



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

**XXIV CICLO DEL DOTTORATO DI RICERCA IN
MEDICINA MATERNO INFANTILE, PEDIATRIA DELLO
SVILUPPO E DELL'EDUCAZIONE, PERINATOLOGIA**

FARMACOGENETICA DELLE MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI PEDIATRICHE

Settore scientifico-disciplinare BIO/14

**DOTTORANDA
Sara De Iudicibus**

**COORDINATORE
Prof. Alessandro Ventura**

**RELATORE
Prof. Fiora Bartoli**

ANNO ACCADEMICO 2010/2011

INTRODUZIONE	1
MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI	1
EPIDEMIOLOGIA	1
ANATOMOPATOLOGIA E SINTOMATOLOGIA	2
EZIOLOGIA E PATOGENESI	4
<i>Fattori genetici predisponenti</i>	4
<i>Risposta immunitaria dell'ospite</i>	5
<i>Fattori esterni sensibilizzanti e scatenanti</i>	6
TERAPIA FARMACOLOGICA	7
I GLUCOCORTICOIDI	9
EFFETTI FARMACOLOGICI	10
<i>Effetti collaterali del trattamento con GC</i>	11
MECCANISMO D'AZIONE DEI GLUCOCORTICOIDI.....	12
GENE DEL RECETTORE DEI GC (HGR/NR3C1)	14
<i>Polimorfismi del gene del recettore dei GC</i>	15
GLUCOCORTICOIDI E CONTROLLO DELL'INFIAMMAZIONE	16
<i>IL-1β (Interleukin 1-β)</i>	17
Polimorfismi del gene IL- β	17
MATURAZIONE/ATTIVAZIONE DELL' IL-1 β	18
<i>Famiglia NLR E NALP-1</i>	19
Polimorfismi di NALP-1	20
AZATIOPRINA	21
EFFETTI COLLATERALI DEI FARMACI TIOPURINICI	21
MECCANISMO D'AZIONE E METABOLISMO DEI FARMACI TIOPURINICI	23
ENZIMI COINVOLTI NEL METABOLISMO DELL'AZA.....	25
<i>Gli enzimi Glutazione-S-Transferasi e i loro polimorfismi</i>	25
GST-A2	25
GST-M1	26
GST-T1	26
GST-P1	27
<i>L'enzima Tiopurina-S-Metiltransferasi e i suoi polimorfismi</i>	27
<i>L'enzima Aldeide Ossidasi</i>	28
<i>L'enzima Inosina Trifosfato Pirofosfatasi</i>	29
SCOPO DELLA TESI	30
MATERIALI E METODI	32
PAZIENTI	32
STUDIO RETROSPETTIVO SULLA FARMACOGENETICA DEI GC	32
STUDIO RETROSPETTIVO SULLA FARMACOGENETICA DELL'AZA.....	34

STUDIO DEI POLIMORFISMI GENETICI	35
ESTRAZIONE DEL DNA DA SANGUE PERIFERICO	35
PCR.....	35
<i>RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)</i>	39
<i>ASO-PCR</i>	40
<i>PCR-MULTIPLEX</i>	41
METODICA DI GENOTIPIZZAZIONE CON SONDE TAQMAN	42
DOSAGGIO DEI METABOLITI DELL'AZATIOPRINA	43
PREPARAZIONE DEL LISATO DA SANGUE INTERO	43
PREPARAZIONE DEI CAMPIONI.....	43
CURVA DI TARATURA	44
HPLC: STRUMENTO ANALITICO E CONDIZIONI CROMATOGRAFICHE	45
<i>Elaborazione dei dati cromatografici</i>	46
COLTURE PRIMARIE DI LINFOCITI	47
ISOLAMENTO DEI LINFOCITI DA SANGUE PEIFERICO	47
COLTURA DEI LINFOCITI E TRATTAMENTO.....	48
SAGGIO DELLA TIMIDINA TRIZIATA CON VALUTAZIONE DELL'IC50	48
PRERAPAZIONE DELLA SOLUZIONE DI TIMIDINA TRIZIATA.....	49
LETTURA DELLA RADIOATTIVITA'	49
ANALISI STATISTICA.....	50
<i>RISULTATI</i>	52
FARMACOGENETICA DEI GC.....	52
STUDIO DEI POLIMORFISMI DEI GENI NR3C1, NALP-1 E IL-1 β	52
FARMACOGENETICA DELL'AZATIOPRINA	60
STUDIO IN VITRO SULLA SENSIBILITA' AGLI STEROIDI.....	71
STUDIO IN VITRO SULLA SENSIBILITA' ALL'AZATIOPRINA.....	73
<i>DISCUSSIONE</i>.....	75
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	83

INTRODUZIONE

MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI

Con il termine *malattie infiammatorie croniche intestinali* (MICI) si intende un gruppo di patologie accomunate da un'infiammazione cronica del tratto gastro-intestinale. Tra queste, le più rappresentative sono la malattia di Crohn (MC) e la rettocolite ulcerosa (RCU), che presentano alcune caratteristiche in comune quali:

- interessamento infiammatorio dell'intestino;
- cronicità;
- eziopatogenesi ancora ipotetica;
- associazione con malattie extraintestinali;
- possibile compromissione della crescita;
- frequente ricorso alla chirurgia;
- risposta tendenzialmente buona alla terapia corticosteroidea;
- familiarità.

EPIDEMIOLOGIA

L'età di massima incidenza delle MICI si colloca nel terzo decennio di vita, tuttavia più di un terzo dei casi insorge prima dei sedici anni e questi sono in continuo aumento nei paesi occidentali: mentre l'incidenza della RCU è rimasta costante quella del MC è aumentata molto negli ultimi anni in pazienti in età pediatrica [1]. Le cause di questa precocità non sono ancora del tutto chiare ma sembrano essere attribuibili ad un miglioramento generale delle condizioni igienico sanitarie con conseguente ridotta incidenza di infezioni intestinali nell'infanzia: è stato infatti suggerito che l'eccessiva igiene, riducendo il contatto con gli agenti infettivi, impedisca la corretta maturazione del sistema immunitario: questo spiegherebbe anche perché queste malattie siano più frequenti nei paesi con alto tenore di vita. Diversi studi hanno infatti dimostrato che le MICI hanno un'incidenza variabile

anche a seconda della collocazione geografica e sono più comuni nelle aree industrializzate rispetto alle aree rurali:

- negli Stati Uniti, Inghilterra, Norvegia e Svezia l'incidenza è di 11 casi per 100.000 persone per la RCU, e di 7 per il MC.
- nei paesi dell'Europa meridionale, in Sud Africa e in Australia l'incidenza è di 2,0-6,3 casi per 100.000 persone per la RCU, e 0,9-3,1 per il MC.
- in Asia e Sud America, invece, le MICI sono molto rare con un'incidenza di 0,8 casi per 100.000 persone

ANATOMOPATOLOGIA E SINTOMATOLOGIA

Sia nel MC che nella RCU il decorso è caratterizzato da periodi di acuzie e remissioni, senza che vi siano elementi per prevedere l'evoluzione della malattia per quanto riguarda la durata e la gravità. Si tratta tuttavia di malattie distinte e ben distinguibili sul piano anatomico-patologico e clinico.

