un trattamento radiante sul mediastino. In caso di pazienti con

esteso interessamento linfonodale mediastinico, invece, la chemioterapia primaria può precedere l'intervento chirurgico e/o la radioterapia (8-10).

2.3 Trattamento dei carcinomi polmonari non a piccole cellule in stadio avanzato di malattia

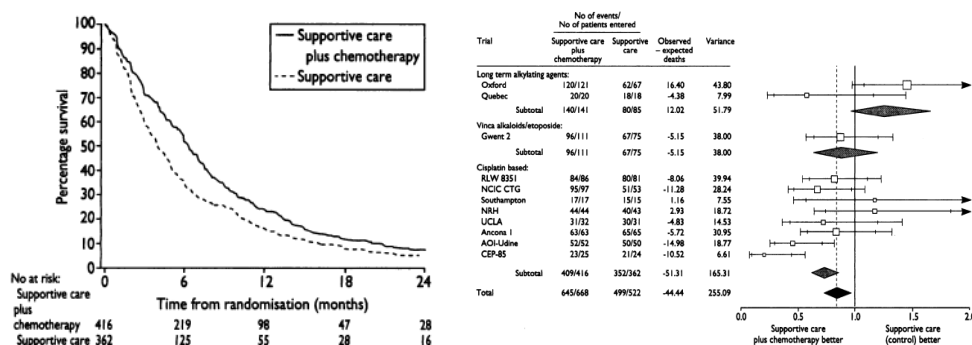
2.3.1 Trattamento chemioterapico

Nei pazienti con malattia metastatica, in cui non vi è possibilità di guarigione, il trattamento *standard* è rappresentato dalla terapia medica sistemica.

Dagli anni '80, a seguito dell'introduzione del cisplatino nella pratica clinica, sono stati condotti vari studi clinici randomizzati che hanno confrontato l'efficacia di un trattamento chemioterapico contenente cisplatino verso la terapia di supporto (11-13).

In considerazione del basso numero di pazienti inseriti e dei risultati non conclusivi ottenuti dai singoli studi, è stata pubblicata nel 1995 una metanalisi condotta sui dati individuali dei singoli pazienti che avevano partecipato agli studi di chemioterapia verso terapia di supporto (14), che ha evidenziato un vantaggio modesto ma statisticamente significativo dell'uso della chemioterapia comprendente cisplatino con una riduzione del rischio di morte del 27% per i pazienti trattati, corrispondente a un incremento assoluto in sopravvivenza a un anno del 10% e a un incremento della sopravvivenza mediana di 1.5 mesi (Figura 2).

Figura 2. Risultati della metanalisi degli studi di chemioterapia verso terapia di supporto del 1995.



L'avvento di nuovi chemioterapici definiti di “terza generazione” (vinorelbina, gemcitabina, paclitaxel e docetaxel) ha spinto i ricercatori a valutarne il ruolo anche nel trattamento dei carcinomi polmonari; in particolare, tra il 1999 e il 2000 sono stati pubblicati 4 studi di fase III (15-18) di confronto tra la terapia di supporto e uno di questi nuovi chemioterapici, dimostrando una percentuale di risposte intorno al 20% e una sopravvivenza mediana di circa 7 mesi.

Con l'introduzione dei nuovi chemioterapici sono stati, inoltre, condotti studi di fase III randomizzati per valutare il beneficio in termini di attività ed efficacia di una polichemioterapia comprendente platino e uno di questi agenti rispetto alla monochemioterapia con il solo farmaco di nuova generazione.

Tra questi, il primo è stato quello pubblicato nel 1994 da Le Chevalier (19), che confrontava l'associazione cisplatino e vinorelbina verso cisplatino e vindesina verso la sola vinorelbina. Lo studio, condotto su 612 pazienti, ha dimostrato un vantaggio statisticamente significativo in termini di risposte obiettive e

sopravvivenza del regime contenente cisplatino e vinorelbina sia verso la monoterapia che verso la doppietta con la vindesina: le percentuali di risposte obiettive sono infatti state del 30% per tale regime contro il 19% per il regime contenente vindesina ed il 14% per il regime monochemioterapico (cisplatino+ vinorelbina versus vinorelbina, $P<0.001$), con una sopravvivenza mediana per i tre regimi rispettivamente di 40, 32, 31 settimane (cisplatino+vinorelbina versus vinorelbina, $P=0.01$).

Un'altra strategia identificata nel corso degli anni è stata quella di associare al cisplatino altri due chemioterapici (dei quali uno era la mitomicina) a formare delle triplete, che sono state confrontate con le doppiette a base di platino. Lo studio del Gruppo Oncologico Italiano per la Ricerca Clinica (GOIRC) ha confrontato il regime a due farmaci cisplatino ed etoposide con quelli a tre farmaci cisplatino, mitomicina, vindesina (MVP) e cisplatino, mitomicina, ifosfamide (MIC), riportando percentuali di risposte obiettive pari al 23% per il regime a due farmaci e al 36% e 40% per i regimi a tre farmaci (MVP e MIC, rispettivamente) (20).

Successivi studi (21,22) hanno poi confrontato i regimi di terza generazione (combinazioni di derivati del platino con vinorelbina o gemcitabina o paclitaxel o docetaxel) con queste triplete; in particolare in uno studio pubblicato nel 1999 sul *Journal of Clinical Oncology* (21) 307 pazienti sono stati randomizzati a ricevere l'associazione cisplatino-gemcitabina verso l'associazione mitomicina, ifosfamide e cisplatino (MIC), avendo come obiettivo principale la valutazione della qualità di vita e come obiettivi secondari la valutazione delle percentuali di risposta, la tossicità e la sopravvivenza. I risultati dello studio hanno evidenziato una

percentuale di risposte significativamente più alta a favore del nuovo regime, registrando infatti il 38% di risposte obiettive verso il 26% ($P=0.29$), senza però significative differenze tra i due bracci in termini di qualità di vita, tossicità, tempo alla progressione e sopravvivenza mediana.

In conseguenza dei risultati di questi studi, le doppiette di combinazione di derivati del platino (cisplatino e carboplatino) in associazione con farmaci chemioterapici di nuova generazione (gemcitabina, vinorelbina, paclitaxel, docetaxel) sono state considerate dagli inizi del 2000 come il trattamento di riferimento per i pazienti con NSCLC avanzato in buone condizioni generali.

A queste considerazioni è seguita una nuova fase di studi randomizzati volti a valutare quale di questi regimi potesse essere il migliore (23,24).

In particolare, uno studio di confronto tra regimi di nuova generazione è stato pubblicato nel 2002 da Giorgio Scagliotti (23), in cui 612 pazienti sono stati randomizzati a ricevere cisplatino-gemcitabina o carboplatino-paclitaxel o cisplatino-vinorelbina. I risultati hanno dimostrato l'assenza di differenze statisticamente significative fra i tre bracci di trattamento in termini di percentuali di risposte obiettive (30% per la doppietta con gemcitabina, 32% per quella con paclitaxel e 30% per quella con vinorelbina) e di sopravvivenza mediana (circa 9.5 mesi per tutti i bracci), tempo alla progressione (circa 5 mesi per tutti i regimi) o tempo di fallimento della terapia (circa 4.5 mesi per tutte le associazioni). Tuttavia la tossicità, ematologica e non ematologica, è stata più elevata nel braccio di pazienti trattati con cisplatino e vinorelbina: le percentuali di neutropenia di grado 4 sono state del 17%, 35% e del 43%

rispettivamente nelle associazioni con gemcitabina, paclitaxel e vinorelbina, anche se il numero di pazienti con neutropenia febbrile è stato basso e simile in tutti i bracci; la piastrinopenia di grado 3 e 4 ha riportato invece una più alta incidenza nello schema con la gemcitabina, 16% verso 3% in quello con paclitaxel e 0.1% in quello con vinorelbina, anche se gravi eventi emorragici non si sono verificati in alcun braccio.

I regimi di terza generazione sono stati ancora confrontati tra loro nello studio ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*) (24), pubblicato da Schiller nel 2002, nel quale 1207 pazienti sono stati randomizzati a ricevere quattro diversi regimi di trattamento: cisplatino-paclitaxel (quest'ultimo in infusione di 24 ore), cisplatino-gemcitabina, cisplatino-docetaxel, carboplatino-paclitaxel. Lo studio non ha riportato differenze statisticamente significative in termini di percentuali di risposte e di sopravvivenza tra i diversi bracci di trattamento: le percentuali di risposta sono state, infatti, del 21% per la doppietta cisplatino-paclitaxel, 22% per cisplatino-gemcitabina, 17% per cisplatino-docetaxel, 17% per carboplatino-paclitaxel; la sopravvivenza mediana è stata rispettivamente di 7.8 mesi, 8.1 mesi, 7.4 mesi, 8.1 mesi, mentre il tempo alla progressione è stato maggiore nel braccio dei pazienti trattati con la doppietta cisplatino-gemcitabina (4.2 mesi contro 3.4 mesi del regime cisplatino-paclitaxel, 3.7 mesi del regime con docetaxel e 3.1 mesi con carboplatino e paclitaxel).

Dai risultati di questi due studi si evince come nessun regime di terza generazione abbia dimostrato una superiorità tale rispetto agli altri da poter essere assunto come unico regime di riferimento, tuttavia in una metanalisi pubblicata da Le Chevalier nel 2005 (25) è

stato evidenziato un vantaggio statisticamente significativo in termini di riduzione del rischio di progressione di malattia e un beneficio assoluto in sopravvivenza ad un anno pari al 4.2% a favore di regimi a base di platino e gemcitabina rispetto ai regimi a base di platino non includenti gemcitabina. La metanalisi ha incluso 13 studi, pubblicati dal 1999 al 2003, nei quali il regime cisplatino e gemcitabina (in 10 *trials*) o il regime carboplatino e gemcitabina (in soli 3 *trials*) sono stati confrontati in 4556 pazienti con regimi contenenti platino ma non contenenti gemcitabina. I risultati riportano come il regime a base di platino e gemcitabina abbia determinato una riduzione statisticamente significativa del rischio di mortalità, con un vantaggio assoluto in sopravvivenza del 3.9% ad un anno e del 2.6% a due anni; la sopravvivenza mediana è risultata pari a 9 mesi per i regimi contenenti gemcitabina e 8.2 mesi per gli altri e, anche in termini di sopravvivenza libera da malattia (5.1 verso 4.4 mesi), questa metanalisi ha suggerito una superiorità dei regimi contenenti gemcitabina rispetto agli altri,.

Ancora oggi è oggetto di discussione se i regimi a base di cisplatino o di carboplatino siano egualmente efficaci nel trattamento del NSCLC. In realtà, questi due sali di platino differiscono tra loro per il profilo di tollerabilità, essendo il cisplatino associato a maggiore tossicità gastro-intestinale, neurologica e renale ed il carboplatino maggiormente mielotossico. Nella maggior parte dei casi la scelta del platino nella pratica clinica dipende proprio dal loro diverso profilo di tossicità.

Numerosi studi randomizzati hanno confrontato regimi contenenti cisplatino con schemi contenenti carboplatino nel trattamento del NSCLC avanzato senza riportare alcun sostanziale vantaggio a

favore di nessuno dei due (24, 26-29) e sono stati oggetto di due meta-analisi, di cui una condotta sui dati pubblicati in letteratura (30) e l'altra condotta su dati individuali di pazienti (31). La meta-analisi condotta su dati individuali pubblicata nel 2007, valutando un totale di 2.968 pazienti inseriti in 9 studi randomizzati, ha evidenziato una percentuale di risposte obiettive statisticamente più elevata nel braccio contenente cisplatino rispetto al carboplatino (30% versus 24%, rispettivamente; odds ratio [OR]=1.37; intervallo di confidenza al 95% 1.16-1.61; $p < 0.001$), mentre, per quanto riguarda la sopravvivenza, le associazioni con il carboplatino sono associate a un rischio relativo di morte maggiore del 7% rispetto a quelle con cisplatino, anche se questa differenza non è risultata statisticamente significativa.

Dai dati esposti, risulta evidente come il trattamento chemioterapico con cisplatino e gemcitabina sia stato considerato per anni uno dei regimi di riferimento per il trattamento di prima linea del carcinoma polmonare non a piccole cellule avanzato in pazienti non anziani e in buone condizioni generali, tanto da essere uno degli schemi più utilizzati in Italia e in Europa.

2.3.2 Ruolo dell'istologia

Il trattamento delle neoplasie polmonari, sia per quanto riguarda la strategia sia per quanto riguarda la scelta dei farmaci chemioterapici da impiegare, ha fino a qualche anno fa sempre previsto la "semplice" distinzione fra tumori a piccole cellule e tumori non a piccole cellule. Pertanto, al momento della diagnosi, specie su piccole biopsie o campioni citologici, in considerazione dell'assenza di una ricaduta terapeutica e di un sicuro significato prognostico, non

era strettamente richiesto al patologo di fornire la sottotipizzazione dei tumori non a piccole cellule, ma solo di fornire al clinico l'informazione circa la distinzione fra SCLC e NSCLC; per anni, quindi, tutti i pazienti affetti da NSCLC hanno ricevuto una chemioterapia basata sul platino, indipendentemente dal fatto che la malattia fosse un adenocarcinoma piuttosto che un carcinoma squamoso. Recentemente, però, diversi studi (32) hanno stimolato un rinnovato interesse per l'impatto dei sottotipi istologici del NSCLC sull'*outcome* dei pazienti e sulla conseguente necessità di una loro definizione al fine di un migliore trattamento oncologico.

Il pemetrexed, antimetabolita diretto verso diversi enzimi coinvolti nel metabolismo dei folati (tra cui la timidilato sintasi [TS], la diidrofolato reduttasi [DHFR] e la glicinamide ribonucleotide formil-transferasi [GARFT]) è stato inizialmente approvato per il trattamento del mesotelioma in associazione al cisplatino e, in seguito, si è dimostrato efficace nel trattamento del NSCLC sia in seconda (33) che in prima linea (34).

Lo studio di Scagliotti et al (JMDB trial) (34) ha dimostrato la non inferiorità del regime cisplatino-pemetrexed nei confronti del regime cisplatino-gemcitabina, considerato come *standard* di riferimento nel trattamento di prima linea dei pazienti affetti da NSCLC avanzato. La sopravvivenza mediana si è dimostrata uguale nei due bracci di trattamento (10.3 mesi, Hazard ratio [HR]: 0.94; 95 CI 0.84-1.05) con una sopravvivenza libera da progressione di 4.8 mesi per il braccio con pemetrexed e 5.1 mesi con il braccio cisplatino-gemcitabina. Alla luce di emergenti evidenze circa una possibile diversa espressione dell'enzima timidilato sintetasi fra carcinoma squamoso e adenocarcinoma (35), in questo studio,

durante l'arruolamento, è stata pianificata un'analisi per sottogruppi istologici: i risultati di quest'analisi hanno messo in evidenza una diversa efficacia del regime cisplatino-pemetrexed nell'istotipo non-squamoso rispetto all'istotipo squamoso; infatti, i pazienti con adenocarcinoma e carcinoma a grandi cellule trattati con il regime contenente pemetrexed hanno riportato un miglioramento nella sopravvivenza rispetto a quelli trattati con cisplatino-gemcitabina (HR:0.81; 95% CI 0.70-0.94; p=0.005); viceversa, i pazienti con istologia squamosa hanno riportato un beneficio in sopravvivenza se trattati con il regime cisplatino-gemcitabina rispetto a quelli trattati nel braccio con cisplatino-pemetrexed (HR:1.23; 95% CI 1.00-1.51; p= 0.050). Questo studio, quindi, è stato il primo ad aver dimostrato un'interazione tra istotipo ed efficacia di doppiette contenenti cisplatino, benchè, nell'interpretazione dei risultati, vada considerato che l'evidenza relativa alla maggiore efficacia del trattamento con cisplatino e pemetrexed nei tumori non squamosi provenga da un'analisi di sottogruppo (Tabella 1).

A sostegno di questi dati vanno, in realtà, aggiunti i risultati ottenuti nello studio randomizzato di seconda linea (JMEI trial) nel quale pemetrexed è stato confrontato con docetaxel (36) e, soprattutto, nello studio di fase III (studio JMEN), che ha valutato pemetrexed come terapia di mantenimento del NSCLC in stadio avanzato (37). In quest'ultimo, pazienti con NSCLC in stadio IIIB/IV, non progrediti dopo 4 cicli di chemioterapia di prima linea contenente platino, sono stati randomizzati a ricevere pemetrexed o placebo: il trattamento con pemetrexed ha comportato un vantaggio in sopravvivenza libera da progressione (*progression free survival*, PFS) e in sopravvivenza globale (*overall survival*, OS), e il beneficio

in termini di sopravvivenza è risultato ancora più evidente (5 mesi) per i pazienti con istotipo non-squamoso. La concordanza dei risultati dei vari studi ha fatto sì che il pemetrexed fosse approvato per il trattamento di prima e seconda linea del NSCLC avanzato esclusivamente per i pazienti con istotipo non-squamoso.

Tabella 1. Studio randomizzato di confronto tra cisplatino più pemetrexed e cisplatino più gemcitabina: risultati complessivi e analisi relativa al sottotipo istologico

	Cisplatino+pemetrexed	Cisplatino+gemcitabina
POPOLAZIONE COMPLESSIVA		
Numero di pazienti	862	863
Sopravvivenza globale		
Mediana	10.3 mesi	10.3 mesi
Hazard Ratio (95% CI)	0.94 (0.84-1.05)	
Sopravvivenza libera da progressione		
Mediana	4.8 mesi	5.1 mesi
Hazard Ratio (95% CI)	1.04 (0.94-1.15)	
Analisi di sottogruppo in base all'istotipo del tumore		
Pazienti con istologia non squamosa		
Numero di pazienti	512	488
Sopravvivenza globale		
Mediana	11.8	10.4
Hazard Ratio (95% CI)	0.81 (0.70-0.94)	
Sopravvivenza libera da progressione		
Mediana	5.3	4.7
Hazard Ratio (95% CI)	0.90 (0.79-1.02)	
Pazienti con istologia squamosa		
Numero di pazienti	244	229
Sopravvivenza globale		
Mediana	9.4 mesi	10.8 mesi
Hazard Ratio (95% CI)	1.23 (1.00-1.51)	
Sopravvivenza libera da progressione		
Mediana	4.4 mesi	5.5 mesi
Hazard Ratio (95% CI)	1.36 (1.12-1.65)	

2.3.3 Farmaci a bersaglio molecolare: i farmaci anti-angiogenetici

L'importanza della sottotipizzazione istologica nel NSCLC risulta derivata anche dai risultati di sicurezza riportati negli studi con un inibitore dell'angiogenesi: il bevacizumab. Il bevacizumab, anticorpo monoclonale ricombinante umanizzato diretto verso il VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) è stato testato in diversi tipi di tumore e ha mostrato in due studi internazionali di fase III (ECOG4599 e AVAiL) la sua attività ed efficacia nel NSCLC non-squamoso in stadio avanzato in associazione ad una chemioterapia contenente il platino.

In particolare, il vantaggio derivante dall'aggiunta del bevacizumab, alla dose di 15 mg/kg, alla combinazione di carboplatino e paclitaxel è stata valutata in uno studio randomizzato statunitense di fase III (ECOG 4599) in cui l'eleggibilità, in considerazione del rischio di emorragia legato all'impiego del bevacizumab nei tumori squamosi, era limitata ai pazienti con istologia non squamosa (38). Lo studio ha raggiunto il suo obiettivo primario, dimostrando un significativo beneficio in termini di prolungamento della sopravvivenza globale (sopravvivenza mediana 12.3 versus 10.3 mesi, HR 0.79, intervallo di confidenza al 95% 0.67- 0.92, $p = 0.003$) dall'aggiunta del farmaco antiangiogenico al trattamento chemioterapico; inoltre, in un'analisi esplorativa condotta successivamente alla pubblicazione dello studio, nel sottogruppo di pazienti con adenocarcinoma l'aggiunta del bevacizumab alla chemioterapia è risultata associata con un vantaggio di circa 4 mesi di prolungamento della

sopravvivenza globale (14.2 versus 10.3 mesi, HR 0.69, intervallo di confidenza al 95% 0.58-0.83).