Le differenze più evidenti tra le due malattie sono riportate in Tabella 1:

MC	RCU
Colpisce qualsiasi parte del tubo digerente	Colpisce solamente il colon
Porta ad un infiammazione anche negli strati più profondi	Porta ad un infiammazione solo della mucosa
Presenta aree sane interposte alle aree malate	Presenta un'estensione continua

Tabella 1: Principali differenze tra MC e RCU

Il MC colpisce qualsiasi tratto dell'intestino anche se sono interessati più frequentemente il tenue e il colon; la mucosa intestinale viene interessata in modo discontinuo con segmenti di mucosa gravemente danneggiati che si alternano ad altri in cui la mucosa ha un aspetto apparentemente normale, inoltre l'infiammazione può estendersi anche agli strati più profondi della mucosa.

I sintomi più frequenti nel MC sono diarrea e dolori addominali crampiformi, febbre, sanguinamento rettale e perdita dell'appetito con conseguente dimagrimento). I sintomi possono variare da lievi a più severi, ma in generale le persone affette da MC possono condurre una vita attiva e continuare il loro lavoro.

Nel MC l'intensità della malattia viene classificata in tre categorie:

- lieve/moderata: il paziente è in grado di tollerare l'alimentazione orale senza manifestazioni di disidratazione, tossicità, ostruzione o perdita ponderale;
- moderata/grave: i sintomi sono più pronunciati, quali febbre, perdita ponderale, dolori addominali, nausea e vomito intermittenti o anemia significativa;
- grave/fulminante

Sono inoltre utilizzati, per la classificazione della malattia degli "score" clinici internazionali adattati al bambino come il PCDAI (Pediatric Crohn's Disease Activity Index) elaborato su dati anamnestici, principali manifestazioni intestinali ed extra intestinali e esami di laboratorio [2]. Il "range" va da 0 a 100 con remissione generalmente indicata da valori al di sotto di 10.

La RCU invece è una malattia infiammatoria cronica che colpisce il retto e si estende verso il colon in modo continuo senza che vi siano delle aree intermedie risparmiate dalla malattia; solo lo strato mucoso intestinale è interessato dall'infiammazione. I sintomi tipici della RCU sono diarrea (con o senza presenza di sangue) e dolori addominali crampiformi [3].

Come per il MC, l'intensità' della RCU viene classificata in tre categorie:

- lieve: il paziente presenta fino a quattro scariche al giorno di feci con sangue e nessun segno di tossicità sistemica;
- moderata: il paziente presenta fino a sei scariche al giorno di feci con sangue e minimi segni di tossicità sistemica;
- grave: il paziente presenta più di sei scariche al giorno di feci con sangue, e segni di tossicità sistemica come febbre, tachicardia, anemia, alterazione di parametri ematici.

La gravità della RCU, come per il MC, viene classificata anche utilizzando "score" clinici internazionali adattati al bambino come il RCU-Index elaborato su caratteristiche demografiche, gravità della malattia (inattiva, lieve, moderata e

severa) e esami di laboratorio. Anche in questo caso valori al di sotto di 10 sono considerati in remissione.

EZIOLOGIA E PATOGENESI

L'eziologia delle MICI è sconosciuta, ma si ipotizza un'alterazione multifattoriale che comprende:

- Fattori genetici predisponenti
- Risposta immunitaria dell'ospite
- Fattori esterni sensibilizzanti e scatenanti.

Fattori genetici predisponenti

La predisposizione genetica e' stata da tempo riconosciuta come un fattore importante delle MICI; tuttavia non e' stato possibile identificare un unico gene che determini queste patologie, ma almeno quattro geni associati sembrano essere associati in particolar modo al MC:

Nucleotide-binding Oligomerization Domain containing 2 (NOD2)

Interleukin 23 Receptor (IL23R)

Autophagy-related protein 16-1 (ATG16L1)

Inflammatory Bowel Disease 5 (IBD5).

NOD2 è un recettore coinvolto nel riconoscimento di componenti batteriche, e la sua stimolazione induce l'attivazione di NF-kB e la sintesi di citochine proinfiammatorie. Mutazioni del gene NOD2, localizzato sul cromosoma 16p12, sono state associate al MC nelle popolazioni caucasiche ed in particolare i polimorfismi Arg702Trp, Gly908Arg e Leu1007fsinsC. Questi tre polimorfismi sembrano essere correlati ad un aumentato rischio di sviluppo del MC [4].

Recentemente studi di associazione hanno evidenziato l'importanza dei gene ATG16L1, localizzato sul cromosoma 2. Hampe e colleghi [5] hanno studiato la pathway dell'autofagia nel MC. L'autofagia è un sistema di controllo che porta alla degradazione di componenti della cellula danneggiati. Macromolecole e organelli che devono essere eliminati vengono inglobati in vescicole derivanti dalla

membrana del reticolo endoplasmatico, con la formazione del fagosoma. Il gene ATG16L1 codifica per una proteina coinvolta nella formazione del fagosoma durante l'autofagia. In numerosi studi è stata dimostrata l'associazione del polimorfismo Ala197Thr del gene ATG16L1, associato a minor formazione del fagosoma, con un aumento della suscettibilità al MC [6].

IL23R e il suo ligando IL23 sono una componente chiave della pathway immunoregulatoria. IL23, legandosi al recettore IL23R, attiva le cellule T portando ad un aumento di IL6, citochina implicata nel danno tissutale e nell'infiammazione cronica caratteristici delle MICI. Il gene IL23R, situato sul cromosoma 1p31, presenta un polimorfismo, Arg381Gln, associato ad una riduzione dell'attività dell'IL23 e ad un effetto protettivo verso il MC [7].

Infine, il locus IBD5 è un'area localizzata sul cromosoma 5q31. Su questa regione sono stati individuati 2 geni candidati (Organic Cation Transporter 1 e 2; OCTN 1 e OCTN 2) la cui funzione è di regolare il trasporto di cationi attraverso la membrana cellulare. Peltekova e colleghi [8] hanno individuato all'interno di queste regioni, due varianti (la variante allelica dell'OTCN1, SLC22A4 C/T, e la variante allelica OTCN2, SLC22A5-207 G/C) studiate in aplotipo e associate alla suscettibilità al MC. Questi polimorfismi sembrano alterare la trascrizione e la capacità funzionale dei due trasportatori.

Risposta immunitaria dell'ospite

Nei pazienti affetti da MICI vi è un'alterata risposta infiammatoria perpetuata dall'attivazione dei linfociti T. Le cellule T CD4+ attivate, presenti nella lamina propria e nel sangue periferico, secernono citochine infiammatorie: alcune attivano direttamente altre cellule infiammatorie (macrofagi e cellule B), mentre altre agiscono indirettamente reclutando nell'intestino altri linfociti, leucociti infiammatori e cellule mononucleate presenti nel sistema vascolare periferico. Le cellule T possono essere suddivise in 2 categorie principali: cellule T_{H1} (che secernono IL2, IFN- γ , TNF- α) e cellule T_{H2} (che secernono IL4, IL5, IL9, IL13): entrambe possono associarsi alla colite nel modello animale e nell'uomo. Sembra che le cellule T_{H1} inducano un'infiammazione granulomatosa transmurale simile a quella del MC, mentre le T_{H2} determinano un'infiammazione della mucosa superficiale più caratteristica della RCU [9]. Nelle MICI, una volta iniziata, la risposta infiammatoria

immunitaria è perpetuata con l'attivazione dei linfociti T e con la secrezione di citochine pro-infiammatorie quali IL1, IL6 e TNF- α che sono normalmente prodotte in risposta ad un'infezione. In condizioni normali la loro azione viene generalmente controllata per limitare il danno tissutale, in queste patologie, invece l'attività di queste citochine non è regolata, portando ad uno squilibrio tra mediatori pro e anti infiammatori [3].

Fattori esterni sensibilizzanti e scatenanti

Anche fattori virali e batterici sono stati chiamati in causa: l'interazione di un agente patogeno con il sistema immunitario potrebbe scatenare la malattia iniziando una reazione infiammatoria che il sistema immunitario stesso non riesce a controllare. Tra le infezioni virali e batteriche è stata posta particolare attenzione sul *Mycobacterium paratuberculosis*, sul *Paramixovirus* e sull'*Helicobacter*.

Fra le altre concause figurano anche alcuni fattori ambientali come la dieta e il fumo, in particolare quest'ultimo sembra portare ad un peggioramento del MC mentre alcuni studi sembrano dimostrare il contrario per i pazienti con RCU, nei quali l'astinenza da fumo peggiora l'andamento della malattia [9].

In conclusione, la causa delle MICI sembra essere la presenza di uno o più difetti genetici che possono portare ad un aumentata esposizione a componenti della microflora, e ad una reazione abnorme del sistema immune mucosale.

TERAPIA FARMACOLOGICA

A tutt'oggi una terapia farmacologica curativa per queste malattie non esiste e l'approccio terapeutico è diretto al trattamento e controllo dell'infiammazione, attraverso farmaci capaci di indurre e mantenere la remissione della malattia. Tra i farmaci maggiormente utilizzati in clinica ricordiamo:

- gli amminosalicilati
- gli antibiotici
- i glucocorticoidi (GC)
- l'azatioprina e la 6-mercaptopurina (antimetaboliti)
- il metotrexato
- la ciclosporina
- l'infliximab
- la talidomide

Pazienti con MICI di entità moderata-severa vengono trattati inizialmente con i glucocorticoidi [10]: il prednisone è il GC più utilizzato e viene somministrato ad una dose di 1-2 mg/kg/die per 2-4 settimane, con la finalità di indurre la remissione della malattia; successivamente la dose viene ridotta di 5.0 mg/settimana fino ad arrivare a 20 mg/die, e di 2.5 mg/settimana per arrivare allo scalo completo [11-13]. Questi ormoni vengono utilizzati per l'induzione della remissione e vengono poi sostituiti o associati ad altri farmaci meno tossici nella fase di mantenimento. Inizialmente circa il 90% dei pazienti manifesta un rapido miglioramento dei sintomi, ma ad un anno di distanza, si riscontra una notevole variabilità nella risposta agli steroidi: il 50% dei pazienti è infatti responsivo, il 45%, normalmente risponde, ma non riesce a scalare lo steroide e, alla sospensione, va incontro a ricadute diventando dipendente, il 5% non risponde al trattamento e viene definito resistente [12].

Visti gli importanti effetti avversi determinati da un'assunzione cronica di steroidi, particolarmente evidenti nel paziente pediatrico, la remissione della malattia viene mantenuta utilizzando diversi immunomodulatori e fra questi particolarmente efficace e di largo impiego è l'antimetabolita tiopurinico azatioprina. Gli

immunosoppressori quali azatioprina e 6-mercaptopurina, si sono dimostrati di maggior efficacia terapeutica soprattutto nel mantenimento della remissione e attualmente sono proposti fin dall'esordio nelle forme particolarmente severe di malattia particolarmente nel paziente pediatrico pediatrici [14].

Oltre agli steroidi e agli antimetaboliti tiopurinici, vengono utilizzati anche gli amminosalicilati, come ad esempio la sulfasalazina (un derivato della mesalazina), che sono efficaci nel trattamento degli episodi lievi e moderati di MICI.

Gli antibiotici metronidazolo e ciprofloxacina vengono usati come farmaci di prima linea nel MC perianale e fistoloso, e come seconda scelta in caso di mancato effetto degli amminosalicilati nei casi meno severi di malattia.

Altri immunosoppressori utilizzati in caso di mancata efficacia o tossicità degli altri farmaci sono il metotrexate che inibisce la diidrofolato reductasi e altera la sintesi del DNA, e la ciclosporina che agisce come potente inibitore della risposta mediata dai linfociti T diminuendone il reclutamento e bloccando la produzione di citochine, come IL2, IL3, IL4, IFN e TNF [14].

Pazienti che non rispondono a nessuna delle altre terapie, vengono trattati prima con l'infliximab, anticorpo monoclonale anti-TNF α e poi, in caso di mancata risposta, con la talidomide, farmaco attivo contro la stessa citochina [15]. La terapia chirurgica, essendo estremamente invalidante, è riservata ai casi con gravi complicazioni acute (perforazioni, emorragie massive), a quelli non controllabili con la terapia medica e a quelli che presentano un elevato rischio di neoplasia. Nella RCU la colectomia con preservazione del retto è quasi sempre curativa.

I GLUCOCORTICOIDI

Il composto di partenza per la sintesi dei GC è il colesterolo, che deriva principalmente dal plasma ed è presente nei granuli lipidici delle cellule dello strato intermedio della corteccia del surrene.