In un secondo studio randomizzato denominato AVAiL (39), condotto in Europa, Australia e Canada, il bevacizumab è stato aggiunto alla combinazione di cisplatino e gemcitabina, un regime chemioterapico ampiamente utilizzato al di fuori degli USA. I pazienti eleggibili erano randomizzati a ricevere chemioterapia più placebo (347 pazienti), chemioterapia più bevacizumab alla dose di 7.5 mg/Kg (345 pazienti) e chemioterapia più bevacizumab alla dose di 15 mg/Kg (351 pazienti). Lo studio era stato inizialmente disegnato avendo come *end point* primario l'OS, che, poi, è stato emendato a PFS. Il vantaggio in PFS dei due bracci di trattamento con bevacizumab confrontato con il placebo era statisticamente significativo, benché piccolo in termini assoluti: la PFS mediana era 6.1, 6.7 e 6.5 mesi nei gruppi trattati con chemioterapia da sola, chemioterapia più bevacizumab alla dose di 7.5 mg/Kg e chemioterapia più bevacizumab alla dose di 15 mg/Kg, con un HR di progressione rispetto al braccio di controllo era pari a 0.75 (intervallo di confidenza al 95% 0.62-0.91) e 0.82 (intervallo di confidenza al 95% 0.68-0.98), rispettivamente per la dose più bassa e più alta di bevacizumab. Quindi, benché lo studio AVAiL abbia fallito nel dimostrare una differenza in sopravvivenza tra il braccio standard e i bracci di trattamento sperimentali, sia la *Food and Drug Administration* (FDA) che l'*European Medicines Agency* (EMA) hanno approvato il bevacizumab per il trattamento di prima linea del NSCLC in stadio avanzato ad istologia non squamosa, in combinazione con un qualsiasi trattamento chemioterapico a base di platino.

2.3.4 Farmaci a bersaglio molecolare: farmaci anti-EGFR

La famiglia dell' EGFR include 4 diversi recettori di membrana (Figura 3), indicati come HER1 (o EGFR propriamente detto), HER2, HER3 e HER4, che rappresentano recettori con attività tirosinchinasica, attivati da diversi ligandi (per EGFR sono noti EGF, TGF-alfa, anfiregulina, per HER3 e HER4 eregulina e neuregulina, mentre non è tuttora conosciuto il ligando di HER2); una volta legatosi allo specifico ligando e una volta formato un omo- o un eterodimero, il recettore è pronto ad attivare una cascata di eventi che porta a due principali conseguenze: la stimolazione della proliferazione cellulare, dovuta all'attivazione di RAS-RAF-MAPK e il blocco del processo di apoptosi, mediante l'attivazione di PI3KCA-AKT (40). Il rilevante ruolo biologico, insieme alla frequente deregolazione riscontrata in vari tumori, incluso il NSCLC (in cui l'EGFR può essere iperespresso, amplificato o mutato), fanno sì che l'EGFR sia stato considerato un ideale bersaglio terapeutico.

L'EGFR può essere bloccato mediante l'impiego di anticorpi monoclonali che agiscono legandosi al dominio extracellulare del recettore, o mediante piccole molecole che interferiscono con l'attività tirosinchinasica del dominio intracellulare (EGFR-TKI).

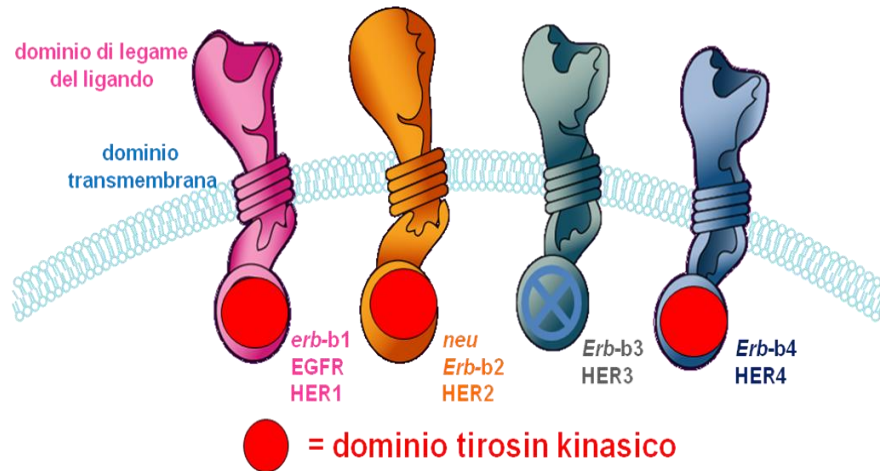
Tra gli anticorpi monoclonali quello maggiormente studiato è il cetuximab, un anticorpo chimerico che blocca il dominio extracellulare dell'EGFR. I primi studi che hanno valutato l'efficacia di cetuximab insieme alla chemioterapia hanno mostrato interessanti percentuali di risposte con un possibile miglioramento della sopravvivenza (41-43) e, più recentemente, due studi randomizzati di fase III hanno confrontato la chemioterapia da sola rispetto alla

chemioterapia in associazione al cetuximab in pazienti con NSCLC mai trattati in precedenza (44, 45).

Lo studio FLEX (First-line Erbitux in lung cancer”) (44) è un ampio studio di fase III che ha randomizzato pazienti con iperespressione all’immunoistochimica di EGFR ad un trattamento con cisplatino più vinorelbina o al medesimo trattamento con l’aggiunta di cetuximab; in questo studio l’aggiunta di cetuximab alla chemioterapia ha portato ad un significativo vantaggio nella percentuale delle risposte (36% versus 29%, $p=0.012$), con un significativo beneficio in sopravvivenza (11.3 versus 10.1 mesi, $p=0.044$), benché tale beneficio fosse marginale (HR 0.87) e associato con un aumentato rischio di tossicità, soprattutto neutropenia febbrile.

Questi risultati sono stati confermati nello studio BMS099 (45), in cui 676 pazienti, indipendentemente dall’espressione di EGFR, sono stati randomizzati a ricevere carboplatino più un taxano verso lo stesso regime chemioterapico in associazione al cetuximab. Benché l’obiettivo primario dello studio, ovvero la PFS, non sia stato raggiunto (4.4 versus 4.2 mesi, $p=0.2$), sia la percentuale di risposte (*response rate*, RR) (25% versus 17%, $p=0.007$) che la sopravvivenza mediana (9.6 versus 8.3 mesi) hanno mostrato un vantaggio a favore del cetuximab, con una riduzione del rischio di morte paragonabile a quella ottenuta nello studio FLEX (HR 0.89), benché non significativa dal punto di vista statistico ($p=0.17$). I risultati di sopravvivenza indicano chiaramente che una consistente proporzione di pazienti non trae beneficio dall’uso di cetuximab, sottolineando la necessità di *biomarkers* utili per la selezione dei pazienti candidati al trattamento con questo anticorpo (46).

Figura 3. La famiglia dell'EGFR



Gli EGFR-TKIs sono piccole molecole che interferiscono con l'attività tirosinchinasica dell'EGFR, di cui gefitinib ed erlotinib sono inibitori reversibili.

Numerosi studi sono stati condotti per sperimentare l'efficacia dell'impiego di entrambi i farmaci nel trattamento di prima linea dei pazienti affetti da NSCLC avanzato; a dispetto dei promettenti risultati preclinici, che evidenziavano sinergismo tra tali farmaci e la chemioterapia, quattro studi randomizzati di fase III (47-50) che hanno valutato l'efficacia di gefitinib o erlotinib in aggiunta al trattamento chemioterapico di prima linea hanno prodotto risultati completamente negativi (**Tabella 2**).

Tabella 2. Studi randomizzati di fase III di confronto tra chemioterapia da sola verso chemioterapia in associazione con EGFR-TKI

Studio	Farmaci	RR		PFS			OS		
		%	p	Mediana (mesi)	p	HR	Mediana (mesi)	p	HR
INTACT 1 ⁴⁷	Gefitinib+G	50.3	NS	5.8	0.7	-	9.9	0.4	-
	C vs GC	47.2		6.0			10.9		
INTACT 2 ⁴⁸	Gefitinib+C	30.4	NS	5.3	0.056	-	9.8	0.6	-
	P vs CP	28.7		5.0			9.9		
TRIBUTE ⁴⁹	Erlotinib+C	21.5	0.3	5.1	0.3	0.93	10.6	0.9	0.99
	P vs CP	19.3		4.9			10.5		
TALENT ⁵⁰	Erlotinib+G	31.5	NS	5.4	0.7	0.98	9.9	0.4	1.06
	C vs GC	29.9		5.6			10.1		

Abbreviazioni: GC: cisplatino più gemcitabina; CP: carboplatino più paclitaxel; RR: percentuale di risposte; PFS: sopravvivenza libera da progressione; OS: sopravvivenza globale; NS: non significativo; HR: Hazard Ratio.

Come noto, risultati migliori sono stati ottenuti, in pazienti pretrattati, quando gefitinib o erlotinib sono stati somministrati come agenti singoli (51, 52).

Quindi, benchè EGFR ed i suoi ligandi siano espressi con elevata frequenza nel NSCLC, solo una piccola percentuale dei pazienti risponde al trattamento con inibitori tirosinchinasici. Numerosi studi hanno ricercato fattori predittivi potenzialmente utili per selezionare i pazienti da sottoporre al trattamento con tali farmaci e, da questi, è risultato come un'alta probabilità di risposta agli inibitori di EGFR-TK sembri associata ad alcune caratteristiche cliniche, quali il sesso femminile, l'essere non fumatori, l'origina asiatica e l'istologia adenocarcinoma. Nonostante l'utilità delle caratteristiche cliniche nell'identificare i migliori candidati al trattamento con EGFR-TKIs,

la selezione dei pazienti dovrebbe basarsi su specifiche caratteristiche biologiche del tumore. A tal proposito, recenti acquisizioni sono quelle relative al riscontro di specifiche mutazioni a carico del gene codificante per l'EGFR, in grado di attivare il recettore e di renderlo maggiormente suscettibile all'inibizione da parte di gefitinib o erlotinib (53, 54). Numerosi studi, sia retrospettivi che prospettici, hanno confermato che i pazienti che presentano mutazioni di EGFR sono particolarmente sensibili agli EGFR-TKIs, con una percentuale di risposte obiettive fino al 90% e con un tempo mediano alla progressione che supera i nove mesi. Tutti questi dati hanno rappresentato il razionale per 4 ampi studi di fase III che hanno confrontato, in prima linea, la chemioterapia classica rispetto ad un trattamento con gefitinib in pazienti portatori di mutazioni di EGFR o con caratteristiche cliniche predittive per la presenza di mutazioni di EGFR (Tabella 3). Nello studio IPASS (55), condotto in 1217 pazienti Asiatici con istologia positiva per adenocarcinoma e non fumatori, l' *end point* primario dello studio, ovvero la PFS, è stato raggiunto, mostrando una significativa riduzione del rischio di progressione nei pazienti trattati con gefitinib [HR 0.74, $p < 0.0001$]. Nello studio First-SIGNAL (56), condotto in 309 pazienti Coreani non fumatori e affetti da adenocarcinoma, gefitinib ha incrementato significativamente la PFS (HR 0.81, $p = 0.044$), offrendo una miglior qualità di vita (QoL) quando confrontato con la chemioterapia.

I due studi appena esposti conducono ad una considerazione: il vantaggio in PFS per il gefitinib era limitato ai pazienti portatori di mutazioni attivanti di EGFR, mentre i pazienti con EGFR *wild-type* presentavano una PFS significativamente più lunga quando trattati

con la chemioterapia, per cui questi risultati forniscono una chiara evidenza che, anche in una popolazione di pazienti con caratteristiche cliniche predittive di sensibilità ai EGFR-TKIs, in assenza di mutazioni di EGFR, la chemioterapia rimane il *gold standard*. Più recentemente, altri due studi hanno confrontato in prima linea una chemioterapia *standard* a base di platino con il gefitinib in pazienti selezionati sulla base di caratteristiche biologiche: nello studio WJTOG3405 (57) e nello studio NEJ002 (58), infatti, sono stati randomizzati pazienti *chemonaïves* portatori di una mutazione attivante di EGFR al trattamento con gefitinib o ad una chemioterapia standard a base di platino (carboplatino più paclitaxel nello studio NEJ002 and cisplatino più docetaxel nello studio WJTOG 3405). Entrambi gli studi hanno nuovamente dimostrato che in pazienti con mutazioni di EGFR il gefitinib produce una più alta percentuale di risposte ed un tempo alla progressione più lungo rispetto alla chemioterapia, supportando l'uso di EGFR-TKIs in prima linea in pazienti selezionati.

Un approccio simile è attualmente in corso in Europa nell'ambito dello studio EURTAC, un *trial* randomizzato di fase III di confronto fra erlotinib e chemioterapia in pazienti *chemonaïves* con mutazioni di EGFR, i cui risultati di un'analisi *ad interim* sono stati mostrati nel corso dell'ultimo *meeting* annuale dell' *American Society for Clinical Oncology* (ASCO) (59); anche in questo studio erlotinib in prima linea in pazienti Caucasicci portatori di mutazioni attivanti di EGFR ha prodotto un vantaggio in PFS (9.4 mesi versus 5.2 mesi del braccio standard) (HR, 0.42; 95% CI, 7.9-12.3; $p < 0.0001$) con un profilo di tossicità accettabile rispetto ad una chemioterapia standard basata sul platino.

Tabella 3. Studi randomizzati di fase III in pazienti selezionati

Studio	Trattamento	RR (%)	P	PFS (mesi)	P	OS (mesi)	P
IPASS ⁵⁵	Gefitinib	43.0	<0.001	5.7	<0.001	18.6	NR
	CP	32.3		5.8		17.3	
First-Signal ⁵⁶	Gefitinib	53.3	0.15	6.1	0.044	21.3	0.42
	CG	45.3		6.6		23.3	
WJTOG ⁵⁷	Gefitinib	62.1	<0.0001	9.2	<0.0001	NR	NR
	CD	32.2		6.3			
NEJ002 ⁵⁸	Gefitinib	73.7	<0.001	10.4	<0.001	30.5	0.31
	CP	30.7		5.4		23.6	

Abbreviazioni: CP: carboplatin più paclitaxel; CG: cisplatino più gemcitabina; CD: cisplatino più docetaxel; RR: percentuale di risposte; PFS: sopravvivenza libera da progressione; OS: sopravvivenza globale; NR: non riportato

Negli ultimi anni, in considerazione della disponibilità di numerosi differenti regimi chemioterapici equivalenti in termini di efficacia, e dell'introduzione di farmaci biologici, un possibile approccio per migliorare i risultati del trattamento chemioterapico nel NSCLC avanzato potrebbe consistere nell'individuazione di parametri predittivi di attività, efficacia e tossicità che consentano di individualizzare il trattamento, scegliendo il miglior schema possibile per il singolo paziente.

2.4 Farmacogenetica

La farmacogenetica è la disciplina che studia il ruolo delle variazioni interindividuali nella sequenza del DNA in relazione alla risposta o agli effetti avversi dei farmaci (60); il termine “farmacogenetica” fu coniato nel 1953, ed evidenze di una base ereditaria per la risposta ai farmaci sono presenti fin dai primi anni '50, quando fu dimostrata la correlazione tra le crisi emolitiche indotte da antimalarici e il deficit di G6PD in pazienti affetti da favismo.

La variabilità genetica ha un'importanza fondamentale nella pratica clinica, poiché potrebbe essere alla base di due principali problemi della terapia farmacologica: il mancato verificarsi dell'effetto atteso in alcuni pazienti e la comparsa di gravi e inattesi fenomeni di tossicità in altri (61). Grazie alla farmacogenetica è, quindi, possibile effettuare un percorso a ritroso per risalire dal fenotipo clinico al genotipo e da questo poi prevedere i comportamenti dei singoli pazienti dopo esposizione al farmaco.

Più di recente, i progressi nel sequenziamento del genoma umano (62) e nel campo della bioinformatica hanno fornito una serie maggiore di dati, il che ha portato allo sviluppo della “farmacogenomica”, la cui definizione si applica quando, per identificare variazioni genetiche che governano la risposta ai farmaci, vengono utilizzati approcci che riguardano l'intero genoma e non solo 1-2 geni di interesse.

Prima di condurre studi di farmacogenetica e farmacogenomica, è importante determinare quali variazioni genetiche è più probabile che abbiano un impatto significativo sul fenotipo di interesse; in generale, sono disponibile due approcci: l'approccio del “gene-

candidato” e l’approccio “*genome-wide*”. Nel primo caso, l’ipotesi è che variazioni genetiche in geni che occupano un ruolo importante nella farmacocinetica o nella farmacodinamica di un farmaco potrebbero influenzarne l’efficacia e/o la tossicità. Nel secondo caso, invece, si conferisce uguale importanza a tutti i geni presenti nel genoma: si tratta di un approccio “generatore di ipotesi” e può essere utilizzato quando si hanno poche informazioni circa la relazione gene-farmaco.

La farmacogenetica e la farmacogenomica trovano vasta applicazione nel campo della terapia antineoplastica, dove, a causa del basso indice terapeutico dei farmaci, vi sono esigenze di rendere tale terapia sempre più specifica per ridurre la tossicità ed aumentarne l’efficacia; inoltre molti sono profarmaci, attivati da sistemi enzimatici polimorfi; infine, anche gli enzimi coinvolti nella detossificazione di queste sostanze sono contraddistinti da un grado, talvolta spiccato, di variabilità funzionale.

Attualmente, la dose di farmaco chemioterapico da somministrare viene definita solitamente in base a parametri morfologici del paziente, come la superficie corporea; al contrario, effettuando un’iniziale genotipizzazione degli enzimi implicati nel metabolismo dei farmaci, potrebbe essere possibile un adattamento della terapia alle specifiche caratteristiche del singolo paziente. Contemporaneamente, la disponibilità dell’intera sequenza del genoma umano potrebbe costituire il presupposto per identificare nuovi marcatori di malattia e per individuare tutte quelle combinazioni di alterazioni molecolari che caratterizzano in modo specifico ciascun tumore.

Tutto ciò comporta dei vantaggi non solo nella clinica, ma anche nel campo della farmacoeconomia: oggi, molto più che nel passato, si sta valorizzando anche dal punto di vista economico l'importanza della prevenzione e dell'impiego di terapie sempre più mirate, poiché le nuove tecnologie e le nuove cure hanno un costo sempre maggiore, che, soprattutto in alcuni Paesi, potrebbe limitare l'accesso dei pazienti alle cure oncologiche.

2.4.1 Polimorfismi del singolo nucleotide (SNPs)

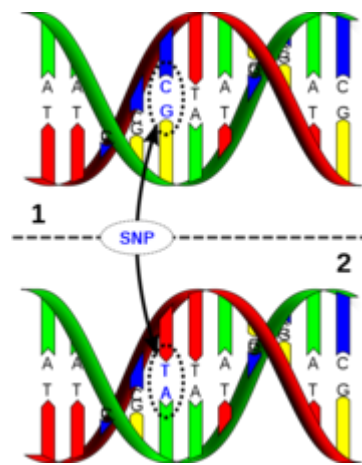
Si parla di polimorfismo genico quando esistono, nella popolazione normale, geni mutati o variati con una frequenza superiore all'1% (63) mentre, al di sopra di tale soglia, si è soliti parlare di "mutazione". I polimorfismi del singolo nucleotide (*Single Nucleotide Polymorphisms* o SNPs) consistono in variazioni della sequenza del DNA che coinvolgono una sola base nucleotidica (Adenina, Timina, Citosina o Guanina) e possono presentarsi all'interno di una sequenza codificante di un gene, all'interno di una regione intronica o in una regione intergenica (Figura 4). Uno SNP che genera in tutte le sue forme lo stesso peptide è detto "sinonimo" (*synonymous*), in caso contrario è detto "non-sinonimo" (*non-synonymous*). E' importante notare che possono esistere variazioni notevoli tra le popolazioni umane, ossia, uno SNP molto comune in un determinato gruppo etnico può essere, invece, molto raro in un'altra popolazione.

Alcuni SNPs non sembrano dare effetti, altri invece influenzano l'espressione e la funzione delle proteine, risultando in fenotipi che predispongono l'individuo a sviluppare determinate patologie o che condizionano la risposta al trattamento farmacologico; ad esempio,

sono noti polimorfismi per geni che codificano per i meccanismi di trasporto, per i bersagli molecolari e per gli enzimi che metabolizzano i farmaci.

Per tale motivo gli SNPs possono avere una grande importanza anche nello sviluppo di nuovi farmaci e nella diagnostica, in quanto consentono di conoscere l'effetto di un determinato farmaco su un soggetto ancor prima della somministrazione, attraverso uno *screening* degli SNPs presenti nel gene responsabile della metabolizzazione del farmaco stesso: queste sono le basi della farmacogenomica.

Figura 4. Esempio di Polimorfismo del Singolo Nucleotide (SNP).



I prodotti genici possono essere direttamente o indirettamente coinvolti nell'attività dei farmaci antineoplastici. Esempi della diretta correlazione tra prodotto genico, che costituisce il bersaglio farmacologico, e l'agente chemioterapico comprendono, ad esempio, le topoisomerasi per le camptotecine e le antracicline (64), oppure la ribonucleotide reductasi per la gemcitabina (65) o ancora la timidilato

sintetasi per il 5-fluorouracile (66). Poiché le modificazioni delle normali attività di tali enzimi possono influenzare la chemiosensibilità e la resistenza ai farmaci, la loro caratterizzazione genotipica potrebbe sempre più essere considerata nella pianificazione di un trattamento farmacologico al fine di ottenere la maggiore efficacia possibile.

Altri prodotti genici sono, invece, indirettamente coinvolti nell'attività dei farmaci antineoplastici e nella conseguente efficacia e tossicità. Esempi a tale riguardo possono essere le proteine responsabili del trasporto intracellulare degli agenti antitumorali (67), così come i sistemi implicati nella riparazione delle lesioni causate dai citotossici a livello del DNA.

Negli ultimi anni diversi studi hanno indicato che l'analisi dell'espressione genica può avere un ruolo predittivo di risposta alla terapia con farmaci antitumorali e può contribuire ad individuare sottopopolazioni di pazienti che potrebbero beneficiare di uno specifico trattamento rispetto ad un altro. Questo filone di ricerca rafforza sempre di più il concetto di "personalizzazione" del trattamento.

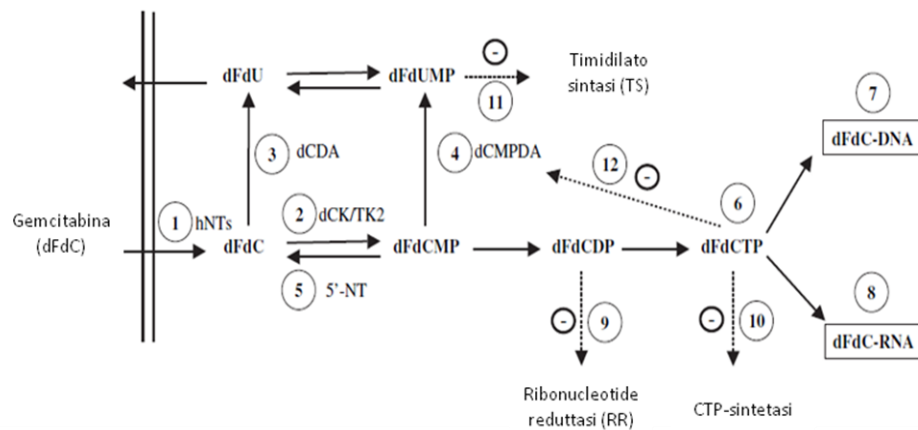
Nel carcinoma del polmone un approccio di tipo farmacogenetico è stato valutato in vari lavori (68); recenti studi, che verranno di seguito riportati, sono stati condotti in particolare su pazienti affetti da NCSLC trattati con platino e gemcitabina, uno dei regimi più utilizzati soprattutto in Europa, valutando l'espressione genica e la presenza di mutazioni a livello del singolo nucleotide in relazione alla risposta a tali farmaci. I dati ottenuti da questi studi offrono incoraggianti informazioni per quanto riguarda la possibilità di

predire, in pazienti affetti da NSCLC, la suscettibilità a tale schema terapeutico.

2.4.2 Meccanismo d'azione e farmacogenetica della gemcitabina

La gemcitabina (2',2'-difluoro 2'-deossicitidina, dFdC), antimetabolita citotossico, il cui meccanismo d'azione consiste principalmente nell'inibizione della sintesi del DNA (Figura 5), è un analogo della citidina, che ha mostrato attività in un'ampia varietà di neoplasie solide, inclusi tumore del pancreas (69), del polmone non a piccole cellule (24), della mammella, della vescica e dell'ovaio; il suo utilizzo è esteso anche alle neoplasie ematologiche, nella recidiva del linfoma non-Hodgkin e nella leucemia.

Figura 5. Meccanismo d'azione della gemcitabina.



Studi recenti hanno mostrato come l'attività trascrizionale ed i polimorfismi di geni che codificano per proteine coinvolte nel meccanismo d'azione della gemcitabina e nel riparo del DNA potrebbero essere usati per individuare i pazienti che potrebbero

trarre maggior beneficio da un trattamento chemioterapico con gemcitabina nel NSCLC (70) e per “personalizzare” la terapia in pazienti affetti da adenocarcinoma del pancreas in fase adiuvante o metastatica (71). Inoltre, ampi *trials* clinici di chemioterapia adiuvante in pazienti affetti da NSCLC resecati (72) e studi recenti di terapia personalizzata nel NSCLC avanzato suggeriscono che la valutazione dell’espressione dell’mRNA di ERCC1 e BRCA1 potrebbero aiutare nel selezionare i pazienti suscettibili di un trattamento con cisplatino e gemcitabina (73). Tuttavia, la maggior parte dei risultati che hanno valutato il ruolo predittivo di *markers* molecolari sono stati ottenuti in studi retrospettivi o di piccole dimensioni, e il passo successivo nella scelta del trattamento con gemcitabina è legato alla validazione di questi determinanti molecolari in *trials* prospettici.

A causa della sua natura idrofila, la gemcitabina non attraversa la membrana citoplasmatica per diffusione, ma è trasportata all’interno delle cellule per mezzo di 5 specifiche proteine, definite “trasportatori nucleosidici”, che si dividono in due famiglie a seconda del tipo di trasporto da esse mediato: 2 trasportatori nucleosidici equilibrativi (hENTs: hENT1 o SLC29A1 e hENT2 o SLC29A2), che permettono un passaggio bidirezionale guidato dal gradiente di concentrazione (diffusione facilitata), e 3 trasportatori nucleosidici concentrativi (hCNTs: hCNT1 o SLC28A1, hCNT2 o SLC28A2 e hCNT3 o SLC28A3), per mezzo dei quali, invece, si realizza un processo unidirezionale che sfrutta il gradiente elettrochimico del sodio per introdurre all’interno della cellule i nucleosidi contro il loro gradiente di concentrazione (trasporto attivo secondario). La distribuzione tissutale e l’espressione da

parte delle cellule tumorali di questi trasportatori non è ancora pienamente definita, ma è noto come gli hENTs siano presenti nella maggior parte dei differenti tipi cellulari, mentre sembra che gli hCNTs siano espressi solo da tessuti specializzati quali epitelio intestinale, epatico, renale, plessi corioidei e alcune linee cellulari tumorali. Spratlin et al (74) hanno effettuato uno studio in immunohistochimica di tessuto tumorale incluso in paraffina proveniente da 21 pazienti affetti da neoplasia del pancreas trattati con gemcitabina, riportando un vantaggio in sopravvivenza in pazienti che esprimevano hENT1 rispetto ai pazienti con bassa o nulla espressione (sopravvivenza mediana 13 mesi verso 4 mesi; $P=0.01$). Un'analisi in PCR di tessuto tumorale microdissezionato proveniente da 83 pazienti affetti da tumore del pancreas ha confermato un vantaggio in sopravvivenza in pazienti con aumentata espressione di hENT1 rispetto a quelli con ridotta espressione del trasportatore in esame (sopravvivenza mediana 25.7 versus 8.5 mesi; $P<0.001$) (71).

Il primo studio che ha identificato e validato polimorfismi del singolo nucleotide in geni coinvolti nel metabolismo della gemcitabina è stato quello pubblicato nel 2004 da Fukunaga (75). Tra i vari polimorfismi, 5 sono stati individuati a livello dei geni codificanti per i trasportatori nucleosidici: due di questi, localizzati nel codone 1383 del gene per hCNT1 e nel codone 778 di hENT1, non codificano per una sostituzione amminoacidica, mentre le due varianti nei codoni 1543 di hCNT1 e 283 di hCNT2 e nel codone 1576 di hCNT1 determinano rispettivamente le seguenti sostituzioni: arginina/cisteina, arginina/serina e asparagina/acido aspartico. In questo studio una particolare importanza è stata

attribuita allo SNP nel codone 1543 di hCNT2, in quanto la sostituzione aminoacidica sembra determinare un cambiamento conformazionale della doppia elica capace di influenzare l'attività del trasportatore di membrana.

Un ulteriore studio ha dimostrato che soggetti con aplotipo CGG/CGC basato su tre SNPs nella regione promotore di hENT1 (SLC29A1-1345C>G, -1050G>A e -706G>C) presentavano un'espressione 1.37 volte più elevata del trascritto di ENT1 rispetto a quelli con l'aplotipo comune CGG/CGG, suggerendo che varianti della regione promotore di hENT1 potrebbero influenzare l'espressione del gene e alterare la sensibilità alla gemcitabina (76).

Dopo aver oltrepassato la membrana cellulare mediante il sistema di trasporto dei nucleosidi, la gemcitabina è fosforilata dapprima nella 2',2'-difluoro-2'-deossicitidina monofosfato (dFdCMP) e, successivamente nella 2',2'-difluoro-2'-deossicitidina difosfato (dFdCDP) e nella 2',2'-difluoro-2'-deossicitidina trifosfato (dFdCTP). La prima fosforilazione, essenziale per l'attività della gemcitabina, avviene ad opera della deossicitidina chinasi (deossicitidina 5'-fosfotrasferasi, dCK), la cui attività è regolata da un meccanismo a feedback negativo da parte della deossicitidina trifosfato (dCTP).

La dCK è un enzima limitante nella biotrasformazione della gemcitabina, e una chiara correlazione tra l'espressione e l'attività di tale enzima prima del trattamento e la sensibilità alla gemcitabina è stata mostrata in molti modelli xenografts di tumore del polmone e del pancreas (77), con risultati, tuttavia, contrastanti nei *trials* clinici. Pazienti affetti da neoplasia pancreaticca e trattati con gemcitabina, il cui tumore era caratterizzato da una bassa

espressione di dCK in immunohistochimica, hanno riportato una ridotta PFS ed una OS più breve (sopravvivenza mediana 14.6 mesi versus 21.7 mesi; $p < 0.009$) (78); al contrario, sia l'mRNA che i livelli di proteina della dCK non sono stati correlati con l'*outcome* clinico in pazienti affetti da NSCLC trattati con gemcitabina (79). Nello studio di Fukunaga sopra citato (75) sono stati analizzati 2 SNPs di dCK, che tuttavia risultano silenti, non determinando sostituzioni aminoacidiche, e che non sembrano causare modifiche dell'espressione e dell'attività di questo enzima.

Tuttavia, uno studio recente (80) ha identificato varianti genetiche che includevano lo SNP $35780C > T$, associato con una più bassa espressione dell'enzima, che potrebbe influenzare l'attività della gemcitabina; dal momento che l'espressione della dCK era significativamente correlata con l'età dei pazienti, la metilazione età-correlata del gene dCK, così come i meccanismi post-trascrizionali coinvolti nello *splicing* alternativo del trascritto della dCK, potrebbe spiegare le differenze osservate nei livelli della proteina e stimolare ulteriori studi in campioni tumorali.

Il principale metabolita citotossico della gemcitabina è la dFdCTP, che, inserita nella catena del DNA, determina, dopo l'aggiunta di un altro deossinucleotide, una modificazione conformazionale con la costituzione di un blocco sterico che inibisce la DNA polimerasi. Questa modalità di inibizione della polimerasi, denominata "terminazione mascherata della sintesi del DNA" per la presenza della dFdCTP in posizione non-terminale, ostacola il riconoscimento e la riparazione del danno al DNA da parte della esonucleasi.

Si verifica, quindi, l'arresto nella sintesi della catena del DNA e il blocco del ciclo riproduttivo e conseguentemente la morte della cellula a causa dell'impossibilità della riparazione. Allo stesso modo la dFdCTP è incorporata nell'RNA e ne inibisce la sintesi.

L'attività citotossica della gemcitabina è, inoltre, incrementata dall'azione dei suoi metaboliti mediante due meccanismi di autopotenziamento: il primo di questi è l'inibizione della attività della ribonucleotide reduttasi (RR), enzima fondamentale per la sintesi dei deossiribonucleotidi, da parte della dFdCDP, che determina una diminuzione della concentrazione dei deossiribonucleotidi con conseguente potenziamento della citotossicità della gemcitabina sia per aumento della fosforilazione, visto che una minore concentrazione della dCTP (deossicitidina trifosfato) riduce il meccanismo di inibizione a feedback sulla deossicitidina chinasi, sia per la maggiore incorporazione della dFdCTP nel DNA, facilitata dalle ridotte concentrazioni dei substrati fisiologici.

L'aumento di espressione della ribonucleotide reduttasi determina la presenza di meccanismi di resistenza alla gemcitabina poiché l'aumento del *pool* dei deossinucleotidi inibisce competitivamente l'incorporazione della dFdCTP nel DNA e riduce, con meccanismo a *feedback* inibitorio, l'attività della deossicitidina chinasi, come evidenziato da Goan (81).

Il secondo meccanismo di potenziamento è l'inibizione della attività della deossicitidina monofosfato deaminasi, enzima implicato nel metabolismo della dFdCMP nel derivato inattivo 2',2'-diflorodeossiuridina monofosfato (dFdUMP), da parte della

dFdCTP, con conseguente ridotta eliminazione del farmaco e potenziamento della sua attività.

La RR è costituita da due subunità, la ribonucleotide reduttasi M1 (RRM1) e la ribonucleotide reduttasi M2 (RRM2). Studi *in vitro* e *in vivo* hanno evidenziato una correlazione tra i livelli di espressione di RRM1 e la risposta alla gemcitabina, nel senso che una maggior espressione correla con la resistenza al farmaco (70, 82). E' stato dimostrato che l'espressione della subunità M1 di questo enzima è un indicatore prognostico nel NSCLC (83) e rappresenta un fattore predittivo del trattamento con gemcitabina (84,85). Nel 2004 Bepler et al. hanno evidenziato un'associazione tra l' elevata espressione di RRM1 ed un favorevole sopravvivenza in pazienti affetti da NSCLC (83). Tale dato è stato confermato recentemente su 187 pazienti affetti da NSCLC in stadio I sottoposti ad intervento chirurgico (86): i pazienti con elevata espressione del marcatore avevano una PFS superiore ai 120 mesi verso 54.5 mesi dei pazienti con bassa espressione (HR 0.46; p=0.004) ed una OS > di 120 mesi verso 60.2 mesi per quelli con bassa espressione del marcatore (HR 0.61; p=0.02). L'iperespressione della proteina RRM1 è stata, però, associata anche a trattamenti contenenti gemcitabina nel NSCLC in stadio avanzato di malattia (84, 85). Rosell et al (85), così come un gruppo italiano (84), hanno valutato retrospettivamente l'espressione di RRM1, insieme con quella dell'*Excision Repair Cross-Complementation group 1* (ERCC1), correlandola con l'*outcome* di pazienti che avevano ricevuto platino e gemcitabina: in entrambi i casi, i pazienti con bassi livelli di RRM1 mostravano una sopravvivenza migliore rispetto ai pazienti con alta espressione. Si può, pertanto, concludere che

l'overespressione di RRM1 rappresenta un fattore prognostico positivo in pazienti con NSCLC resecato ed, allo stesso tempo, un *marker* di chemioresistenza e cattiva prognosi nella malattia avanzata trattata con chemioterapia.

Per quanto riguarda il ruolo di enzimi coinvolti nella degradazione della gemcitabina, l'interesse maggiore è rivolto nei confronti della citidina deaminasi (CDA). L'enzima CDA umano, di cui è stata registrata un'elevata attività nel fegato, nella milza e nella mucosa intestinale, è composto da quattro subunità, ciascuna di 16 Kda; il gene umano, localizzato sul cromosoma 1, ha una dimensione di circa 31 Kb ed è formato da quattro esoni. La CDA, oltre ad essere l'enzima responsabile della deaminazione di citidina e deossicitidina rispettivamente ad uridina e deossiuridina, riveste una particolare importanza dal punto di vista farmacologico nell'ambito della terapia di neoplasie solide ed ematologiche. Infatti, la CDA catalizza la principale reazione del catabolismo della gemcitabina e della citarabina, determinandone l'inattivazione, e diversi studi hanno dimostrato che la presenza di un incremento dell'attività della CDA causa la comparsa di fenomeni di resistenza all'azione di tali farmaci (87). L'enzima CDA è stato oggetto di recenti studi sui polimorfismi e su come questi possano influenzare l'attività farmacologica della gemcitabina.

Due SNPs non-sinonimi, A79C (Lys27Gln) e G208A (Ala70Thr) sono stati identificati nella regione codificante del CDA nell'uomo (75, 88-89); significative variazioni interetniche di questi SNPs sono state individuate nel DNA in 190 pazienti Europei ed Africani nello studio già citato di Fukunaga et al del 2004 (75); la frequenza allelica di CDA 208G>A era del 12.5% negli Africani e dello 0%

negli Europei, confrontata con il 3.7% riportata nella popolazione Giapponese (89), mentre il polimorfismo CDA 79A>C era presente nel 3.5% della popolazione Africana e del 36.5% negli Europei.

L'importanza dei polimorfismi di CDA per l'attività degli analoghi nucleosidici è stata studiata anche in 52 pazienti affetti da leucemia o linfoma da Yue (88). In questo studio sono stati analizzati tre polimorfismi dell'enzima CDA: G208A, C435T ed A79C, che presentano una frequenza allelica pari rispettivamente al 4,3%, 70,1% e 21,1%. Lo SNP sul codone 435 non codifica per una sostituzione amminoacidica, mentre il polimorfismo in posizione 79 del gene di CDA determina una sostituzione da lisina a glutamina a livello dell'aminoacido in posizione 27 (Lys27Gln). I soggetti con la mutazione del codone 208 sono risultati potenzialmente più sensibili all'analogo nucleosidico ara-C.

Recentemente un gruppo di ricercatori giapponesi ha analizzato polimorfismi del gene di CDA in 256 pazienti oncologici trattati con gemcitabina (89) e le frequenze alleliche di CDA 79A>C e 208G>A sono risultate rispettivamente del 20.7 e del 3.7%; in questo studio l'aplotipo *wild type* è stato definito come gruppo *1, mentre gli aplotipi portatori dei polimorfismi 79A>C e 208G>A sono stati indicati come gruppi *2 e *3, rispettivamente. I dati hanno chiaramente dimostrato una ridotta *clearance* della gemcitabina e dell'attività del CDA nei pazienti con aplotipo *3; pur in assenza di una differenza statisticamente significativa, i pazienti con aplotipo *3, portatori del polimorfismo 208G>A, presentavano un'aumentata incidenza di neutropenia severa quando ricevevano trattamento con regimi contenenti gemcitabina in associazione a platino o 5-fluorouracile.

Nello studio di Yonemori et al (90) un paziente con SNP CDA A208A ha sviluppato mielosoppressione e tossicità gastroenterica di grado severo dopo trattamento con gemcitabina in combinazione con cisplatino, per cui estrema cautela va osservata quando pazienti da trattare con gemcitabina sono portatori dell'allele *3, soprattutto se omozigoti.

Nello studio giapponese di Sugiyama del 2007 (89) nessun impatto funzionale sulla farmacocinetica della gemcitabina, invece, è stato riconosciuto per lo SNP A79C. I risultati di questo studio confermano il ruolo dei polimorfismi studiati, sebbene la differenza tra i pazienti arruolati per tipo di patologia tumorale e trattamento chemioterapico ricevuto (con sola gemcitabina oppure con derivati del platino, fluorouracile, ecc...) e l'esclusiva etnia giapponese della popolazione non consentono conclusioni cliniche definitive.

Nello studio pubblicato da Tibaldi et al su *Clinical Cancer Research* nel 2008 (91) su 65 pazienti affetti da NSCLC trattati con gemcitabina e cisplatino, il genotipo *wild type* CDA A79A si è dimostrato correlato con beneficio clinico, OS e TTP, ma anche con neutropenia e trombocitemia \geq grado 3, probabilmente a causa di una più bassa attività enzimatica identificata nei pazienti con genotipo CDA Lys27Lys.