Questi ormoni hanno un ruolo importante in numerosi processi fisiologici tra i quali: lo sviluppo degli organi, il metabolismo delle proteine e dei grassi, l'adattamento allo stress e la sorveglianza immunitaria. Queste diverse azioni, ed in particolare la loro attività antiinfiammatoria, hanno reso i GC interessanti dal punto di vista dello sviluppo terapeutico ed infatti, a partire dal cortisolo endogeno, sono state sintetizzate nel tempo numerose molecole sintetiche e semi-sintetiche che presentano un ampio range di applicazioni cliniche (Figura 1).

Oltre all'azione glucocorticoide, il cortisolo, che è il principale GC endogeno, ha anche un'evidente attività mineralcorticoide. Modificazioni chimiche sulla molecola del cortisolo hanno prodotto composti di sintesi in cui l'azione mineralcorticoide è trascurabile, mentre è mantenuta o è aumentata l'attività antinfiammatoria. L'introduzione di un doppio legame tra gli atomi di carbonio 1 e 2, come si osserva per il prednisolone, e l'aggiunta di un gruppo metilico in posizione 6 α , come nel caso del metilprednisolone, hanno, di fatto, aumentato di 4-5 volte l'attività antinfiammatoria e ridotto gli effetti mineralcorticoidei. Desametasone e betametasone sono i più potenti steroidi antinfiammatori e derivano da modificazioni della molecola del prednisolone. Entrambi hanno un atomo di fluoro in posizione 9 α , che fa aumentare l'attività glucocorticoide, ed un gruppo metilico al carbonio 16, che riduce l'attività mineralcorticoide. Questi composti hanno un'attività antinfiammatoria 25 volte superiore rispetto a quella del cortisolo ed una lunga emivita plasmatica e biologica. Altre modificazioni sono state poi introdotte per sviluppare steroidi con elevata attività locale e scarsi effetti sistemici.

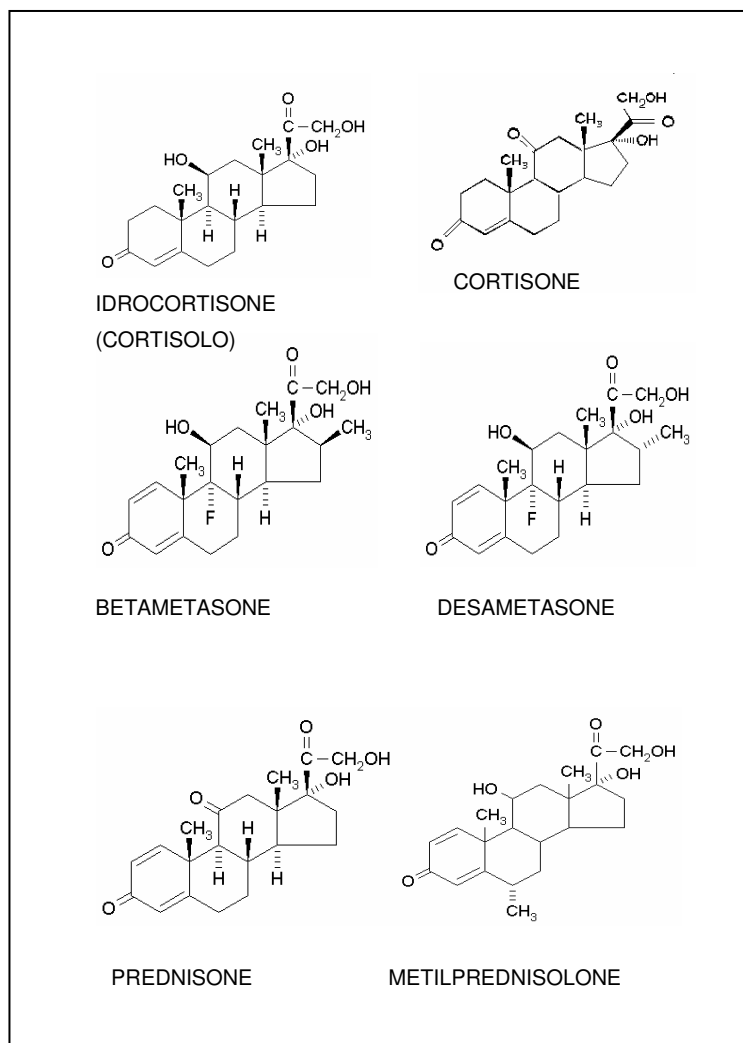


Figura 1: Strutture dei principali glucocorticoidi

EFFETTI FARMACOLOGICI

I GC hanno un gran numero di effetti farmacologici, che possono essere riassunti come segue:

1. AZIONI METABOLICHE

- Sui **CARBOIDRATI**: diminuiscono la captazione e l'utilizzazione del glucosio da parte delle cellule e aumentano la gluconeogenesi epatica; ne risulta una tendenza all'iperglicemia.
- Sulle **PROTEINE**: aumentano il catabolismo proteico e riducono l'anabolismo.

- Sul TESSUTO ADIPOSO: esercitano un effetto permissivo sugli ormoni lipolitici (ormone della crescita e amine simpaticomimetiche) che stimolano la lipolisi dei trigliceridi del tessuto adiposo delle estremità, mentre aumentano i depositi di grasso che sono più sensibili alle azioni lipogene e antilipolitiche dell'insulina: causano, di conseguenza, una particolare distribuzione del grasso corporeo (come nella sindrome di Cushing).

2. EFFETTI DI REGOLAZIONE DELL'ASSE IPOTALAMO-IPOFISI-SURRENE

Livelli plasmatici elevati dei GC naturali e sintetici portano, attraverso un'azione di controllo a feedback negativo sull'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, alla diminuzione della produzione di glucocorticoidi endogeni da parte del surrene.

3. EFFETTI ANTIINFIAMMATORI E IMMUNOSOPPRESSORI

I GC inibiscono le manifestazioni precoci e tardive dell'infiammazione, hanno effetto su tutti i tipi di reazioni infiammatorie, anche su quelle causate dall'attivazione impropria delle risposte immunitarie come nel caso delle malattie da ipersensibilità o autoimmuni. Quando usati clinicamente per contrastare il rigetto da trapianto, i GC sopprimono l'inizio e la produzione di una nuova risposta immunitaria. Nelle aree d'infiammazione acuta i GC diminuiscono il numero e l'attività dei leucociti, nelle aree d'infiammazione cronica diminuiscono l'attività delle cellule mononucleate, la proliferazione dei vasi sanguigni e la fibrosi. Inoltre, nelle aree linfoidi si osserva una ridotta espansione clonale delle cellule T e B e una diminuita azione delle cellule T secernenti citochine.