Uno studio condotto su 53 pazienti Asiatici ha riportato un'associazione tra il polimorfismo CDA C435C e la risposta ed un tempo alla progressione più lungo dopo trattamento con carboplatino e gemcitabina (92), mentre un recente *report* su pazienti caucasici ha mostrato una correlazione tra il genotipo T435T ed una peggior risposta al trattamento con platino e gemcitabina, associata ad una maggiore incidenza di tossicità non

ematologica di grado severo (93). Al contrario, nel lavoro di Ciccolini et al del 2010 (94) nessuna relazione è stata identificata tra gli SNPs CDA *A79C* e *C435T* e la tossicità in tre coorti di pazienti affetti da neoplasie di diversa origine e trattati con gemcitabina da sola o in combinazione con altri farmaci, mentre i pazienti con ridotta attività del CDA hanno presentato una tossicità più precoce di grado severo correlata alla gemcitabina.

Nonostante le piccole dimensioni dei campioni degli studi esposti e le differenze nelle tecniche di analisi genetica, che potrebbero rendere difficile il confronto tra i risultati dei diversi lavori, le evidenze attuali indicano come una deregolazione del CDA possa avere un impatto sull'uso della gemcitabina, per cui l'analisi dell'attività e la genotipizzazione di questo enzima potrebbero essere considerati una strategia da attuare per ottimizzare l'efficacia e la sicurezza del trattamento con gemcitabina.

Le conoscenze farmacogenetiche e farmacogenomiche in continua evoluzione racchiudono in sé notevoli potenzialità: identificando i geni coinvolti nella risposta ai chemioterapici sarà possibile predisporre delle mappe di chemiosensibilità/chemioresistenza per ciascun paziente, nell'ottica di offrire terapie antitumorali basate sulle caratteristiche genetiche del paziente e della sua neoplasia.

3. Pazienti e Metodi

3.1 Obiettivi dello studio

In seguito a dati derivanti da precedenti pubblicazioni (91, 93-94), sono stati selezionati i polimorfismi A79C e C435T dell'enzima citidina deaminasi ed è stata effettuata una valutazione dell'attività del CDA.

I differenti polimorfismi e l'attività della citidina deaminasi sono stati correlati con la risposta al trattamento chemioterapico, con il tempo alla progressione della malattia (*time to progression*, TTP) dopo terapia, con la sopravvivenza globale dei pazienti e con la tossicità legata a regimi chemioterapici a base di platino e gemcitabina.

L'obiettivo primario dello studio è stato quello di analizzare i marcatori molecolari detti e correlarli con l'*outcome* clinico dei pazienti; la valutazione della correlazione con la percentuale di risposte, il *clinical benefit* e la tossicità derivante dal trattamento sono stati considerati obiettivi secondari.

3.2 Selezione dei pazienti

Questo studio è stato condotto presso l' Oncologia Medica dell'Ospedale Civile di Livorno e presso l'Oncologia Medica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma.

I criteri di inclusione necessari per l' arruolamento dei pazienti nello studio sono stati i seguenti:

- Età >18 anni
- Aspettativa di vita > 3 mesi

- Diagnosi istologica o citologica di NSCLC in stadio IIIB o IV, secondo la classificazione clinica TNM (appendice I)
- Performance status del paziente valutato con i criteri ECOG (appendice II) compreso tra 0 e 2
- Malattia misurabile secondo i criteri RECIST (*Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*) (appendice III) (95)
- Adeguata funzionalità midollare (leucociti $\geq 4.0 \times 10^9/L$, piastrine $\geq 100 \times 10^9/L$), epatica (bilirubinemia ≤ 1.5 mg/dL, alanina-amino-transferasi e aspartato-amino-transferasi ≤ 3 volte il limite superiore della norma) e renale (creatininemia ≤ 1.5 mg/dL)
- Disponibilità ad eseguire un prelievo ematico
- Consenso informato scritto.

I criteri di esclusione sono stati, invece, i seguenti:

- Infezioni attive
- Metastasi cerebrali sintomatiche
- Impossibilità logistica ad aderire al protocollo
- Stato di gravidanza
- Ipersensibilità nota ai farmaci in studio
- Malattie sistemiche gravi concomitanti incompatibili con lo studio (infarto miocardico recente, angina instabile, ecc...),
- Anamnesi oncologica positiva per altra neoplasia
- Qualsiasi controindicazione medica al trattamento

Questo studio è stato approvato dai locali Comitati Etici Ospedalieri ed un consenso informato scritto relativo alla partecipazione allo studio e all'effettuazione del prelievo di un campione ematico sono stati ottenuti prima dell'inizio del trattamento.

3.3 Trattamento

I trattamenti chemioterapici utilizzati nello studio erano rappresentati da:

- Cisplatino 80 mg/m^2 al giorno 1, in infusione endovenosa di 60 minuti e associato a idratazione con 2 litri di soluzione fisiologica addizionata di 20 mEq di cloruro di potassio e 8 mEq di solfato di magnesio e Gemcitabina 1200 mg/m^2 ai giorni 1 e 8, diluita in 250 ml di soluzione fisiologica, in infusione endovenosa di 30 minuti, oppure
- Carboplatino con un'area sotto la curva (AUC) di 5 al giorno 1 in infusione endovenosa di 60 minuti, diluita in 250 ml di soluzione fisiologica e Gemcitabina 1000 mg/m^2 ai giorni 1 e 8, diluita in 250 ml di soluzione fisiologica, in infusione endovenosa di 30 minuti.

Entrambi i trattamenti sono stati ripetuti ogni 21 giorni e proseguiti fino a completamento dei 6 cicli di terapia oppure fino a progressione di malattia o tossicità inaccettabile o rifiuto da parte del paziente a proseguire lo studio.

Prima della somministrazione del cisplatino e del carboplatino, tutti i pazienti sono stati sottoposti a una profilassi antiemetica con steroidi e antagonisti del recettore 3 della serotonina (es. granisetron), che solitamente è stata proseguita per i due giorni dopo l'infusione; al giorno 8 i pazienti hanno ricevuto una profilassi con sola metoclopramide.

I pazienti potevano ricevere la somministrazione del giorno 1 del trattamento chemioterapico se la conta dei leucociti, dei neutrofili e delle piastrine era superiore a $3.5 \times 10^9/\text{L}$, $1.5 \times 10^9/\text{L}$ and $100 \times 10^9/\text{L}$, rispettivamente; in caso contrario, la somministrazione del trattamento veniva rinviata di una settimana o fino al recupero dei

valori ematici. Un rinvio del trattamento superiore a tre settimane comportava l'uscita del paziente dallo studio.

Sulla base di eventuali tossicità ematologiche e non ematologiche, la dose di gemcitabina era modificata al giorno 8 del trattamento come segue:

- se la conta dei neutrofili era $>1.5 \times 10^9/L$ e la conta delle piastrine era $>100 \times 10^9/L$, la chemioterapia era somministrata a dose piena;
- in caso di conta dei neutrofili compresa tra 1.0 e $1.49 \times 10^9/L$ o di piastrine compresa tra 75 e $99 \times 10^9/L$, la dose era ridotta al 75%;
- in caso di valori dei neutrofili compresi tra 0.5 e $0.9 \times 10^9/L$ o delle piastrine tra 50 e $74.9 \times 10^9/L$, la dose era ridotta al 50%;
- per conta dei neutrofili $<0.5 \times 10^9/L$ o delle piastrine $<50 \times 10^9/L$, il trattamento veniva omissa.

In caso di tossicità non ematologica di grado 2 (ad eccezione per l'alopecia), la chemioterapia veniva omissa fino alla risoluzione dell'evento, e somministrata nel ciclo successivo ad una dose ridotta del 25-50%.

In caso di tossicità neurologica di grado 2 o non-ematologica di grado 3-4, il paziente veniva escluso dallo studio.

3.4 Valutazioni in corso di studio

La valutazione dei pazienti prima dell'inizio del trattamento è stata eseguita mediante accurata raccolta dell'anamnesi ed esame obiettivo; i pazienti hanno, inoltre, eseguito esami ematochimici completi e sono stati sottoposti a TC torace e addome in associazione ad altri esami strumentali ritenuti necessari per definire l'esatta estensione della malattia nelle 4 settimane precedenti l'arruolamento. La risposta al trattamento è stata

effettuata tramite TC torace e addome ogni 3 cicli di chemioterapia ed è stata valutata secondo i criteri RECIST (appendice III) (95), riportando, per ogni paziente, la migliore risposta ottenuta.

Dopo il completamento della terapia, i pazienti sono stati sottoposti ogni 2 mesi a valutazione dello stato di salute e del quadro di malattia attraverso esame fisico, esami ematochimici completi ed valutazione radiologica, fino all'evidenza di progressione di malattia (*progression disease*, PD).

Una valutazione ematochimica comprendente esame emocromocitometrico, creatininemia e bilirubinemia è stata eseguita prima di ogni somministrazione di chemioterapia (ai giorni 1 e 8 di ogni ciclo), così come la registrazione di eventuali tossicità di tipo ematologico e non ematologico, riportando in ogni ciclo per ciascun paziente la peggiore tossicità, la cui valutazione è stata effettuata secondo i criteri NCI-CTC (*National Cancer Institute, Common Terminology Criteria*) versione 3.0 (appendice IV) (96).

La valutazione dei polimorfismi è stata eseguita su un campione di sangue periferico prelevato ai pazienti durante un accesso per chemioterapia; l'analisi è stata fatta senza conoscere i risultati di attività ed efficacia della terapia nel singolo paziente da un gruppo di ricercatori non direttamente coinvolto nella gestione clinica dei pazienti.

3.5 Metodologia di laboratorio

3.5.1 Estrazione del DNA

Ai 126 pazienti inclusi nello studio in base ai criteri sopra riportati è stato effettuato un singolo prelievo (5 ml) venoso periferico preferibilmente prima dell'inizio della terapia antitumorale. I campioni di sangue così ottenuti sono stati conservati a -20° C prima di procedere all'estrazione del DNA.

Precedenti studi hanno dimostrato l'assenza di significative differenze nei polimorfismi analizzati in tessuti tumorali e normali (97); tuttavia, dal momento che aberrazioni cromosomiche nelle cellule tumorali potrebbero comportare alterazioni genotipiche, è stata effettuata una valutazione aggiuntiva di polimorfismi del *CDA* in 38 campioni di DNA germinale e tumorale (tessuto tumorale incluso in paraffina), mostrando identici genotipi interindividuali. Per tutti i pazienti arruolati nello studio, il genotipo è stato valutato nel DNA estratto da campione ematico.

L'estrazione del DNA è stata eseguita mediante il mini-DNA kit (Qiagen, Germany); tale metodica ha inizio con la preparazione di 20 µl di QIAGEN Proteasi (o Proteasi K) sul fondo di una provetta da microcentrifuga da 1.5 ml, cui segue l'aggiunta di 200 µl di sangue intero. Nel caso in cui il volume del campione ematico sia inferiore a 200 µl è necessario aggiungere un appropriato volume di tampone fosfato, phosphate-buffered saline (PBS). Successivamente, nella provetta devono essere addizionati 200 µl di tampone di lisi (Buffer AL) ed è necessario garantire la formazione di una soluzione omogenea agitando con vortex per 15 secondi. A questo punto il campione deve essere incubato a 56° C per 10

minuti, al fine di assicurare la massima resa di DNA. Terminata l'incubazione, per recuperare la quantità di miscela evaporata e depositatasi sulle pareti della provetta è necessario centrifugare brevemente il campione. La metodica procede con l'aggiunta di 200 µl di etanolo al 100% e con l'agitazione del campione mediante vortex per 15 secondi; quindi, al fine di rimuovere le gocce presenti sulle pareti della provetta si sottopone il campione ad una breve centrifugata. La miscela così ottenuta viene trasferita all'interno dell'apposita provetta contenente la colonna QIAamp spin column, ponendo attenzione alla membrana presente sul fondo della colonna; si centrifuga, quindi, ad 8000 rpm per 1 minuto. La resina contenuta nella colonna trattiene il DNA mentre il filtrato si deposita in una provetta di raccolta che deve essere scartata. In seguito la QIAamp spin column viene posizionata in un'altra provetta di raccolta e devono essere aggiunti 500 µl del tampone di lavaggio AW1. Si procede centrifugando a 8000 rpm per 1 minuto, scartando la provetta di raccolta contenete il filtrato e posizionando la colonna in un nuovo tubo. Si aggiungono, quindi, 500 µl del tampone di lavaggio AW2 e si centrifuga a 14000 rpm per 3 minuti scartando il filtrato. La QIAamp spin column viene collocata in una provetta da microcentrifuga da 1.5 ml e si aggiungono 200 µl di tampone di eluizione; si esegue poi un'incubazione a temperatura ambiente di 5 minuti ed infine si centrifuga ad 8000 rpm per 1 minuto. Al termine della centrifugata è possibile scartare la colonna e conservare l'eluato, contenente il DNA, a -20° C.

Per valutare la purezza e la quantità di DNA ottenuto, per ogni campione è stata misurata l'assorbanza mediante lo

spettrofotometro NanoDrop® 1000 Detector (NanoDrop Technologies, Wilmington, NC).

Le letture dell'assorbanza sono state effettuate alla lunghezza d'onda di 260 nm, lunghezza alla quale assorbono gli acidi nucleici, tenendo conto del fatto che un valore di assorbanza di 1 con un cammino di 1 cm corrisponde a 50 µg/ml di DNA a doppia elica ed a 40 µg/ml di DNA a singola elica. Misurando, inoltre, l'assorbanza ad una lunghezza d'onda di 280 nm (picco d'assorbanza delle proteine, principale contaminante degli estratti) ed effettuando il rapporto tra le rispettive assorbanze a 260 e 280 nm si può ottenere una stima della purezza del DNA; in genere è stato considerato soddisfacente un indice di purezza compreso tra 1.6 e 1.9.

3.5.2 Valutazione dei polimorfismi

La valutazione dei polimorfismi del singolo nucleotide (SNPs) dell'enzima CDA *A79C* e *C435T* è stata effettuata mediante un'analisi di PCR quantitativa utilizzando lo strumento ABI PRISM 7900HT sequence detection system (Applied Biosystems).

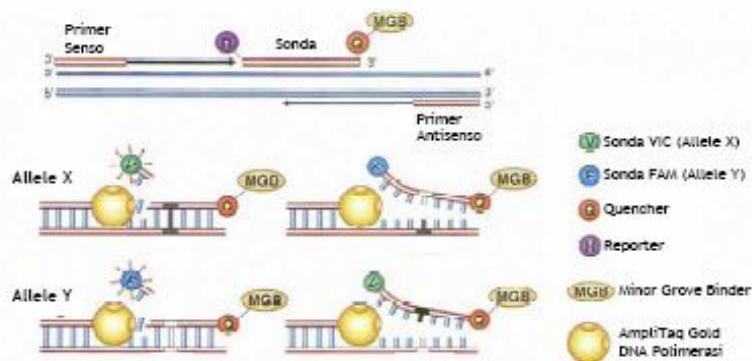
Mentre nella PCR classica, mediante valutazione con elettroforesi dei prodotti della reazione, generalmente visualizzabili dopo che la reazione ha raggiunto la fase di *plateau*, non è possibile effettuare una misurazione adeguata della quantità di DNA, la PCR quantitativa consente di valutare la fase lineare della reazione di amplificazione garantendo una migliore interpretazione dei risultati. Il parametro che viene misurato nella real-time PCR è l'aumento di fluorescenza: oltre ai due primers necessari per l'amplificazione, è presente, infatti, una sonda complementare al DNA da amplificare. La sequenza della sonda viene scelta in modo tale che possa

ibridizzarsi al DNA stampo all'interno della porzione amplificata. Questa sonda è marcata all'estremità 5' con un fluorocromo detto "reporter", ovvero una sostanza che, se eccitata con luce di una particolare lunghezza d'onda, emette fluorescenza; all'estremità 3', invece, la sonda porta un "quencher", un fluorocromo a bassa energia che, quando è vicino al "reporter", è in grado di inibirne la fluorescenza.

All'inizio della reazione, la sonda si ibridizza al DNA stampo ma nessuna fluorescenza può essere misurata in quanto il quencher assorbe l'emissione del fluoroforo. Col procedere della reazione di copiatura dello stampo la sonda viene gradualmente degradata nei singoli nucleotidi che la costituiscono per mezzo dell'attività esonucleasica 5'→3' della AmpliTaq Gold® DNA polimerasi, e ciò determina il progressivo allontanamento del quencher, che non trovandosi più sufficientemente vicino al fluoroforo, non ne assorbe l'emissione. Si assisterà, di conseguenza, ad un aumento della fluorescenza che sarà proporzionale al contenuto di DNA stampo presente nel campione; questo consente di trasformare la fluorescenza misurata durante l'amplificazione in una quantificazione dell'abbondanza del DNA stampo oggetto di analisi. Poiché diversi fluorofori sono disponibili con emissione di fluorescenza a lunghezze d'onde diverse fra loro, è possibile seguire l'amplificazione in tempo reale di diversi stampi direttamente nella stessa provetta. Questa possibilità è stata sfruttata nel presente lavoro: sono state disegnate con il programma File Builder v. 2.0 (Applied Biosystem) due sonde marcate con due diversi fluorofori (VIC e FAM), ciascuna specifica per uno dei due alleli dello SNP da analizzare. Al termine dei cicli di amplificazione la

discriminazione allelica viene effettuata mediante l'analisi dei dati con il software SDS v. 2.1 (Applied Biosystem) che è in grado di distinguere e quantificare il segnale di fluorescenza delle sonde VIC e FAM determinando il contenuto allelico presente in ciascun campione (Figura 6).

Figura 6. Discriminazione allelica.



Per lo studio dei polimorfismi, in ciascuna provetta sono stati posti 20 ng di DNA in 5.94 μ l di acqua DNasi e RNasi free, con 6.25 μ l di TaqMan Universal PCR Master Mix e 0.31 μ l di una miscela contenente i primers e le sonde specifiche.

La TaqMan Universal PCR Master Mix contiene, oltre alla polimerasi AmpliTaq Gold® DNA, una AmpErase uracil-N-glicosilasi (UNG), un pool di deossinucleotidi con deossiuridina trifosfato (dUTP), ed altri componenti del tampone enzimatico opportunamente ottimizzati. La presenza della AmpErase UNG permette di prevenire fenomeni di contaminazione e carry-over che potrebbero essere comuni a causa della ripetitività della reazione

polimerasica perché, durante un passaggio di incubazione a 50°C per 2 minuti, l'enzima determina la degradazione di eventuali prodotti di precedenti PCR che contengono dUTP. La successiva incubazione a 95°C per 10 minuti permette, quindi, da un lato di inattivare la UNG e dall'altro di innescare la reazione di PCR per mezzo dell'attivazione della polimerasi e della denaturazione del DNA presente nei campioni. Il contenuto delle provette è infatti posto mediante piastre da 96 pozzetti nello strumento AbiPrism 7900HT, che è in grado di riscaldare i campioni alle temperature programmate per ciascuna fase dei 40 cicli della reazione di PCR. In particolare, la fase di denaturazione è effettuata a 95°C per 15 secondi, mentre quella di appaiamento dei primers ed estensione è condotta a 60°C, per 1 minuto.

3.5.3 Disegno dei *primers*

Le coppie di *primers* e le sonde utilizzate per la genotipizzazione dei polimorfismi del CDA sono state disegnate sulla base delle sequenze geniche rese disponibili da GeneBank, utilizzando l'apposito software File Builder 2.0.

Il gene che codifica per la citidina deaminasi è localizzato sul cromosoma 1, nel segmento 1.p35-1.p36.2; a livello dell'esone 1 si trova il polimorfismo *A79C* che comporta un cambiamento nell'aminoacido codificato da lisina a glutammina; la coppia dei primers utilizzata è stata:

- primer senso=GCAGCTGCTGGTTTGCT
- primer antisenso=CCCCACAGGAAAGTGA CTGTAG

Per lo studio di questo polimorfismo le sonde sono state così disegnate:

- sonda VIC=AGGCCAAGAAGTCA (allele *wild-type*)
- sonda FAM=AGGCCAAGCAGTCA (allele mutato)

Per quanto riguarda il polimorfismo *C435T* e' stato usato lo specifico kit validato della Applied Biosystems (C__7477307_30).

3.5.4 Analisi dell'attività enzimatica della citidina deaminasi

L'attività enzimatica di CDA è stata misurata nei 126 campioni ematici dei pazienti arruolati nello studio utilizzando la metodica dell'*high-performance liquid chromatography* (HPLC), come precedentemente descritto in letteratura (98). I globuli rossi sono stati lisati unendo 10 µl di sospensione di globuli rossi con 100 µl di acqua deionizzata, lasciati in ghiaccio per 20 minuti e centrifugati per 10 minuti a 20000 g a 4 °C. Il supernatante è stato usato come estratto citoplasmatico contenente l'enzima CDA.

Per la determinazione dell'attività dell'enzima, 20 µl di questo estratto sono stati uniti a 170 µl di buffer (50 mM β-mercaptoetanololo in 0.1 M Tris/HCl, pH 8.0) e al substrato gemcitabina (concentrazione finale di 250 µM). Il materiale è stato incubato a 37 °C per 15 e 30 minuti per garantire che l'attività enzimatica procedesse in modo lineare; dopo l' incubazione, la reazione è stata interrotta con 50 µl di acido tricloroacetico al 40% (concentrazione finale: 8%), e il supernatante ottenuto dopo centrifugazione è stato neutralizzato con 400 µl di triocetilamina/1,1,2-tricloro-trifluoroetano (1:4), risultando pronto per l'analisi di cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC), utilizzando una colonna Aqua C18 (Phenomenex) con PIC B7 (Waters Chromatography, Etten-Leur, the Netherlands), più 3.5 %

aceto nitrile (pH 2.8), flusso 1 ml/min, per la quantificazione del prodotto, il dFdU.

Il sistema di analisi consisteva di una pompa Gynkotek (modello 480, Dionex GmbH, Germany), un sistema di iniezione automatica Midas (Spark Holland, the Netherlands) e un detettore a lunghezza d'onda fissa Gynkotek UVD 170U r (Dionex GmbH, Germany), settato a 254 e 280 nm.

Le linee di calibrazione del dFdU in concentrazione da 0.5 a 200 μM sono state preparate in acqua processata come i campioni. Le quantificazioni delle aree dei picchi sono state eseguite mediante il software di acquisizione di dati Chromeleon versione 6.7 (Dionex GmbH, Germany). L'analisi HPLC è risultata lineare ($r^2 > 0.99$) nel *range* analizzato e il limite di quantificazione (0.5 $\mu\text{mol/L}$) corrispondeva al limite inferiore della curva di calibrazione.

I tempi di ritenzione della gemcitabina e del dFdU sono stati rispettivamente di 7.1 e 13.5 minuti. La formazione del dFdU è stata normalizzata per la concentrazione della proteina misurata con il test di Bradford (Sigma, St Louis, MO, USA).

3.6 Considerazioni statistiche

L'obiettivo primario dello studio è stato quello di analizzare i polimorfismi A79C e C435T e l'attività della citidina deaminasi, correlandoli con l'*outcome* clinico dei pazienti; la valutazione della correlazione con la percentuale di risposte, il *clinical benefit* e la tossicità del trattamento sono stati considerati obiettivi secondari.

Per ogni determinante in studio è stata stabilita la condizione di etero- od omozigosi, e tali risultati sono stati messi in relazione alla risposta al trattamento, ai tempi di sopravvivenza libera da malattia e globale e alla tossicità.

I confronti delle caratteristiche demografiche e cliniche tra i vari genotipi sono stati effettuati mediante il test χ^2 di Pearson. L'attività del trattamento chemioterapico è stata analizzata in termini di percentuale di risposte obiettive (*response rates*, RR) e beneficio clinico (risposte obiettive più stabilità di malattia).

Per incrementare la potenza statistica dell'analisi, in accordo con studi precedenti (91), i pazienti che hanno ottenuto una risposta completa (CR) o parziale (PR) sono stati definiti come "*responders*", mentre e i pazienti che hanno ottenuto una stabilità di malattia (SD) oppure che sono progrediti (PD) sono stato definiti "*non responders*". Sono state condotte analisi aggiuntive confrontando i pazienti che avevano ottenuto CR, PR e SD ("pazienti con beneficio clinico") con i pazienti progrediti al trattamento ("pazienti senza beneficio clinico").

Il tempo alla progressione (TTP, *Time To Progression*) è stato calcolato dalla data di inizio del trattamento chemioterapico fino alla data della documentata progressione clinica e/o strumentale di malattia o fino al decesso, in caso di mancata documentazione della

progressione, mentre la sopravvivenza globale (OS) è stata calcolata dalla data di inizio del trattamento chemioterapico alla data di decesso avvenuta per qualsiasi causa oppure all'ultima data di *follow up* qualora il decesso non fosse stato registrato.

Le curve di TTP e OS sono state disegnate secondo il metodo Kaplan-Meier e il confronto tra le curve nell'analisi univariata è stato effettuato secondo il log-rank test. I fattori considerati nell'analisi univariata includevano i genotipi, il sesso (maschile verso femminile), il performance status (0-1 verso 2), l'età (\leq età mediana verso $>$ età mediana), lo stadio clinico (IIIB verso IV) e l'istologia (adenocarcinoma, includendo il carcinoma bronchioloalveolare verso il carcinoma squamoso).

Riguardo i polimorfismi, le analisi statistiche sono state effettuate raggruppando i pazienti in 3 diversi genotipi per ciascun polimorfismo; le analisi successive sono state condotte: 1) raggruppando i genotipi omozigoti ed eterozigoti quando avevano ottenuto lo stesso risultato (ad esempio, quando entrambi avevano presentato una ridotta o aumentata OS rispetto al gruppo di riferimento) e 2) combinando le varianti alleliche associate con il peggior *outcome* (“*risk-genotypes*”).

Le frequenze genotipiche sono state valutate per l'accettazione con quelle attese secondo l' Hardy-Weinberg equilibrium utilizzando il *software SNP-analyzer* (<http://snp.istech21.com/snpanalyzer/2.0/>), mentre il linkage disequilibrium (LD) è stato calcolato usando il *NHLBI Program LD-Plotter tool*.

E' stata condotta un'analisi di regressione logistica per determinare le associazioni tra l'attività del CDA e la risposta al trattamento, calcolando OR con un intervallo di confidenza (CI) del 95%. In

caso di evidenza di un valore di P significativo, sono state realizzate le curve *receiver operating characteristic* (ROC) per identificare un valore *cut-off* e per ottenere stime corrispondenti di sensibilità e specificità. In presenza di un valore di AUC insoddisfacente (minore di 0.7), la popolazione è stata divisa in gruppi secondo i valori mediani del *marker* considerato.

Le variabili prognostiche di TTP e OS nell'analisi univariata sono state incluse nell'analisi multivariata usando il modello di rischio proporzionale di Cox per identificare i fattori predittivi indipendenti.

I dati sono stati analizzati usando il software statistico *SPSS/PC+17* (SPSS Inc., Chicago, IL). Valori di P tra 0.05 e 0.1 sono stati considerati come marginalmente suggestivi di una associazione, mentre solo un valore di $P < 0.05$ era considerato statisticamente significativo. Tuttavia, nell'analisi univariata per l'*outcome* clinico in base ai polimorfismi, il metodo corretto di Bonferroni ha richiesto una $P < 0.05/30 = 0.017$ per ottenere la significatività statistica; inoltre, nello studio è stata valutata la probabilità di riportare un falso positivo (FPRP) per le associazioni statisticamente significative osservate usando il metodo descritto da Wacholder et al (99).

Le analisi dei campioni sono state effettuate in cieco e correlate con l'*outcome* clinico.

4. Risultati

4.1 Caratteristiche cliniche dei pazienti

Da Novembre 2006 a Febbraio 2009 sono stati arruolati nello studio in modo consecutivo 126 pazienti Caucasici affetti da NSCLC, includendo 65 pazienti valutati in un precedente studio (91). Il *follow up* mediano è stato di 25 mesi (range: 10-48 mesi).

L'età mediana è risultata essere di 63 anni, 89 (70.6%) erano gli uomini e 37(29.4%) le donne; la distribuzione per *performance status* indicava 51 pazienti (40.5%) con un PS = 0 e 75 pazienti (59.5%) con un PS = 1-2.

Per quanto riguarda le caratteristiche della neoplasia, 18 pazienti (14.3%) erano in stadio IIIB, mentre i restanti 108 pazienti (85.7%) si presentava con una malattia in fase metastatica. L'istologia prevalente è risultata adenocarcinoma in 66 pazienti (52.5%), seguita dai carcinomi squamosi (31 casi; 24.6% dei pazienti) e da altre istologie (29 pazienti; 23.0% del totale). Per quanto riguarda il trattamento, il 70.4% dei pazienti (100 pazienti) aveva ricevuto una terapia di prima linea con cisplatino e gemcitabina, mentre solo il 20.6% (26 pazienti) era stato trattato con carboplatino e gemcitabina (Tabella 4).

Tabella 4. Caratteristiche cliniche dei pazienti arruolati

Caratteristiche	Pazienti n (%)
n°pazienti	126
<i>Età mediana (anni)</i>	
<63	64 (50.8)
≥63	62 (49.2)
<i>Sesso</i>	
Uomini	89 (70.6)
Donne	37 (29.4)
<i>Stadio clinic</i>	
IIIB	18 (14.3)
IV	108(85.7)
<i>ECOG PS</i>	
0	51 (40.5)
1-2	75 (59.5)
<i>Istologia</i>	
Adenocarcinoma	66 (52.4)
Squamoso	31 (24.6)
Altre istologie	29 (23.0)
<i>Trattamento</i>	
CDDP-Gem	100(79.4)
Carbo-Gem	26 (20.6)

Abbreviazioni: CDDP-Gem: Cisplatino e Gemcitabina; Carbo-Gem: Carboplatino e Gemcitabina; ECOG PS: *Eastern Cooperative Oncology Group performance status*

I dati relativi alle risposte erano disponibili per tutti i pazienti, mentre per il TTP e l'OS i dati erano disponibili solo per 117 pazienti.

Si sono verificati 106 decessi (percentuale degli eventi pari al 90.6%), mentre 11 pazienti risultavano in vita, in assenza di progressione di malattia, all'ultimo contatto, effettuato a marzo 2010.

La percentuale delle risposte al trattamento chemioterapico è stata del 25.8%, il TTP mediano di 6.0 mesi (95% CI 4.9-7.1) e la OS mediana di 10 mesi (95% CI 7.3-12.7).

I dati relativi *all'outcome* in relazione alle caratteristiche cliniche sono riportati nella Tabella 5.

Tabella 5: *Outcome* dei pazienti in relazione alle caratteristiche cliniche

Caratteristiche	Pazienti n (%)	Risposta n (%)§	P*	TTP (mesi) (95% CI)	P**	OS (mesi) (95% CI)	P**
N° pazienti	126	34 (25.8)		6.0 (4.9-7.1)		10.0 (7.3-12.7)	
<i>Età, mediana (anni)</i>							
≤63	64 (50.8)	18 (28.1)	0.926	6.0 (4.4-7.6)	0.441	12.0 (8.8-15.2)	0.896
>63	62 (49.2)	16 (25.8)		6.0 (4.3-7.7)		10.0 (7.2-12.8)	
<i>Sesso</i>							
Uomini	89 (70.6)	19 (21.3)	0.047	5.0 (3.8-6.2)	0.010	9.0 (6.6-11.4)	0.004
Donne	37 (29.4)	15 (40.5)		8.0 (5.7-10.3)		17.0 (13.4-20.6)	
<i>Stadio clinic</i>							
IIIB	18 (14.3)	11 (61.1)	0.001	7.0 (5.7-8.3)	0.111	21.0 (14.3-27.7)	0.098
IV	108 (85.7)	23 (21.9)		5.0 (3.9-6.1)		10.0 (7.6-12.4)	
<i>ECOG PS</i>							
0-1	123 (97.6)	33 (26.8)	0.999	6.0 (4.9-7.1)	0.782	11.0 (8.1-13.9)	0.105
2	3 (2.4)	1 (33.3)		2.0 (0.4-3.6)		2.0 (0.4-3.6)	
<i>Istologia#</i>							
Adenocarcinoma	66 (52.4)	17 (25.8)	0.932	6.0 (4.6-7.1)	0.025	13.0 (8.0-18.0)	0.003
Squamoso	31 (24.6)	7 (22.69)		4.0 (1.4-6.6)		8.0 (4.8-11.2)	
Altre istologie	29 (23.0)						
<i>Trattamento</i>							
CDDP-Gem	100(79.4)	28 (28.0)	0.798	6.0 (4.9-7.1)	0.527	11.0 (8.1-13.8)	0.680
CBDCA-Gem	26 (20.6)	6 (23.1)		7.0 (2.2-11.8)		10.0 (0.1-20.0)	

ECOG PS: *Eastern Cooperative Oncology Group performance status*; CDDP-Gem: Cisplatino e Gemcitabine; CBDCA-Gem: Carboplatino e Gemcitabine; OS: sopravvivenza globale; TTP: tempo alla progressione; CI: intervallo di confidenza; * test χ^2 di Pearson a due code, ** log-rank test.

L'analisi statistica è stata effettuata solo per adenocarcinoma verso istologia squamosa.

4.2 Caratteristiche genotipiche dei pazienti

Le analisi dei genotipi sono state condotte sulla maggior parte dei campioni di DNA: 115, 117, 113 campioni e 119 dei 126 pazienti sono stati valutati, rispettivamente, per CDA A79C, CDA C435T, combinazione dei polimorfismi di CDA e analisi di attività della citidina deaminasi (Tabella 6).

Nessuna differenza è stata osservata nei campioni analizzati in duplicato (circa il 10%) e tutti i dati della genotipizzazione sono stati inclusi nell'analisi finale.

Per quanto riguarda l'analisi del polimorfismo di CDA A79C, le frequenze dei genotipi riscontrate nella popolazione in studio sono state 36.5%, 49.6% e 13.9% rispettivamente per la forma omozigote *wild-type* AA, per quella eterozigote AC e per gli omozigoti mutati CC; la frequenza dell'allele codificante per A è stata del 61%, mentre quella dell'allele codificante per C è stata del 39%.

Per quanto riguarda il polimorfismo C435T, le frequenze dei genotipi riscontrate nella popolazione in esame sono state 52.1%, 38.5% e 9.4% rispettivamente per la forma omozigote *wild-type* CC, per quella eterozigote CT e per gli omozigoti mutati TT; la frequenza dell'allele codificante per C è stata del 71%, quella dell'allele codificante per T del 29%.

Non è stato riscontrato *linkage disequilibrium* ($r^2=0.056$) tra i polimorfismi CDA A79C e CDA C435T, entrambi i polimorfismi hanno dimostrato di seguire l'equilibrio di Hardy-Weinberg e le frequenze genotipiche sono risultate paragonabili con quelle riportate nella popolazione Caucasica nei *databases* NCBI/NCI-SNP500 (91). Non sono state identificate correlazioni significative tra i genotipi e l'istologia tumorale (ad esempio, 9 dei 12 pazienti

con genotipo CDA C79C avevano come istologia un adenocarcinoma verso 50 dei 77 pazienti con i genotipi CDA A79A o A79C; P=0.72). Allo stesso modo, nessuna correlazione significativa è stata riscontrata tra i genotipi e l'età, il *performance status* (PS), il sesso e lo stadio di malattia.

Tabella 6. Caratteristiche genotipiche dei pazienti

Polimorfismi e attività	Pazienti n (%)	HWE P	Frequenze alleliche	Polimorfismi	Pazienti n (%)
CDA-A79C				CDA-A79C	
AA	42 (36.5)	0.941	A 0.61	AA-AC	99 (86.1)
AC	57 (49.6)		C 0.39	CC	16 (13.9)
CC	16 (13.9)				
CDA-C435T				CDA-C435T	
CC	61 (52.1)	0.866	C 0.71	CC-CT	106(90.6)
CT	45 (38.5)		T 0.29	TT	11 (9.4)
TT	11 (9.4)				
SNPs CDA combinati					
AA-CC	22 (19.5)				22 (19.5)
Altri	85 (75.2)				85 (75.2)
CC-TT	6 (5.3)				6 (5.3)
CDA attività					
Bassa	61 (51.3)				
Alta	58 (48.7)				

Abbreviazioni: HWE: Hardy-Weinberg equilibrium

4.3 Correlazione tra polimorfismi e *outcome* clinico

Nessuna correlazione significativa è stata osservata tra i genotipi del CDA e le risposte, mentre un *trend* a favore di una significativa associazione ($P=0.10$, test χ^2 di Pearson a due code) è stato osservato dividendo i pazienti tra coloro che avevano ricevuto un beneficio clinico e coloro che non avevano ricevuto beneficio. In particolare, il 75.9% dei pazienti con genotipo CDA A79A o A79C hanno riportato beneficio clinico dal trattamento chemioterapico, in confronto con il 56.3% dei pazienti con CDA C79C.

All'analisi univariata, un tempo alla progressione significativamente più lungo è stato osservato nei pazienti con polimorfismo CDA A79A (7.0 mesi, 95% CI 5.4-8.6) e A79C (6.0 mesi, 95% CI 4.5-7.5) rispetto ai pazienti con polimorfismo C79C (3.0 mesi, 95% CI 1.6-4.4) ($P=0.005$); inoltre, nei pazienti con genotipo C79C si è riscontrata peggior prognosi, con una sopravvivenza mediana di 5.0 mesi (95% CI 4.0-16.5) rispetto ai pazienti con genotipo A79A (14 mesi, 95% CI 8.4-19.6) e A79C (10.0 mesi, 95% CI 6.9-13.1) ($P=0.004$).

Differenze significative in TTP e OS sono state osservate raggruppando i pazienti con polimorfismi CDA A79A+A79C rispetto ai pazienti con polimorfismo C79C (Tabella 7 e Figura 7A).

Il polimorfismo CDA C435T ha mostrato un *trend* verso una significativa associazione con TTP ($P=0.098$) e OS ($P=0.079$). Pazienti portatori delle varianti CDA C435C, C435T e T435T hanno presentato un TTP mediano di 5.0 (95% CI 3.5-6.5), 6.0 (95% CI 3.9-8.1) e 2.0 mesi (95% CI 0.6-4.3), rispettivamente.

Allo stesso modo, una ridotta sopravvivenza (5.0 mesi, 95% CI 2.0-8.0) è stata osservata nei pazienti portatori del genotipo CDA

T435T rispetto ai pazienti con il polimorfismo *C435C*, in cui l'OS mediana è stata di 10.0 mesi (95% CI 6.8-13.2).

Le analisi ottenute raggruppando CDA *C435C+C435T* verso i pazienti con polimorfismo *T435T* hanno mostrato una sopravvivenza più lunga per i pazienti con almeno un allele C (Tabella 7 e Figura 7B).

Poiché CDA *A79C* e CDA *C435T* potrebbero aver un effetto additivo sul CDA, è stato studiato l'effetto del “*risk-genotype*” combinato. Queste combinazioni sono state analizzate in 113 pazienti (i pazienti non valutabili per entrambi i polimorfismi sono stati esclusi). Gli alleli “deleterii” includevano CDA *C79C* e *T435T*; in effetti, pazienti con CDA *C79C+T435T* avevano un tempo alla progressione e una sopravvivenza significativamente più brevi (Tabella 7 e Figura 7C).