I GC riducono la produzione e l'attività di molte citochine quali interleuchine (ad esempio IL-1, IL-2, IL-6), TNF, fattori di crescita cellulare (ad esempio GM-CSF); si osserva inoltre una ridotta generazione di eicosanoidi, una diminuita produzione di IgG e una diminuzione dei fattori del complemento nel sangue

Effetti collaterali del trattamento con GC

Gli effetti indesiderati si manifestano più frequentemente quando vengono somministrate dosi elevate, ed in particolar modo quando il trattamento viene effettuato per periodi prolungati. Gli effetti indesiderati sono correlati alle azioni farmacologiche dei GC:

1. AZIONI METABOLICHE

Quando i GC sono utilizzati nella terapia antiinfiammatoria e immunosoppressiva,

si può andare incontro alla sindrome di Cushing iatrogena, caratterizzata da facies lunare, ridistribuzione lipidica, con il tessuto adiposo localizzato sul volto, collo (gobba di bufalo) e tronco (addome globoso) e strie rubre.

Tra gli effetti collaterali che si possono osservare in corso di terapie prolungate, molto importanti, soprattutto nella popolazione pediatrica, sono il rallentamento della crescita, l'ipertensione, la debolezza muscolare e l'iperglicemia che può sfociare in un diabete conclamato. Un altro effetto collaterale molto comune, particolarmente nelle donne dopo la menopausa, è l'osteoporosi.

2. EFFETTI SULL'ASSE IPOTALAMO-IPOFISI-SURRENE

Per i motivi precedentemente descritti, la sospensione improvvisa della somministrazione dei corticosteroidi può causare un'insufficienza acuta del surrene; per questo motivo l'interruzione della terapia prevede un lento scalo della dose dello steroide fino alla sospensione totale.

3. SOPPRESSIONE DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA E RALLENTAMENTO DELLA GUARIGIONE DELLE FERITE

Riducendo le reazioni infiammatorie e immuni, questi composti hanno anche l'aspetto negativo di rallentare la guarigione delle ferite e diminuire la risposta immunitaria con una conseguente maggior suscettibilità alle infezioni, e ad alcune neoplasie.

MECCANISMO D'AZIONE DEI GLUCOCORTICOIDI

I GC, per la loro natura lipofilica e le loro ridotte dimensioni, entrano nelle cellule bersaglio per diffusione passiva: una volta raggiunto il citoplasma, queste molecole interagiscono con uno specifico recettore citoplasmatico (NR3C1) [16]. In assenza del ligando, il recettore si trova nel citoplasma sotto forma di complesso multiproteico inattivo costituito dal recettore, da 2 molecole di proteina hsp90 e altre proteine come hsp70, e hop [17]. In seguito al legame con lo steroide, il recettore si dissocia da queste proteine, viene fosforilato, trasloca nel nucleo e dimerizza [18]. A questo punto il recettore attivato può interagire con specifiche sequenze di DNA nelle regioni regolatorie del gene coinvolto; tali sequenze vengono definite elementi di risposta ai GC (Glucocorticoid-Responsive Element o GRE) e solitamente sono presenti a livello del promotore di tali geni.

La modulazione positiva o negativa dell' espressione genica da parte dei GC dipende da vari fattori tra cui è di particolare importanza il tipo di GRE a cui il complesso recettore-ligando si lega. E' stato infatti dimostrato che esistono dei GRE positivi (GREp), per cui il legame con il recettore attivato determina l'attivazione della trascrizione genica e dei GRE negativi (GREn) che, in seguito al legame, reprimono la trascrizione genica [19]. L'attivazione genica GC-mediata riguarda principalmente enzimi legati al metabolismo del glucosio e degli acidi grassi, GILZ (GC-induced leucine zipper) una proteina che attiva la pathway di NF-kB e la proteina annessina 1 che va ad inibire l'enzima fosfolipasi A2 e, di conseguenza, la liberazione dell'acido arachidonico. I geni down-regolati dai GC sono diversi e includono: la prolattina, la subunità α della gonadotropina corionica (Saatcioglu et al., 1994), la collagenasi di tipo I, le cicloossigenasi, ma soprattutto le citochine proinfiammatorie come IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ , TNF- α e GM-CSF [20]. La regolazione trascrizionale negativa può essere causata anche dal legame diretto proteina-proteina con fattori di trascrizione, come ad esempio AP-1 e NF-kB, che in questo modo non sono più in grado di legarsi ai propri siti di legame al DNA [21].