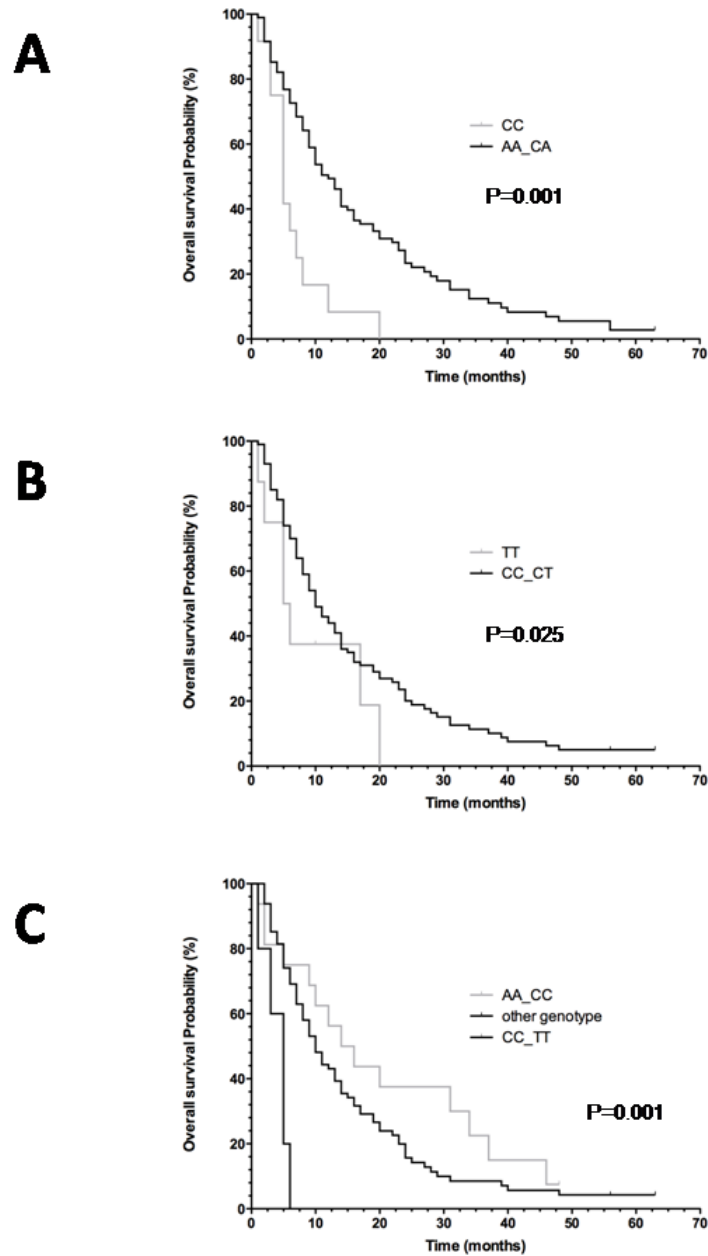
Tabella 7. Outcome clinico in relazione con i polimorfismi e l'attività della citidina deaminasi

Polimorfismi e attività	Pazienti n (%)	HWE <i>P</i>	Frequenze alleliche	Polimorfismi	Pazienti n (%)	Risposte n (%)	<i>P</i> ^a	TTP (mesi) (95% CI)	<i>P</i> ^b	OS (mesi) (95% CI)	<i>P</i> ^b
CDA-A79C				CDA-A79C							
AA	42 (36.5)		A 0.61	AA-AC	99 (86.1)	28 (28.3)	0.304	6.0 (4.8-7.2)	0.001	11.0 (8.2-13.8)	0.001
AC	57 (49.6)	0.941	C 0.39	CC	16 (13.9)	2 (12.5)		3.0 (1.6-4.4)		5.0 (2.7-7.3)	
CC	16 (13.9)										
CDA-C435T				CDA-C435T							
CC	61 (52.1)		C 0.71	CC-CT	106(90.6)	28 (26.4)	0.816	6.0 (4.8-7.2)	0.164	10.0 (7.1-12.9)	0.025
CT	45 (38.5)	0.866	T 0.29	TT	11 (9.4)	2 (18.2)		2.0 (-4.3)		5.0 (2.0-8.0)	
TT	11 (9.4)										
SNPs CDA combinati											
AA-CC	22 (19.5)				22 (19.5)	7 (31.8)	0.285	6.0 (4.6-7.4)	0.027	14.0 (7.8-20.2)	0.001
altri	85 (75.2)				85 (75.2)	22 (25.9)		5.0 (3.4-6.6)		10.0 (7.6-12.4)	
CC-TT	6 (5.3)				6 (5.3)	0 (0.0)		2.0 (0.9-3.1)		5.0 (3.2-6.7)	
Attività CDA											
bassa	61 (51.3)					23 (37.7)	0.006	8.0 (6.5-9.5)	<0.001	19.0(14.3-23.7)	<0.001
alta	58 (48.7)					8 (13.8)		3.0 (2.0-4.0)		6.0 (4.6-7.5)	

Abbreviazioni: HWE: Hardy-Weinberg equilibrium; OS: sopravvivenza globale; TTP: tempo alla progressione; CDA: citidina deaminasi; SNPs: polimorfismi del singolo nucleotide; CI: intervallo di confidenza

Note: ^a Test χ^2 di Pearson a due code; ^b Log-rank test

Figura 7: Curve di Kaplan-Meier per la valutazione della sopravvivenza



Note: A) curva di Kaplan-Meier per il polimorfismo CDA *A79C*; B) curva di Kaplan-Meier per il polimorfismo CDA *C435T*; C) curva di Kaplan-Meier per la combinazione degli alleli “deleterii” (CDA *C79C* e *T435T*)

4.4 Correlazione tra genotipi della citidina deaminasi e attività enzimatica

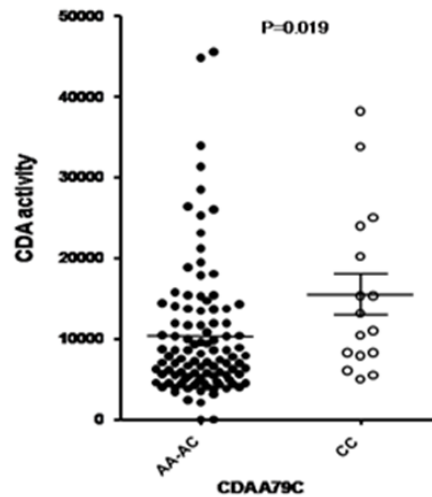
L'analisi dell'attività della citidina deaminasi è stata condotta sui prelievi ematici di 124 dei 126 pazienti trattati con gemcitabina e cisplatino o carboplatino. Non sono state evidenziate differenze statistiche nei valori di attività secondo l'istologia adenocarcinoma *versus* l'istologia squamosa ($P=0.46$), così come per l'età, il sesso e altre caratteristiche cliniche.

L'attività enzimatica media di CDA è risultata 8963.9 ± 6614.9 pmol/hr/mg proteine nei pazienti portatori del genotipo *wild type* (CDA A79A), mentre nei pazienti con i genotipi CDA A79C e CDA C79C le attività medie del CDA sono state 11686.5 ± 9339.9 e 15450.6 ± 10155.6 pmol/hr/mg proteine ($P=0.009$, test di Kruskal-Wallis). Le analisi statistiche con l'uso del Mann-Whitney test hanno rivelato una differenza significativa ($P=0.019$) tra i pazienti portatori del genotipo CDA A79A+CDA A79C e quelli con genotipo CDA C79C (Figura 8).

Al contrario, non sono state identificate differenze statisticamente significative ($P=0.256$) né nell'attività del CDA in pazienti con i genotipi CDA C435C, CDA C435T e CDA T435T (9888.8 ± 7789.7 , 11954.7 ± 9279.2 e 13955.8 ± 9523.4 pmol/hr/mg proteine, rispettivamente) né ponendo a confronto i pazienti con polimorfismo CDA C435C+CDA C435T con i pazienti portatori del polimorfismo CDA T435T ($P=0.121$).

In ogni caso, il “*risk genotype*” è stato associato con un'attività del CDA significativamente più alta (18368.5 ± 10281.7 pmol/hr/mg proteine) rispetto ai pazienti portatori degli altri genotipi ($P=0.039$).

Figura 8. Analisi dell'attività enzimatica della citidina deaminasi in relazione al polimorfismo CDA A79C



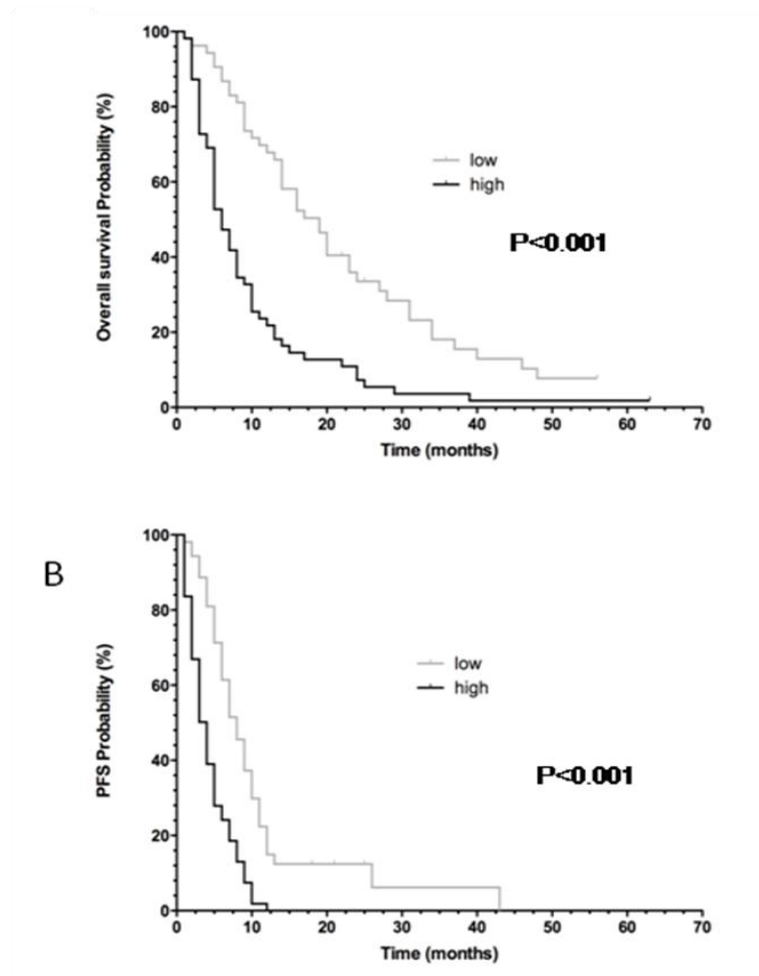
4.5 Correlazione tra attività enzimatica della citidina deaminasi e *outcome* clinico

L'attività mediana del CDA nei 126 pazienti è stata di 8243.6 (*range* 23.2-45566.3) pmol/hr/mg proteine. Usando questo valore come *cut-off*, i pazienti con bassa attività di CDA hanno ottenuto una percentuale di risposte significativamente più alta e un tempo alla progressione e una sopravvivenza più lunghe rispetto ai pazienti con elevata attività di CDA (Tabella 7 , Figure 9A e 9B).

Una bassa attività di CDA è stata significativamente associata anche con il beneficio clinico; 56 dei 61 pazienti (91.8%) con bassa attività di CDA hanno ottenuto risposte complete, risposte parziali o stabilità d malattia *versus* 30 dei 58 (51.7%) dei pazienti con elevata attività di CDA ($P < 0.001$). Allo stesso modo, una differenza

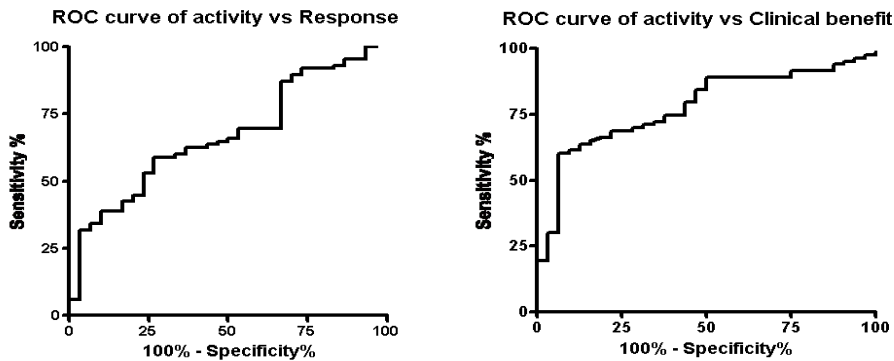
significativa tra l'attività media del CDA ($P=0.007$) è stata identificata dividendo i pazienti che hanno risposto al trattamento (7641.3 ± 5626.7 pmol/hr/mg proteine) con quelli stabili o progrediti (12447.7 ± 9360.6 pmol/hr/mg proteine) e dividendo i pazienti tra coloro che hanno ricevuto un beneficio clinico dalla terapia (9556.5 ± 8502.8 pmol/hr/mg) e coloro che sono progrediti (15440.5 ± 8156.9 pmol/hr/mg, $P < 0.001$).

Figura 9A e 9B: Curve di Kaplan-Meier per la sopravvivenza e la sopravvivenza libera da progressione in relazione con l'attività enzimatica della citidina deaminasi



I dati di attività del CDA sono stati analizzati considerando non soddisfacenti i valori di AUC per la risposta (AUC=0.67); il valore ottimale del *cut-off* non è stato identificato e la popolazione è stata valutata in base al valore mediano dell'attività del CDA. Le curve ROC (Figura 10) per la risposta utilizzando questo *cut-off* hanno identificato una sensibilità del 58.8% (95% CI 47.6-69.4) e una specificità del 73.3% (95% CI 54.1-87.7). Dati simili sono stati osservati anche in relazione al beneficio clinico, con una sensibilità del 63.9% (95% CI 53.8-75.2) ed una specificità dell' 84.4% (95% CI 67.2-94.7).

Figura 10: Curve ROC per risposta e beneficio clinico



4.6 Analisi multivariata

Per valutare il rischio di progressione di malattia e di morte sono state condotte due analisi con il modello di regressione di Cox, valutando tutte le variabili significativamente associate con TTP e OS nel modello univariato.

Tra i polimorfismi (Tabella 8), solo la variante CDA *C79C* ha mostrato una significativa associazione sia con il rischio di progressione che di morte. Il sesso, il PS e l'istologia non sono risultati fattori predittivi indipendenti per TTP e OS.

Il modello di rischio di regressione proporzionale di Cox usato per le analisi multivariate ha confermato il significato prognostico dell'attività del CDA. In particolare, una bassa attività di CDA è stata significativamente associata con un rischio ridotto di morte (HR 0.512, 95% CI 0.310-0.846, P=0.009] e di progressione (HR 0.365, 95% CI 0.211-0.631, P<0.001).

Tabella 8: Fattori associati con la sopravvivenza ed il tempo alla progressione nell'analisi multivariata

Analisi multivariate			
Covariate per OS		Hazard ratio (95%CI)	P
Sesso	Donne	0.628 (0.353-1.118)	0.114
	Uomini	1	
Istologia	Adenocarcinoma	0.619 (0.358-1.068)	0.085
	Squamoso	1	
CDA-A79C	AA –AC	0.357 (0.163-0.786)	0.011
	CC	1	
CDA-C435T	CC- CT	0.794 (0.335-1.881)	0.600
	TT	1	
Attività di CDA	Bassa	0.512 (0.310-0.846)	0.009
	Alta	1	
Covariate per TTP		Hazard ratio (95%CI)	P
Sesso	Donne	0.748 (0.423-1.324)	0.319
	Uomini	1	
Istologia	Adenocarcinoma	0.894 (0.765-2.188)	0.337
	Squamoso	1	
CDA-A79C	AA –AC	0.472 (0.211-0.919)	0.046
	CC	1	
Attività di CDA	Bassa	0.365 (0.211-0.631)	<0.001
	Alta	1	

Abbreviazioni: OS: sopravvivenza globale; TTP: tempo alla progressione;
CDA: citidina deaminasi

4.7 Tossicità

I dati riguardanti la tossicità sono stati registrati soltanto ai giorni 1 e 8 di ciascun ciclo di chemioterapia. Dei 112 pazienti valutabili per la tossicità, in 79 pazienti (70.5%) si è registrata tossicità ematologica (anemia, neutropenia e/o trombocitemia), mentre 34 pazienti (30.4%) hanno presentato vomito, astenia, nausea, parestesie, ototossicità e/o tossicità a livello epatico o renale. Nessuna correlazione è stata identificata tra i genotipi o l'attività e la tossicità, così come per il numero di cicli di trattamento chemioterapico somministrati e la frequenza di riduzione delle dosi (Tabella 9).

Le tossicità sono state riportate secondo il grado (esempio: grado 1-2 *versus* grado 3-4) nei sottogruppi di pazienti con i diversi genotipi di CDA (Tabella 10) e solo la tossicità di grado più elevato è stata riportata per ciascun paziente. Considerando il numero totale di tossicità in ogni sottogruppo di pazienti, nessuna associazione significativa è stata osservata utilizzando il test χ^2 di Pearson a due code.

Tabella 9: Numero dei cicli di chemioterapia e riduzioni di dose in relazione con i polimorfismi e l'attività della citidina deaminasi.

Polimorfismi e attività	Pazienti n (%)	Numero di cicli di chemioterapia			<i>P</i>	Numero di riduzioni di dose			<i>P</i>
		Totale	Media	Mediana		Totale	Media	Mediana	
<i>CDA-A79C</i>									
<i>AA</i>	39 (36.5)	127	3.2	4	<i>0.131</i>	19	0.5	0	<i>0.607</i>
<i>AC</i>	53 (49.6)	183	3.4	4		17	0.3	0	
<i>CC</i>	16 (13.9)	44	3.6	4		3	0.3	0	
<i>CDA-C435T</i>									
<i>CC</i>	61 (52.1)	185	3.2	4	<i>0.885</i>	17	0.3	0	<i>0.439</i>
<i>CT</i>	45 (38.5)	134	3.3	4		15	0.4	0	
<i>TT</i>	11 (9.4)	35	3.2	4		4	0.4	0	
<i>SNPs combinati</i>									
<i>AA-CC</i>	22 (19.5)	66	3.3	4	<i>0.417</i>	8	0.4	0	<i>0.696</i>
<i>altri</i>	85 (75.2)	255	3.2	4		31	0.4	0	
<i>CC-TT</i>	6 (5.3)	23	3.8	4		2	0.3	0	
<i>Attività CDA</i>									
<i>bassa</i>	61 (51.3)	200	3.4	4	<i>0.108</i>	25	0.4	0	<i>0.395</i>
<i>alta</i>	58 (48.7)	165	3.1	4		16	0.3	0	

Tabella 10. Tossicità in relazione con i polimorfismi e l'attività della citidina deaminasi (numero di pazienti)

	<i>CDA-A79C</i>				<i>CDA-C435T</i>				CDA activity			
	<i>AA-AC</i>		<i>CC</i>		<i>CC-CT</i>		<i>TT</i>		Bassa		elevata	
Tossicità	Grado 1-2	Grado 3-4	Grado 1-2	Grado 3-4	Grado 1-2	Grado 3-4	Grado 1-2	Grado 3-4	Grado 1-2	Grado 3-4	Grado 1-2	Grado 3-4
<i>Ematologica</i>												
Anemia	16	7	3	4	18	10	1	2	14	5	6	7
Neutropenia	19	23	2	2	21	24	1	1	21	16	1	9
Trombocitopenia	15	17	2	2	14	18	3	1	15	10	4	11
Totale	35	30	6	4	40	30	3	3	21	20	21	17
<i>Non-ematologica</i>												
Vomito	7	4	0	1	6	5	1	0	3	2	4	3
Nausea	0	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2
Astenia	0	7	0	2	0	8	0	1	0	3	0	6
Parestesie	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
Ototossicità	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
Tossicità epatica	3	2	0	0	3	2	0	0	3	1	0	1
Tossicità renale	4	0	0	0	4	0	0	0	3	0	1	0
Totale	16	15	0	3	15	17	1	1	11	6	5	12

5. Discussione

L'obiettivo primario di questo studio è stato la valutazione dell'impatto dei polimorfismi e dell'attività del CDA sull'*outcome* dei pazienti affetti da tumore del polmone non a piccole cellule in stadio avanzato di malattia trattati con regimi contenenti platino e gemcitabina.

Recenti progressi nel trattamento del NSCLC in fase avanzata sono stati ottenuti con la scoperta di nuovi farmaci *targeted* molto attivi in gruppi selezionati di pazienti (55, 100). Inoltre, sulla base della variabilità interindividuale nella tossicità farmacologica, un'attuale linea di ricerca riguarda l'identificazione di *biomarkers* predittivi di efficacia per selezionare il miglior regime chemioterapico da utilizzare per ciascun paziente.

Diverse alterazioni genetiche ed epigenetiche, come mutazioni geniche, amplificazioni, polimorfismi o alterata espressione di geni/proteine sono state associate con la resistenza alla gemcitabina e, tra questi possibili fattori predittivi, i polimorfismi nella linea germinale sono emersi come un promettente *target* di ricerca (101).

Il ruolo degli SNPs del CDA è stato sottolineato per la prima volta da Sugiyama (89), il quale ha descritto come i pazienti portatori dell'aplotipo *3 del CDA, ovvero lo SNP non-sinonimo G208A (Ala70Thr), avessero una *clearance* più bassa della gemcitabina ed un'aumentata incidenza di neutropenia \geq grado 3.

In un precedente studio condotto da Tibaldi et al in 65 pazienti affetti da NSCLC (91), il genotipo *wild type* CDA A79A è stato correlato con beneficio clinico, vantaggio in termini di TTP e OS e tossicità ematologica di grado severo. Questi dati erano parzialmente concordanti con i risultati riportati da Farrell et al.

Infatti, i dati provenienti da 538 pazienti affetti da neoplasia pancreatica radicalmente resecati trattati nell'ambito del *trial* randomizzato RTOG9704 ha mostrato una correlazione tra il genotipo CDA A79A ed una tossicità ematologica di grado più severo, ma non con l'*outcome* clinico (102).

Dai risultati dello studio condotto emerge come gli SNPs CDA A79C e CDA C435T non si siano rivelati *markers* predittivi di attività o di tossicità, tuttavia sono state confermate precedenti osservazioni, secondo cui i pazienti portatori del genotipo CDA A79A e CDA A79C ottenevano un tempo alla progressione e una sopravvivenza significativamente più lunghe rispetto ai pazienti con genotipo CDA C79C. Inoltre, i pazienti con genotipo CDA T435T hanno riportato una OS più breve rispetto ai pazienti portatori del genotipo *wild-type* o della variante eterozigote, e il gruppo di pazienti con CDA A79A+T435T hanno presentato TTP e OS più brevi.

Questi dati sono parzialmente concordanti con i risultati riportati da Okazaki et al in 154 pazienti con diagnosi di adenocarcinoma pancreatico potenzialmente resecabile, trattati con gemcitabina neoadiuvante concomitante a radioterapia con (in 70 pazienti) o senza (in 84 pazienti) terapia di induzione con cisplatino e gemcitabina; in questo studio sei SNPs, inclusi CDA A79C e CDA C435T, hanno mostrato una debole associazione con la sopravvivenza (103).

Le differenze osservate nei diversi studi di farmacogenetica potrebbero derivare anche dal complesso e solo parzialmente studiato sistema delle regolazioni genetiche ed epigenetiche del

gene CDA, che potrebbe alterare l'attività fenotipica di questo enzima.

Un altro risultato importante di questo studio è che l'attività enzimatica del CDA, identificata con il sistema HPLC, è stata correlata con attività ed efficacia del trattamento a base di platino e gemcitabina. In particolare, pazienti con bassi livelli di attività di CDA hanno ottenuto una percentuale di risposte obiettive del 37.7%, che era significativamente più alta rispetto a quella dei pazienti con elevata attività (13.8% di percentuale di risposte; $P=0.006$); inoltre, pazienti con bassa attività di CDA hanno presentato un tempo alla progressione ed una sopravvivenza statisticamente più lunghi rispetto ai pazienti con elevata attività di CDA anche nell'analisi multivariata.

In base alle attuali conoscenze, questa è la prima evidenza circa il ruolo predittivo dell'attività enzimatica di CDA ed il ruolo prognostico in termini di *outcome* in pazienti affetti da NSCLC trattati con chemioterapia a base di gemcitabina.

Uno studio preliminare in 40 pazienti con tumore del pancreas ha riportato una correlazione simile tra elevata attività del CDA e progressione di malattia dopo trattamenti a base di gemcitabina (104).

Questi risultati potrebbero avere importanti applicazioni cliniche, come la modulazione della dose di gemcitabina secondo l'attività del CDA. Inoltre, l'analisi tramite HPLC è un *test* semplice e poco costoso, che richiede solo un apparato di analisi e reagenti standard (105).

Nonostante la mancanza di una popolazione di controllo, i risultati dello studio condotto sono anche importanti per ipotizzare il ruolo

predittivo *versus* il ruolo prognostico dell'attività enzimatica del CDA in questo specifico *setting* clinico.

L'obiettivo primario dello studio era la sopravvivenza, che è il più importante *outcome* obiettivo, ma i dati aggiuntivi su risposta, beneficio clinico e TTP suggeriscono che l'attività del CDA possa essere un fattore predittivo di miglior attività del trattamento.

Nello studio pilota di Ciccolini et al (94), nonostante l'assenza di casi di morti tossiche o di ospedalizzazioni per tossicità, i pazienti con bassa attività di CDA hanno presentato una precoce tossicità non ematologica di grado severo, mentre in questo studio, i dati di tossicità ematologica e non ematologica sono stati raccolti solo ai giorni 1 e 8 di ogni ciclo di chemioterapia, per cui la tossicità ematologica di grado severo, che potrebbe verificarsi al giorno 15, non è stata riportata tra i dati clinici e non è possibile correlare questi dati con i genotipi e l'attività del CDA. Tuttavia, il fatto che non si osservano casi con attività enzimatica molto bassa di CDA potrebbe spiegare l'assenza di eventi avversi seri nella nostra popolazione; al contrario, la correlazione dell'attività del CDA con fattori di efficacia (OS e TTP) potrebbe essere il risultato di una diversa detossificazione del farmaco nel fegato e nelle cellule tumorali, che potrebbero verificarsi anche con piccole variazioni nell'attività enzimatica stessa.

Come sottolineato in una *review* recente su questo argomento, considerando le numerose evidenze che indicano come le deregolazioni del CDA potrebbero avere un impatto diretto su questo farmaco, il test del CDA prima della somministrazione della gemcitabina potrebbe essere considerato una strategia utile per ottimizzare l'efficacia e la sicurezza del trattamento (105).

In conclusione, l'analisi dell'attività del CDA è emersa come un potente *marker* predittivo di attività efficace della chemioterapia basata su platino e gemcitabina e potrebbe essere validata in uno studio prospettico.

Pertanto, l'approccio farmacogenetico al trattamento dei tumori, ed in particolare al tumore polmonare non a piccole cellule, può rappresentare un'interessante e innovativa linea di ricerca nel definire il miglior trattamento chemioterapico da offrire al singolo paziente, confermando il ruolo chiave della ricerca traslazionale nel perseguire miglioramenti in ambito oncologico.

6. Bibliografia

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005;55:74-108
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer Statistics, 2009. *CA Cancer J Clin.* 2009;59:225–249
3. Gridelli C, Perrone F, Monfardini S. Lung cancer in the elderly. *Eur J Cancer* 1997; 33:2313-2314
4. Goldstraw P, Crowley JJ, Chansky K, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for revision of the stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol* 2007; 2:706-714
5. Ginsberg RJ, Rubinstein LV. Randomized trial of lobectomy versus limited resection for T1N0 non small cell cancer by the Lung Cancer Study Group. *Ann Thorac Surg* 1995; 60:615-623
6. Strauss GM, Herndon JE 2nd, Maddaus MA, et al. Adjuvant paclitaxel plus carboplatin compared with observation in stage IB non-small-cell lung cancer: CALGB 9633 with the Cancer and Leukemia Group B, Radiation Therapy Oncology Group, and North Central Cancer Treatment Group Study Groups. *J Clin Oncol* 2008; 26:5043-5051
7. Butts CA, Ding K, Seymour L, et al. Randomized phase III trial of vinorelbine plus cisplatin compared with observation in completely resected stage IB and II non-small-cell lung cancer: updated survival analysis of JBR-10. *J Clin Oncol.* 2010;28:29-34
8. Crinò L, et al. Linee guida AIOM 2009: Neoplasie polmonari. Disponibile online: www.aiom.it

9. Crinò L, Weder W, van Meerbeeck J, et al. ESMO Guidelines Working Group. Early stage and locally advanced (non-metastatic) non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2010; 21 Suppl 5:103-115
10. Pfister DG, Johnson DH, Azzoli CG, et al. et al. American Society of Clinical Oncology treatment of unresectable non-small-cell lung cancer guideline: update 2003. *J Clin Oncol* 2004; 22:330-353
11. Rapp E, Pater JL, Willan A, et al. Chemotherapy can prolong survival in patients with advanced non small cell lung cancer. Report of a Canadian multicenter randomized trial. *J Clin Oncol* 1998; 6:633-641.
12. Cartei G, Cartei F, Cantone A, et al. Cisplatin-cyclophosphamide-mitomycin combination chemotherapy with supportive care versus supportive care alone for treatment of metastatic non small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1993; 85:794-800
13. Woods RL, Williams CJ, Levi J, et al. A randomized trial of cisplatin and vindesine versus supportive care only in advanced non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 1990; 61:608-611
14. Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group. Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials. *BMJ* 1995; 311:899-909
15. The Elderly Lung Cancer Vinorelbine Italian Study Group. Effects of vinorelbine on quality of life and survival of elderly patients with advanced non small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91:66-72

16. Anderson H, Hopwood P, Stephens RJ et al. Gemcitabine plus best supportive care (BSC) vs BSC in inoperable non small cell lung cancer. A randomized trial with quality of life as the primary outcome. *Br J Cancer* 2000; 83:447-453
17. Ranson M, Davidson N, Nicolson M, et al. Randomized trial of paclitaxel plus supportive care versus supportive care for patients with advanced non small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:1074-1080
18. Roszkowski K, Pluzanska A, Krzakowski M, et al. A multicenter, randomized, phase III study of docetaxel plus best supportive care versus best supportive care in chemotherapy-naïve patients with metastatic or non-resectable localized non small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer* 2000; 27:145-157
19. Le Chevalier T, Brisgand D, Douillard JY, et al. Randomized study of vinorelbine and cisplatin versus vindesine and cisplatin versus vinorelbine alone in advanced non small cell lung cancer: results of a European Multicenter Trial including 612 patients. *J Clin Oncol* 1994; 12:360-367
20. Crinò L, Clerici M, Figoli F, et al. Chemotherapy of advanced non small cell lung cancer: a comparison of three active regimens. A randomized trial of the Italian Oncology Group for Clinical Research (G.O.I.R.C.). *Ann Oncol* 1995; 6:347-353
21. Crinò L, Scagliotti GV, Ricci S, et al. Gemcitabine and cisplatin versus mitomycin, ifosfamide and cisplatin in advanced non small cell lung cancer: a randomized phase III study of the Italian lung cancer project. *J Clin Oncol* 1999; 17:3522-3530
22. Rudd RM, Gower NH, Spiro SG, et al. Gemcitabine plus carboplatin versus mitomycin, ifosfamide and cisplatin in

- patients with stage IIIB or IV non small cell lung cancer: a phase III randomized study of the London Lung Cancer Group. *J Clin Oncol* 2005; 23:142-153
23. Scagliotti GV, De Marinis F, Rinaldi M, et al. Phase III Randomized trial comparing three platinum-based doublets in advanced non small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20:4285-4291
 24. Schiller JH, Harrington D, Belani CP, et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non small cell lung cancer. *N Engl J Med* 2002; 346:92-98
 25. Le Chevalier T, Scagliotti G, Natale R, et al. Efficacy of gemcitabine plus platinum chemotherapy compared with other platinum containing regimens in advanced non small cell lung cancer: a meta-analysis of survival outcomes. *Lung Cancer* 2005; 47:69-80
 26. Klastersky J, Sculier J, Lacroix J, et al. A randomized study comparing cisplatin or carboplatin with etoposide in patients with advanced non-small cell lung cancer: European Organization for Research and Treatment of Cancer protocol 07861. *J Clin Oncol* 1990; 8:1556-1562
 27. Zatloukal P, Petruzelka L, Zemanova M, et al. Gemcitabine plus cisplatin versus gemcitabine plus carboplatin in stage IIIB and IV non-small cell lung cancer (NSCLC): a phase III randomized trial. *Lung Cancer* 2003; 41:321–231
 28. Fossella F, Pereira JR, von Pawel J, et al. Randomized, multinational, phase III study of docetaxel plus platinum combinations vs vinorelbine plus cisplatin for advanced non-

- small cell lung cancer: The TAX 326 Study Group. *J Clin Oncol* 2003; 21:3016–3024
29. Rosell R, Gatzemeier U, Betticher DC, et al. Phase III randomised trial comparing paclitaxel/carboplatin with paclitaxel/cisplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer: a cooperative multinational trial. *Ann Oncol* 2002; 13:1539–1349
 30. Hotta K, Matsuo K, Ueoka H, et al. Meta-analysis of randomized clinical trials comparing cisplatin to carboplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22:3852-3859
 31. Ardizzoni A, Boni L, Tiseo M, et al. Cisplatin- versus carboplatin-based chemotherapy in first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer: An individual patient data meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99:847-857
 32. West H, Harpole D and Travis W. Histologic considerations for individualized systemic therapy approaches for the management of non –small cell lung cancer. *Chest* 2009; 136:1112-1118
 33. Hanna N, Shepherd FA, Fossella FV, et al. Randomized phase III trial of pemetrexed versus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with chemotherapy. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1589-1597
 34. Scagliotti GV, Parikh P, von Pawel J, et al. Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naive patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 3543-3551
 35. Ceppi P, Volante M, Saviozzi S, et al. Squamous cell carcinoma of the lung compared with others histotypes shows higher

- messenger RNA and protein levels for thymidylate synthase. *Cancer* 2006; 107:1589-1596
36. Hanna N, Shepherd FA, Fossella FV, et al. Randomized phase III trial of pemetrexed versus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with chemotherapy. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1589-1597
 37. Ciuleanu T, Brodowicz T, Zielinski C, et al. Maintenance pemetrexed plus best supportive care versus placebo plus best supportive care for non-small-cell lung cancer: a randomized, double-blind, phase 3 study. *Lancet* 2009; 374: 1432-1440
 38. Sandler A, Gray R, Perry MC, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-smallcell lung cancer. *N Engl J Med* 2006; 355:2542-2550
 39. Reck M, von Pawel J, Zatloukal P, et al. Phase III trial of cisplatin plus gemcitabine with either placebo or bevacizumab as first-line therapy for nonsquamous non- *Clin Oncol* 2009; 27:1227-1234
 40. Franklin WA, Veve R, HirschFR, et al. Epidermal growth factor receptor family in lung cancer and premalignancy. *Semin Oncol* 2002; 29 Suppl 4: 3-14
 41. Raben D, Helfrich B, Chan DC et al. The effects of cetuximab alone and in combination with radiation and/or chemotherapy in lung cancer. *Clin. Cancer Res* 2005; 11:795-805
 42. Thienelt CD, Bunn PA Jr, Hanna N et al. Multicenter phase I/II study of cetuximab with paclitaxel and carboplatin in untreated patients with stage IV non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23:8786-8793

43. Robert F, Blumenschein G, Herbst RS et al. Phase I/IIa study of cetuximab with gemcitabine plus carboplatin in patients with chemotherapy-naive advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin. Oncol* 2005; 23:9089-9096
44. Pirker R., Pereira JR., Szczesna A., et al. Cetuximab plus chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (FLEX): an open-label randomized phase III trial. *Lancet* 2009; 373:1525-1531
45. Lynch TJ, Patel T, Dreisbach L, et al. Cetuximab and first-line taxane/carboplatin chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: results of the randomized multicenter phase III trial BMS099. *J Clin Oncol* 2010; 28:911-917
46. Khambata-Ford S, Harbison CT, Hart LL, et al. Analysis of potential predictive markers of cetuximab benefit in BMS099, a phase III study of cetuximab and first-line taxane/carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 918-927
47. Giaccone G, Herbst RS, Manegold C, et al. Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial—INTACT 1. *J Clin Oncol* 2004; 22:777-784
48. Herbst RS, Giaccone G, Schiller JH, et al. Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial—INTACT 2. *J Clin Oncol* 2004; 22:785-794
49. Herbst RS, Prager D, Hermann R, et al. TRIBUTE: A phase III trial of erlotinib HCl (OSI-774) combined with carboplatin and

- paclitaxel chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23:5892-5899
50. Gatzemeier U, Pluzanska A, Szczesna A, et al. Phase III study of erlotinib in combination with cisplatin and gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: the Tarceva Lung Cancer Investigation Trial. *J Clin Oncol* 2007; 25:1545-1552
 51. Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, et al. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2005; 353:123-132
 52. Kim ES, Hirsh V, Mok T, et al. Gefitinib versus docetaxel in previously treated (INTEREST): a randomized phase III trial. *Lancet* 2008; 372:1809-1818
 53. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004; 304:1497-1500
 54. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004;350:2129–2139
 55. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009; 361:947-957
 56. Lee JS, Park K, Kim SW, et al. A randomized phase III study of gefitinib versus standard chemotherapy (gemcitabine plus cisplatin) as a first-line treatment for never-smokers with advanced or metastatic adenocarcinoma of the lung. *J Thor Oncol* 2009;4 Suppl:Abstr PRS.4.

57. Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2010;11:121-128
58. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al. North-East Japan Study Group. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med* 2010;362:2380-2388
59. R. Rosell, R. Gervais, A. Vergnenegre, et al. Spanish Lung Cancer Group; Erlotinib versus chemotherapy (CT) in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (p) with epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations: Interim results of the European Erlotinib Versus Chemotherapy (EURTAC) phase III randomized trial. *J Clin Oncol* 2011; 29 Suppl: Abstr 7503.
60. Vessel E. Advances in Pharmacogenetics and Pharmacogenomics. *J Clin Pharmacol* 2000; 40:930-938
61. Barale R. Farmaci e genoma; Società Italiana di Genetica Umana 200; 2:15-16
62. Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291:1304-1351
63. Meyer UA. Genotype or phenotype: the definition of a pharmacogenetic polymorphism. *Pharmacogenetics* 1991; 1: 66-67
64. Holden JA. Human deoxyribonucleic acid topoisomerases: molecular targets of anticancer drugs. *Ann Clin Lab Sci* 1997; 27:402-412
65. Goan YG, Zhou B, Hu E, et al. Overexpression of ribonucleotide reductase as a mechanism of resistance to 2,2-

- difluorodeoxycytidine in the human KB cancer cell line. *Cancer Res* 1999; 59: 4204-4207
66. Maring JG, Groen HJ, Wachters FM, et al. Genetic factors influencing pyrimidine-antagonist chemotherapy. *Pharmacogenomics J* 2005; 5:226-243
 67. Mackey JR, Mani RS, Selner M, et al. Functional nucleoside transporters are required for gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines. *Cancer Res* 1998; 58:4349-4357
 68. Danesi R, de Braud F, Fogli S, et al. Pharmacogenetics of anticancer drug sensitivity in non-small cell lung cancer. *Pharmacol Rev* 2003; 55:57-103
 69. Li D, Xie K, Wolff R, et al. Pancreatic cancer. *Lancet* 2004; 363: 1049-1057
 70. Bepler G, Kusmartseva I, Sharma S, et al. RRM1 modulated in vitro and in vivo efficacy of gemcitabine and platinum in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4731-4737
 71. Giovannetti E, del Tacca M, Mey V, et al. Transcription analysis of human equilibrative nucleoside transporter-1 predicts survival in pancreas cancer patients treated with gemcitabine. *Cancer Res* 2006; 66: 3928-3935
 72. Olausson KA, Dunant A, Fouret P, et al. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 2006; 355: 983-991
 73. Rosell R, Cobo M, Isla D, et al. Pharmacogenomics and gemcitabine. *Ann Oncol* 2006; 17 (Suppl 5), V13-V16.
 74. Spratlin J, Sangha R, Glubrecht D, et al. The absence of human equilibrative nucleoside transporter 1 is associated with reduced

- survival in patients with gemcitabine-treated pancreas adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 6956-6961.
75. Fukunaga AK, Marsh S, Murry DJ, et al. Identification and analysis of single-nucleotide polymorphisms in the gemcitabine pharmacologic pathway. *Pharmacogenomics J* 2004; 4:307-314
 76. Myers SN, Goyal RK, Oy JD, et al. Functional single nucleotide polymorphism haplotypes in the human equilibrative nucleoside transporter 1. *Pharmacogenet Genomics* 2006; 16: 315-320
 77. Kroep JR, Loves WJ, van der Wilt CL, et al. Pretreatment deoxycytidine kinase levels predict in vivo gemcitabine sensitivity. *Mol Cancer Ther* 2002; 1: 371-376.
 78. Sebastiani V, Ricci F, Rubio-Viquiera B, et al. Immunohistochemical and genetic evaluation of deoxycytidine kinase in pancreatic cancer: relationship to molecular mechanisms of gemcitabine resistance and survival. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 2492-2497
 79. Seve P, Mackey JR, Isaac S, et al. cN-II expression predicts survival in patients receiving gemcitabine for advanced non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 2005; 49: 363-370
 80. Lamba JK, Crews K, Pounds S, et al. Pharmacogenetics of deoxycytidine kinase: identification and characterization of novel genetic variants. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 323: 935-945
 81. Goan YG, Zhou B, Hu E et al. Overexpression of ribonucleotide reductase as a mechanism of resistance to 2,2-difluorodeoxycytidine in the human KB cancer cell line. *Cancer Res* 1999; 59:4204-4207