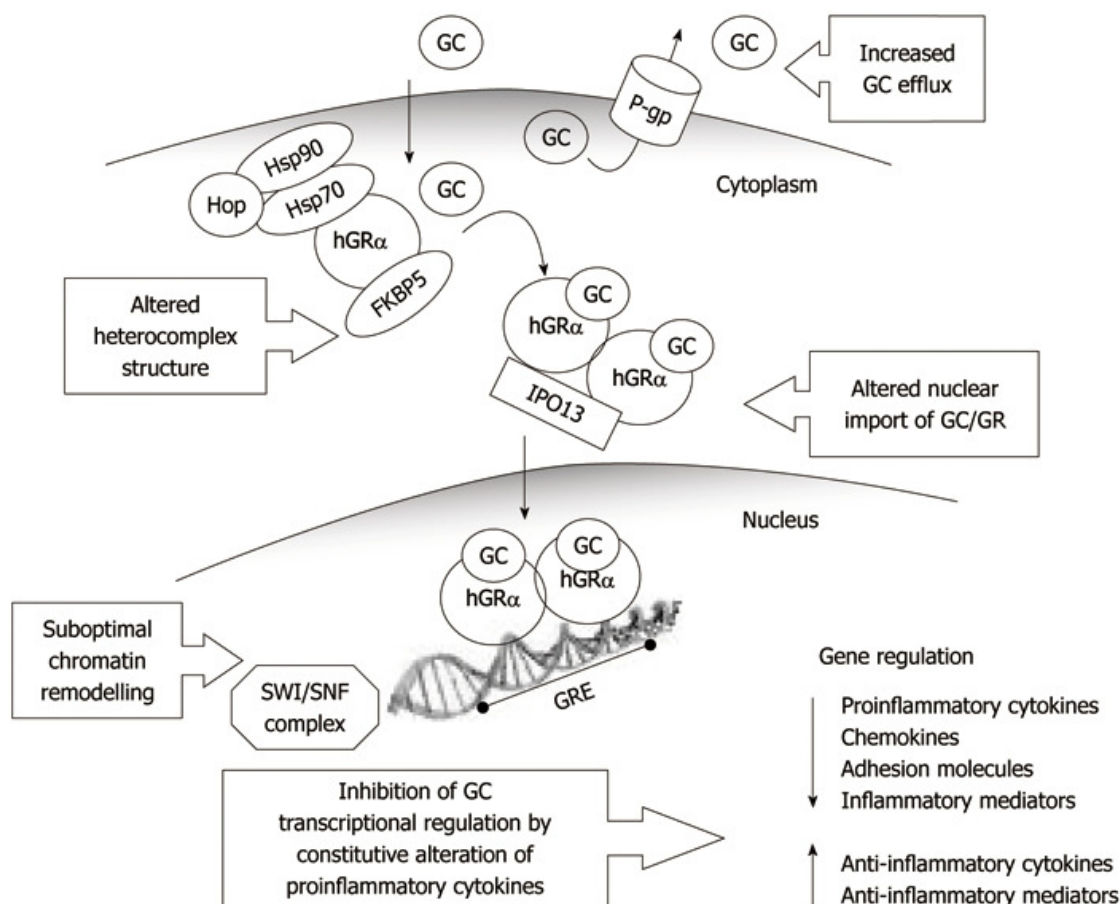


Figura 2: Sintesi schematica del meccanismo d'azione dei GC

GENE DEL RECETTORE DEI GC (hGR/NR3C1)

Il gene umano del recettore per i glucocorticoidi (NR3C1) è localizzato sul cromosoma 5 e consiste di 9 differenti esoni [22]. L' esone 2 codifica per il dominio regolatorio N-terminale, gli esoni 3 e 4 codificano per il dominio che lega il DNA e gli esoni dal 5 a 9 codificano per il dominio di legame al ligando [23].

NR3C1 presenta numerose isoforme, che possono essere distinte in varianti di splicing e varianti di traduzione: le varianti di splicing sono rappresentate principalmente dalle isoforme hGR α e hGR β e vengono prodotte per splicing alternativo del trascritto primario di hGR sull'esone 9. hGR α deriva dal legame della fine dell'esone 8 con l'esone 9 α , mentre hGR β è generato da uno splicing che lega la fine dell'esone 8 con l'esone 9 β . La traduzione dei due mRNA dà origine a due proteine, che sono identiche per 727 aa, ma differiscono per il C-

terminale, in quanto hGR α ha 50 aa addizionali, mentre hGR β ha una sequenza di 15 aa addizionali non omologhi. Questa differenza nelle sequenze al C-terminale determina anche una diversità nel legame al ligando: hGR α infatti lega i GC con alta affinità e regola la trascrizione dei geni bersaglio, mentre hGR β non lega i GC ed è trascrizionalmente inattivo; hGR β inoltre regola negativamente hGR α .

Polimorfismi del gene del recettore dei GC

Il gene NR3C1 è altamente polimorfico; sono state identificate numerose mutazioni, estremamente rare, correlate ad un fenotipo di resistenza anche ai GC endogeni. Nel caso di una resistenza totale ai GC, queste mutazioni sono incompatibili con la vita [24]. Oltre a queste mutazioni molto rare, sono stati identificati alcuni polimorfismi; alcuni sono stati correlati clinicamente al fenomeno della resistenza, altri invece ad un'aumentata sensibilità al trattamento con questi ormoni.

- POLIMORFISMO ER22/23EK (rs6189, rs6190)

Tale polimorfismo è correlato ad una ridotta sensibilità ai GC e consiste in due mutazioni puntiformi nei codoni 22 e 23 dell'esone 2: la prima mutazione è silente, la seconda invece determina un cambiamento amminoacidico da arginina a lisina, per la sostituzione di una guanina con un'adenina in posizione 200.

In uno studio condotto su un campione di popolazione sana in età avanzata è emerso che il polimorfismo ha una frequenza dell'8.9% in eterozigosi. Nel gruppo di pazienti più anziani (67-82 anni), il numero dei portatori dell'allele ER22/23EK è maggiore (12,9%) rispetto al gruppo dei più giovani (53-67 anni, 4,9%; $P < 0,05$). I portatori della forma mutata del gene, dopo somministrazione di desametasone, hanno concentrazioni più alte di cortisolo sierico e concentrazioni più basse di insulina (a digiuno) e di colesterolo LDL. Questi dati suggeriscono che i portatori dell'allele ER22/23EK sono relativamente più resistenti agli effetti dei GC e hanno quindi un profilo metabolico migliore, ciò sembra essere confermato dal fatto che vi è un maggior numero di portatori dell'allele ER22/23EK nel gruppo di soggetti anziani [25].

- POLIMORFISMO N363S (rs6195)

Tale polimorfismo è presente nel nucleotide 1220 dell'esone 2 e determina un cambio da adenina a guanina, con conseguente sostituzione di una serina con

un'asparagina nel codone 363: esso interessa la porzione del recettore responsabile della transattivazione ed è presente nel 6% della popolazione [26].

Gli eterozigoti per questo polimorfismo hanno un'aumentata sensibilità ai GC, e un indice di massa corporea (BMI) maggiore rispetto ai soggetti wild-type.

- POLIMORFISMO *BclI* (rs41423247)

Questo polimorfismo, situato nell'introne 2 del gene dell'NR3C1, è stato identificato in una sostituzione nucleotidica da citosina a guanina, 646 nucleotidi a valle dell'esone 2. Anche se i dati riportati nei diversi studi non sono univoci, [27] è possibile affermare che questo polimorfismo si associa ad un alto BMI, maggior incidenza di ipertensione e maggior sensibilità all'insulina [28], tutti indici di aumentata sensibilità ai GC.

- POLIMORFISMO *TthIII* (rs10052957)

Questo polimorfismo consiste in una sostituzione C>T nel promotore del gene NR3C1, ed è stato correlato ad elevati livelli diurni di cortisolo, e a ridotta risposta al cortisolo dopo somministrazione di 1 mg di desametasone [29].

- POLIMORFISMO GR-9 β (rs6198)

Tale polimorfismo è situato nella regione 3'-UTR del gene, e comporta una stabilizzazione dell'mRNA dell'isoforma β del recettore, e quindi un'aumentata espressione di questa isoforma del recettore inattiva [30]. Questo SNP è stato studiato in aplotipo con i polimorfismi *TthIII* e ER22/23EK, e la co-presenza di queste tre varianti è stata associata a resistenza ai GC in pazienti con sclerosi multipla [31].

GLUCOCORTICOIDI E CONTROLLO DELL'INFIAMMAZIONE

E' stato detto che i GC sono potenti antinfiammatori e immunosoppressori. La loro attività antinfiammatoria è soprattutto rivolta al controllo della sintesi di numerose citochine. Variazioni interindividuali nella secrezione di queste citochine, tra cui IL-1 β , correlate a polimorfismi nel suo gene, potrebbero avere un importante effetto nella risposta infiammatoria e influenzare, non solo la patogenesi delle MICI, ma anche la risposta agli steroidi somministrati ai pazienti con questa malattia.