82. Davidson JD, Ma L, Flagella M, et al. An increase in the expression of ribonucleotide reductase large subunit I is associated with gemcitabine resistance in NSCLC cell lines. *Cancer Res* 2004; 64: 3761-3766
83. Bepler G, Sharma S, Cantor A, et al. RRM1 and PTEN as prognostic parameter for overall and disease-free-survival in patients with NSCLC. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1878-1885
84. Ceppi P, Volante M, Novello S, et al. ERCC1 and RRM1 gene expressions but not EGFR are predictive of shorter survival in advanced non-small-cell lung cancer treated with cisplatin and gemcitabine. *Ann Oncol* 2006; 17: 1818-1825.
85. Rosell R, Scagliotti G, Danenberg KD, et al. Transcripts in pretreatment biopsies from a three-arm randomized trial in metastatic non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 2003; 22: 3548-3553
86. Zheng Z, Cheng T, Li X, et al. DNA synthesis and repair genes RRM1 and ERCC1 in lung cancer. *N Engl J Med* 2007; 356: 131-139
87. Eliopoulos N, Cournoyer D, Momparler RL. Drug resistance to 5-aza-2'-deoxycytidine arabinoside conferred by retroviral mediated transfer of human cytidine deaminase cDNA into murine cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 1998, 42:373-378
88. Yue L, Saikawa Y, Ota K, et al. A functional single-nucleotide polymorphism in the human cytidine deaminase gene contributing to ara-C sensitivity. *Pharmacogenetics* 2003; 13: 29-38

89. Sugiyama E, Kaniwa N, Kim SR, et al. Pharmacokinetics of gemcitabine in Japanese cancer patients: the impact of a cytidine deaminase polymorphism. *J Clin Oncol* 2007; 25: 32-42
90. Yonemori K, Ueno H, Okusaka T, et al. Severe drug toxicity associated with a single-nucleotide polymorphism of the cytidine deaminase gene in a Japanese cancer patients treated with gemcitabine plus cisplatin. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2620-2624
91. Tibaldi C, Giovannetti E, Vasile E, et al. Correlation of CDA, ERCC1, and XPD polymorphisms with response and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small-cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 1797-1803
92. Soo RA, Wang LZ, Ng SS, et al. Distribution of gemcitabine pathway genotypes in ethnic Asians and their association with outcome in non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer* 2009; 63:121-127
93. Crinò L, Ludovini V, Pistola L, et al. Polymorphisms of genes involved in Platinum/Gemcitabine -based metabolism correlate with clinical response and toxicity in patients with advanced non-small cell lung cancer. e-Poster PD 7.4.3, 13th World Conference on Lung Cancer. San Francisco, CA, July 31-August 4, 2009.
94. Ciccolini J, Dahan L, André N, et al. Cytidine deaminase residual activity in serum is a predictive marker of early severe toxicities in adults after gemcitabine-based chemotherapies. *J Clin Oncol* 2010;28:160-165
95. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National

Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:205-216.

96. National Cancer Institute. Cancer Therapy Evaluation Programs (CTEP) Common terminology criteria-Version 3.0. Bethesda (MD) (1999): Division of Cancer Treatment and Diagnosis, National Cancer Institute. Available at :<http://ctep.cancer.gov/reporting/ctc.html>.
97. Marsh S, Mallon MA, Goodfellow P, et al. Concordance of pharmacogenetic markers in germline and colorectal tumour DNA. *Pharmacogenomics* 2005;6:873-77
98. Ruiz van Haperen VW, et al. Regulation of phosphorylation of deoxycytidine and 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine); effects of cytidine 5'-triphosphate and uridine 5'-triphosphate in relation to chemosensitivity for 2',2'-difluorodeoxycytidine. *Biochem Pharmacol* 51:911-8;1996.
99. Wacholder S, Chanock S, Garcia-Closas M, et al. Assessing the probability that a positive report is false: an approach for molecular epidemiology studies. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96:434-442
100. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Eng J Med* 2010; 363: 1693-1703
101. Danesi R, Altavilla G, Giovannetti E, et al. Pharmacogenomics of gemcitabine in non-small-cell lung cancer and other solid tumors. *Pharmacogenomics* 2009; 10: 69-80
102. Farrell J, Bae K, Guha C, et al. Correlation of cytidine deaminase single nucleotide polymorphisms and toxicity from gemcitabine in patients with pancreatic cancer from RTOG

9704. In proceeding of the American Society of Clinical Oncology Gastrointestinal Cancers Symposium 2009; Abstr 115
103. Okazaki T, Javle M, Tanaka M, et al. Single nucleotide polymorphisms of gemcitabine metabolic genes and pancreatic cancer survival and drug toxicity. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 320-329
104. Dahan L, Ciccolini J, Duluc M, et al. Evaluation of extensiveness in CDA as a marker of treatment failure in digestive cancer patients treated with gemcitabine-based chemotherapy. In proceeding of the American Society of Clinical Oncology Gastrointestinal Cancers Symposium 2010; Abstr 118
105. Ciccolini J, Mercier C, Dahan L, et al. Integrating pharmacogenetics into gemcitabine dosing-time for a change? *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 8:439-444

7. Appendici

Appendice I. Classificazione clinica TNM del carcinoma polmonare non a piccole cellule

T-TUMORE PRIMITIVO

TX: il tumore primitivo non può essere definito; ne è provata l'esistenza per la presenza di cellule atipiche nell'escreato o nel liquido di lavaggio bronchiale

T0: Tumore primitivo non evidenziabile

Tis: Carcinoma in situ

T1: Tumore di 3 cm o meno nella sua dimensione massima, circondato da polmone o da pleura viscerale, e alla broncoscopia non si rilevano segni di invasione più prossimale del bronco lobare

T2: Tumore con una qualsiasi delle seguenti caratteristiche di dimensione o estensione:

superiore a 3 cm nella sua dimensione massima interessamento del bronco principale, 2 cm o più distalmente alla carina invasione della pleura viscerale associato ad atelectasia o polmonite ostruttiva che si estende alla regione ilare ma non interessa il polmone in toto

T3: tumore di qualunque dimensione che invade direttamente alcune delle seguenti strutture: parete toracica (inclusi i tumori del sulcus superiore), diaframma, pleura mediastinica, pericardio parietale; o tumore del bronco principale a meno di 2 cm distalmente alla carina ma senza interessamento della carina stessa; o associato ad atelectasia o polmonite ostruttiva del polmone in toto

T4: Tumore di qualunque dimensione che invade alcune delle seguenti strutture: mediastino, cuore, grossi vasi, trachea, esofago,

corpi vertebrali, carina; nodulo(i) neoplastico(i) separati(i) nello stesso lobo; tumore con versamento pleurico maligno

N- LINFONODI REGIONALI

Nx: Linfonodi regionali non valutabili

N0: Linfonodi regionali liberi da metastasi

N1: Metastasi in linfonodi omolaterale peribronchiali e/o omolaterale ilari e intrapolmonari, comprendendo anche l'interessamento per estensione diretta

N2: Metastasi in linfonodi mediastinici omolaterali e/o sottocarinali

N3: Metastasi in linfonodi mediastinici controlaterali e/o ilari, omo- o controlaterali scalenici, o in quelli sovraclaveari

M- METASTASI A DISTANZA

Mx: Metastasi a distanza non accertabili

M0: Metastasi a distanza assenti

M1: metastasi a distanza presenti; sono compresi anche noduli neoplastici (unici o multipli) separati in altro lobo omo- o controlaterale

Stadio	TNM
0	Tis N0 M0
IA	T1 N0 M0
IB	T2 N0 M0
IIA	T1 N1 M0
IIB	T2 N1 M0/T3 N0 M0
IIIA	T3 N1 M0/T1-T3 N2 M0
IIIB	T1-T4 N3 M0/T4 N0-2 M0
IV	T1-4 N0-3 M1

Appendice II: scala ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) per la valutazione del performance status

0: In grado di svolgere le attività normali senza restrizioni

1: Presenta restrizioni alle attività fisiche strenue, ma deambula ed è in grado di svolgere attività lievi o sedentarie, quali lavori domestici

2: Deambula, è autosufficiente, ma non può svolgere attività lavorative; in piedi per più del 50% del tempo

3: Appena autosufficiente, allettato o seduto per più del 50% del tempo

4: Completamente disabile; non autosufficiente; sempre allettato o seduto

5: Deceduto

Appendice III: criteri RECIST (*Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*) per la valutazione della risposta

Eleggibilità

Solamente pazienti con malattia misurabile al momento della valutazione basale sono stati inseriti nello studio, il cui obiettivo primario è la valutazione della risposta obiettiva del tumore.

Malattia misurabile: si ha quando è presente almeno una lesione misurabile. Se la malattia misurabile è ristretta ad una lesione solitaria, la sua natura neoplastica deve essere confermata con una indagine istologica/citologica.

Lesioni misurabili: sono quelle lesioni che possono essere misurate accuratamente in almeno una dimensione e il cui diametro maggiore sia ≥ 20 mm se valutate con le metodiche radiologiche tradizionali o ≥ 10 mm se valutate con la TAC spirale.

Lesioni non-misurabili: sono tutte le lesioni che non rientrano nel criterio suddetto: lesioni aventi diametro maggiore inferiore a 20 mm se valutate con le metodiche radiologiche tradizionali o inferiore a 10 mm se valutate con la TC spirale, lesioni scheletriche, lesioni meninge, ascite, versamento pleurico, versamento pericardico, carcinoma infiammatorio della mammella, linfangite carcinomatosa (cutanea o polmonare), lesioni cistiche ed anche masse addominali che non siano state confermate da metodiche di diagnostica per immagini.

La valutazione delle lesioni deve essere effettuata utilizzando regoli o calibri e le misurazioni devono essere riportate utilizzando il sistema metrico decimale.

La valutazione basale delle dimensioni di una lesione deve essere fatta entro 4 settimane prima dell'inizio del trattamento chemioterapico.

Le lesioni dovrebbero essere sempre valutate con la stessa metodica diagnostica durante tutto il trattamento.

Le lesioni apprezzabili all'esame clinico sono considerate misurabili solo se superficiali (ad es. noduli cutanei e linfonodi palpabili).

Metodi di Misurazione

TC e RMN sono attualmente le migliori metodiche disponibili e riproducibili per misurare le lesioni target selezionate per la valutazione della risposta. TC convenzionale e RMN dovrebbero essere effettuate con scansioni contigue ≤ 10 mm. La TC spirale dovrebbe essere eseguita utilizzando un algoritmo di ricostruzione contigua a 5 mm.

Le lesioni valutate con Rx torace sono accettabili come lesioni misurabili quando sono chiaramente definite e circondate da parenchima polmonare aerato. Comunque la TC è preferibile.

Valutazione Basale: lesioni Target e non Target

Tutte le lesioni misurabili fino ad massimo di 5 per organo ed un totale di 10, rappresentative di tutti gli organi interessati dalla malattia vengono identificate come lesioni "target" e quindi registrate e misurate nel corso della valutazione basale.

Le lesioni "target" devono essere selezionate in base alla dimensione del diametro maggiore (privilegiare le lesioni con diametro più lungo) e alla possibilità di poterle rivalutare nel corso del trattamento (con tecniche di immagine o clinicamente).

La somma dei diametri maggiori di tutte le lesioni target deve essere calcolata e registrata al momento della valutazione basale ed utilizzata in seguito come riferimento per la valutazione della risposta obiettiva del tumore.

Tutte le altre lesioni (o sedi di malattia) dovrebbero essere definite come lesioni “non target” e possono essere registrate durante la valutazione basale. La loro misurazione non è necessaria ma la loro presenza o scomparsa può essere valutata nel corso del follow-up.

Valutazione delle lesioni Target

Risposta Completa (RC): si osserva la scomparsa di tutte le lesioni “target”

Risposta Parziale (RP): si osserva una diminuzione del 30% della somma dei diametri maggiori delle lesioni “target” prendendo come riferimento la somma dei diametri maggiori calcolata al momento della valutazione basale

Progressione (PD): si osserva un aumento del 20% della somma dei diametri maggiori delle lesioni “target” prendendo come riferimento la somma più piccola dei diametri maggiori osservata dall’inizio del trattamento oppure si osserva la comparsa di una o più nuove lesioni

Stabilità (SD): non si osserva né una diminuzione del 30% della somma dei diametri maggiori delle lesioni “target” né un aumento del 20% della somma dei diametri maggiori delle lesioni “target”

Valutazione delle lesioni Non-Target

Risposta completa (CR): si osserva la scomparsa di tutte le lesioni “non target” e la normalizzazione dei livelli sierici dei markers tumorali

Stabilità (SD): rimangono una o più lesioni “*non target*” e/o i livelli sierici dei markers tumorali restano sopra i valori normali

Progressione (PD): si osservano una o più nuove lesioni e/o un inequivocabile progressione delle pre-esistenti lesioni “*non target*”

Sebbene una chiara progressione delle lesioni “*non target*” soltanto sia un evento raro, in alcune circostanze l’opinione del medico può prevalere e la progressione deve poi essere confermata dal comitato revisore o dal coordinatore dello studio.

Valutazione della migliore risposta globale

La migliore risposta globale è la migliore risposta osservata dall’inizio del trattamento fino a quando non si ha progressione o ripresa della malattia (prendendo come riferimento la somma più piccola dei diametri maggiori osservata dall’inizio del trattamento).

I pazienti che a causa di peggioramento globale dello status di salute devono interrompere il trattamento senza che si osservi l’evidenza obiettiva di una progressione di malattia dovrebbero essere classificati come pazienti con "deterioramento sintomatico" e dovrà essere fatto ogni sforzo per documentarne la progressione dopo la sospensione del trattamento

In alcune circostanze può essere difficile distinguere la malattia residua dal tessuto sano. Pertanto quando la valutazione della risposta completa dipende da questa determinazione si raccomanda di indagare la lesione residua con agoaspirato o biopsia per confermare la risposta completa.

Conferma

L’obiettivo principale della conferma della risposta obiettiva è quello di evitare un sovrastima della percentuale di risposte

osservate. Nel caso in cui non sia possibile confermare la risposta ciò deve essere chiaramente riportato nei risultati dello studio.

La risposta parziale (PR) o completa (CR) devono essere confermate eseguendo una rivalutazione delle lesioni non prima di 4 settimane dopo la prima osservazione. Intervalli superiori, se previsti dal protocollo dello studio, possono essere ugualmente appropriati.

Nel caso di SD questa deve essere confermata almeno in una successiva misurazione da eseguire dopo l'intervallo minimo previsto nel protocollo dello studio (generalmente, non inferiore a 6-8 settimane).

Appendice IV: criteri NCI-CTC versione 3.0 per la valutazione della tossicità

Tossicità	0	1	2	3	4
EMATOLOGICA					
<i>Leucociti</i>	≥ 4,0	3,0-3,9	2,0-2,9	1,0-1,9	<1,0
<i>Piastrine</i>	NLN	75,0-normale	50,0-74,9	25,0-49,9	<25,0
<i>Emoglobina</i>	NLN	10,0-normale	8,0-10,0	6,5-7,9	<6,5
<i>Granulociti Neutrofili</i>	≥ 2,0	1,5-1,9	1,0-1,4	0,5-0,9	<0,5
<i>Linfociti</i>	≥ 2,0	1,5-1,9	1,0-1,4	0,5-0,9	<0,5
GASTROINTESTINALE					
<i>Nausea</i>	Assente	Alimentazione in quantità adeguata	Alimentazione e possibile ma con rilevante riduzione	Alimentazione non rilevante	-
<i>Vomito</i>	Assente	1 episodio in 24h	2-5 episodi in 24h	6-10 episodi in 24h	>10 episodi nelle 24h, o richiede terapia parenterale
<i>Diarrea</i>	Assente	Aumento di 2-3 scariche/die	Aumento di 4-6 scariche/die o scariche notturne o crampi moderati	aumento di 7-9 scariche/die o incontinenza o crampi intensi	Aumento ≥ 10 scariche/die, o enterorragia, o richiede terapia parenterale
<i>Stomatite</i>	Assente	Ulcere non dolorose, eritema o dolore lieve	Eritema doloroso, edema o ulcere ma può mangiare	Eritema doloroso, edema o ulcere e non può mangiare	Richiede terapia parenterale o supporto enterale
EPATICA					
<i>Bilirubina</i>	NLN	-	< 1,5xVN	> 1,5-3,0xVN	> 3,0xVN
<i>Transaminasi (SGOT, SGPT)</i>	NLN	≤ 2,5xVN	2,6-5,0xVN	5,1-20,0xVN	>20,0xVN
<i>Fosfatasi Alcalina o 5'-nucleotidasi</i>	NLN	≤ 2,5xVN	2,6-5,0xVN	5,1-20,0xVN	>20,0xVN

RENALE					
<i>Creatinina</i>	NLN	< 1,5xVN	> 1,5-3,0xVN	3,1-6,0xVN	> 6,0xVN
<i>Proteinuria</i>	Nessuna Alterazione	1+ o < 0,3 g/dl o <3 g/l	2-3+ o 0,3-1,0 g/dl o 3-10 g/l	4+o > 1,0 g/dl o >10 g/l	Sindrome Nefrosica
<i>Ematuria</i>	Assente	Solo Microscopica	Macroscopica senza coaguli	Macroscopica con Coaguli	Richiede Trasfusione
ALOPECIA	Assente	Lieve Perdita di Capelli	Perdita di Capelli cospicua o totale	-	-
POLMONARE	Assente o Nessun cambiamento	Assenza di sintomi Alterazione delle PFR	Dispnea all'esercizio rilevante	Dispnea con attività normale	Dispnea a Riposo
CARDIACA					
<i>Aritmie</i>	Assenti	Asintomatiche, transitorie non richiedono terapia	Ricorrenti o persistenti, non richiedono terapia	E' necessaria terapia	Richiedono monitoraggio; ipotensione, tachicardia, tachicardia ventricolare o fibrillazione
<i>Funzione</i>	Normale	Assenza di sintomi, riduzione della frazione di eiezione a riposo <20% valore iniziale	Assenza di sintomi, riduzione della frazione di eiezione a riposo >20% valore iniziale	SCC lieve che risponde alla terapia	SCC grave e refrattario
<i>Ischemia</i>	Assente	Appiattimento non specifico delle onde T	Assenza di sintomi, alterazioni dell'onda T e del Tratto ST che suggeriscono ischemia	Angina senza evidenza di infarto	Infarto miocardio acuto
PERICARDICA	Assente	Versamento asintomatico, non richiede terapia	Pericardite (sfregamento, dolore toracico, alterazione dell'ECG)	Versamento sintomatico; è necessario il drenaggio	Tamponamento, è necessario il drenaggio tempestivo

ALLERGIA	Assente	Eruzione cutanea transitoria, febbre da farmaci <38°C	Orticaria, febbre da farmaci di 38°C lieve broncospasm o	Malattia da siero, broncospasmo, richiede terapia parenterale	Anafilassi
NEUROLOGICA					
<i>Sensoriale</i>	Assente o nessun cambiamento o	Lievi parestesie, perdita dei riflessi tendinei profondi	Deficit sensitivo obiettivo lieve o moderato; parestesie moderate	Deficit sensitivo obiettivo grave o parestesie che interferiscono con la funzione	–
<i>Motoria</i>	Assente o nessun cambiamento o	Debolezza soggettiva; nessun reperto obiettivo	Lieve debolezza obiettiva senza alterazione significativa della funzione	Debolezza obiettiva con alterazione della funzione	Paralisi
CUTANEA	Assente o nessun cambiamento o	Eruzione maculare o papulare isolata o eritema asintomatica	Eruzione maculare o papulare isolata o eritema con prurito o altri sintomi	Eruzione maculare o papulare o vescicolare generalizzata	Dermatite esfoliativa o ulcerativa