IL-1 β (Interleukin 1- β)

IL-1 β è una citochina pro-infiammatoria, membro della famiglia IL-1 e il suo gene, assieme ad altri 8 geni di questa famiglia, forma un cluster sul cromosoma 2 [32]. E' prodotta da macrofagi, monociti attivati e linfociti Th1 ed è un importante mediatore della risposta infiammatoria: dà inizio e/o amplifica un'ampia varietà di effetti associati con l'immunità innata e con la risposta dell'ospite all'invasione microbica e al danno tissutale; inoltre ha un ruolo importante nella generazione di risposte sistemiche e locali alle infezioni ed è una tra le cause di infiammazione cronica e acuta [33]. L'IL-1 β è coinvolta in un'ampia varietà di attività cellulari, tra cui la proliferazione cellulare, il differenziamento e l'apoptosi. Come descritto precedentemente, nelle MICI vi è un disequilibrio nella regolazione infiammatoria, queste malattie, e in particolare il MC, sono caratterizzate da un profilo Th1 che coinvolge l'up-regolazione, non solo del TNF- α , ma anche dell'IL-1 β [34].

Polimorfismi del gene IL- β

Il gene che codifica per tale citochina è localizzato sul cromosoma 2, assieme ad altri 8 geni della famiglia delle citochine IL-1. Sono state identificate diverse varianti geniche ma gli SNPs C-511T e C3954T sono stati particolarmente studiati e sono stati associati a malattie infiammatorie, tra cui le MICI.

- **POLIMORFISMI C-511T (rs16944) e C3954T (rs1143634)**

Lo SNP C-511T è localizzato nel promotore e implica la sostituzione di una citosina con una timina, tale sostituzione riguarda anche il polimorfismo C3954T, localizzato nell'esone 5.

Balding e collaboratori [35] hanno studiato le frequenze dei polimorfismi del gene dell' IL-1 β in pazienti con MC, RCU e controlli con lo scopo di esaminarne la potenziale associazione con la patogenesi delle MICI. In tale studio è stato osservato che il genotipo 3954 non mutato ha una frequenza più alta nella popolazione malata se confrontato con i controlli. Dal momento che le MICI sono caratterizzate da più alti livelli di IL-1 β , e considerato che i soggetti con genotipo mutato hanno solitamente più alti livelli di questa citochina, i risultati di questo studio sono inaspettati. Va in ogni caso segnalato che la correlazione mostrata in

questo studio, effettuato su 172 pazienti con MICI e 389 controlli sani, è al limite della significatività; sono pertanto necessari ulteriori studi per determinare la reale associazione dei polimorfismi del gene di IL-1 β con la malattia.

Nemetz e collaboratori [36] hanno invece studiato l'influenza dei polimorfismi C-511T e C3954T sulla severità e sul decorso delle MICI: i risultati ottenuti hanno suggerito che questi 2 polimorfismi e la loro associazione sono importanti nel determinare il decorso, la severità e la localizzazione delle MICI.

MATURAZIONE/ATTIVAZIONE DELL' IL-1 β

Il riconoscimento di ligandi extracellulari, quali ad esempio prodotti della parete cellulare dei microrganismi, da parte dei Toll-like receptors (TLR) porta all'attivazione delle pathways di NF-kB che inducono, a loro volta, l'espressione e l'aumento di sintesi di IL-1 β . Questa citochina è prodotta come precursore citoplasmatico inattivo (proIL-1 β , 31 kDa) e deve essere tagliata proteoliticamente tra l'Asp116 e l'Ala117, per generare la forma attiva matura (17 kDa). Tale clivaggio è attuato dall' IL-1 β converting enzyme (ICE), meglio conosciuto come caspasi-1 [37]. La caspasi-1 fa parte di una famiglia di proteasi chiamate appunto caspasi e più precisamente fa parte di una sottoclasse di caspasi chiamate caspasi infiammatorie, che mediano la maturazione delle citochine; sono chiamate 'infiammatorie' appunto perchè i loro substrati, le citochine, giocano un ruolo critico nell'infiammazione. Dal punto di vista evolutivo le caspasi sono correlate alla classe delle proteasi cisteiniche, caratterizzate dalla presenza di una cisteina nel sito attivo, e dalla capacità di tagliare dopo un acido aspartico, che è necessario anche per il riconoscimento dei substrati. Nei mammiferi, queste caspasi sono caratterizzate dalla presenza di un dominio CARD all'N-terminale. I substrati della caspasi-1 sono la proIL-1 β , la proIL-18 e probabilmente anche un'altra citochina correlata a IL-1, la IL-33, [38]. A conferma del fatto che la caspasi-1 ha un ruolo essenziale nel processamento di queste citochine si è osservato che la sua mancanza è associata ad un' aumentata suscettibilità ad alcune infezioni.

Per svolgere la sua funzione proteolica nel processo di maturazione dell'IL-1 β , la caspasi-1 deve essere attivata dal suo stato inattivo di pro-caspasi. Gli studi effettuati per comprendere i meccanismi molecolari coinvolti nell'attivazione delle

caspasi hanno messo in luce un ruolo importante dei membri della famiglia NLR (NOD-like receptors): NALPs (NACHT leucine-rich-repeat), NAIP e IPAF che promuovono l'assemblaggio di un complesso multiproteico chiamato caspasi-1-activation complex o inflammasoma.

Famiglia NLR E NALP-1

Le molecole NLR appaiono come una nuova famiglia di recettori intracellulari dell'immunità innata in grado di riconoscere prodotti batterici specifici tra cui il lipopolisaccaride (LPS) o altri componenti della parete cellulare come il muramildipeptide (MDP), e di indurre quindi la risposta infiammatoria. La disregolazione di questi processi, conseguente a mutazioni nei geni che codificano per queste proteine, è coinvolta in numerosi disordini auto-infiammatori. La famiglia NLRs include proteine come ad esempio NOD1 e NOD2 e 3 sottofamiglie di proteine coinvolte nella formazione del caspasi-1-activation complex (inflammosoma): NALPs, IPAF e NAIPS [39].

Le proteine della famiglia NLR presentano una struttura comune: al C-terminale è presente un dominio LRR (Leucine Rich Repeat), coinvolto nel riconoscimento e nell'interazione di una grande varietà di ligandi. I domini N-terminali PYD e CARD mediano interazioni omofiliche con altre molecole che portano questi motivi: domini CARD si trovano, ad esempio, in numerose proteine pro-apoptotiche come caspasi 1 e caspasi 9. Nel caso di NOD1 e NOD2, questo dominio media l'attivazione di una cascata pro-infiammatoria mediante la sua interazione con il CARD di Rip2 (Receptor-interacting protein 2; anche conosciuta come RICK e CARDIAK), una proteina in grado di attivare NF- κ B (Bertin et al., 1999; Girardin et al., 2001). Recentemente, è stato dimostrato che NOD2 riconosce un costituente del peptidoglicano batterico, MDP. Mutazioni nel gene NOD2 rendono le cellule insensibili a MDP e incapaci di indurre l'attivazione di NF- κ B, queste mutazioni sono associate alla suscettibilità a disordini infiammatori intestinali cronici, quali tra cui il MC [40]. Oltre a NOD, la famiglia NLR comprende anche le proteine NALP: hanno identificato 14 NALP nel genoma umano: le NALP più studiate sono la 1 e la 3; esse interagiscono con una molecola adattatrice detta PYCARD o ASC (apoptosis-associated speck-like) contenente un dominio CARD carbossi-terminale un dominio PYD ammino-terminale nel processo di formazione dell'

inflammasoma [39]. Gli inflammasomi sono grandi complessi multiproteici citoplasmatici che, come conseguenza del riconoscimento di prodotti microbici e altri eventi stressanti, permettono il processo di attivazione delle caspasi e la conseguente produzione della forma matura dell'IL-1 β . In seguito al legame con PYCARD, a livello del dominio PYD, NALP 1 presenta quindi 2 domini CARD: il proprio, che interagisce fortemente con pro-caspasi-5 e tale interazione induce la sua attivazione a caspasi-5, e il dominio CARD di PYCARD che lega e recluta la pro-caspasi-1 all'inflammasoma portando al suo processamento/attivazione [39, 41]. Entrambe le caspasi sono richieste per il processamento ottimale della pro-IL-1 β a IL-1 β , infatti l'attivazione avviene più efficientemente quando entrambe sono attivate.

Polimorfismi di NALP-1

Il gene di NALP-1 è localizzato sul cromosoma 17 ed è composto da 13 esoni. Due polimorfismi di questo gene sono stati correlati alla suscettibilità ad alcune malattie autoimmuni e autoinfiammatorie, quali ad esempio la vitiligine, il LES (Lupus Eritematoso Sistemico), l'artrite reumatoide, la tiroidite autoimmune e il diabete autoimmune [42].

- POLIMORFISMO Leu155His (rs12150220)

Tale polimorfismo è localizzato nella regione codificante tra il dominio PYD N-terminale e il dominio NACHT centrale e determina la sostituzione di una timina con un'adenina, e, di conseguenza, un cambiamento nella composizione amminoacidica: la Leu in posizione 155 diventa His. La sequenza amminoacidica, con la Leu in posizione 155, è risultata essere altamente conservata nell'evoluzione, e ciò suggerisce che tale regione sia critica per la funzione della proteina [42]. Questo polimorfismo è risultato inoltre associato a resistenza al trattamento con GC in pazienti pediatrici con MICI [43, 44].

- POLIMORFISMO NEL PROMOTORE (rs2670660)

L'altro polimorfismo è localizzato nel promotore e implica la sostituzione di una timina con un cisteina; anche questa regione è altamente conservata. Questo SNP altera i motivi di legame di alcuni fattori di trascrizione, che regolano la trascrizione durante il differenziamento, la proliferazione e l'apoptosi degli eritrociti, cellule mieloidi e linfoidi [42].

AZATIOPRINA

Gli antimetaboliti tiopurinici ed in particolare l'azatioprina (AZA) sono di provata efficacia nel mantenere la remissione della malattia infiammatoria cronica intestinale.

L'AZA è un profarmaco della 6-mercaptipurina (6-MP) ed è stata sintetizzata negli anni sessanta coniugando alla 6-MP una molecola di metilnitroimidazolo [45], con l'obiettivo di aumentare l'efficacia del farmaco.

Dopo somministrazione orale, l'AZA viene attivata a 6-MP nel fegato, negli eritrociti e nei linfociti con un'emivita di 10 minuti. La maggior parte degli effetti di questo farmaco sono attribuiti alla 6-MP rilasciata; la molecola di metilnitroimidazolo sembra avere un ruolo addizionale nell'attività biologica dell'AZA, essa infatti presenta un'efficacia maggiore rispetto alla 6-MP come farmaco immunosoppressore [46].

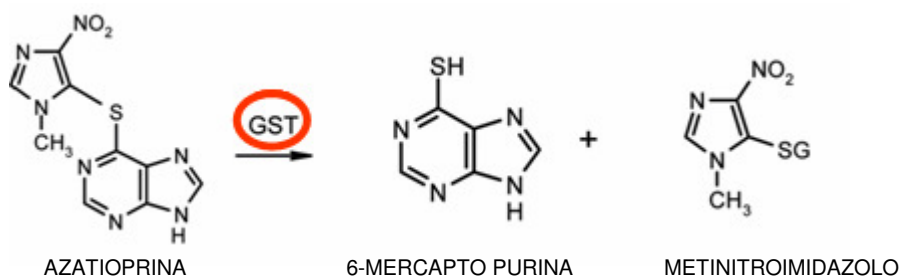


Figura 3: Azatioprina e 6-Mercaptopurina

EFFETTI COLLATERALI DEI FARMACI TIOPURINICI

Sono stati descritti numerosi effetti collaterali che sembrano essere principalmente correlati alla dose somministrata, e possono comparire mesi o anni dopo l'inizio del trattamento [47].

Tra gli effetti più comuni vi sono:

- *Reazioni ematologiche*: l'AZA in primo luogo agisce a livello del midollo osseo, portando ad una diminuzione in tutte le componenti cellulari del sangue. Leucopenia, trombocitopenia ed anemia sono dose-dipendenti. Una severa pancitopenia può essere riscontrata più o meno nell'1% dei

pazienti che ricevono una dose giornaliera superiore ai 2,5 mg/kg. La depressione del midollo è spesso ritardata; ciò comporta il bisogno di un regolare monitoraggio delle cellule del sangue, usato come misura del grado di attività del farmaco nel singolo paziente.

- *Disturbi gastrointestinali*: nausea e vomito sono comuni, ma variano considerevolmente in severità da paziente a paziente. Questa tossicità è dose-dipendente e può essere ridotta assumendo il farmaco assieme al cibo. Sono stati riportati casi occasionali di ulcera peptica, emorragie intestinali, necrosi e perforazione dell'intestino.
- *Suscettibilità alle infezioni*: leucopenia e depressione della risposta immunitaria rendono il paziente più suscettibile alle infezioni, spesso dovute ad organismi opportunisti specialmente l'*Herpes Simplex Virus* e il *Virus Varicella-Zoster*. I pazienti che usano l'AZA per prevenire il rigetto nei trapianti sono maggiormente a rischio.
- *Epatotossicità*: sono stati riportati casi occasionali di tossicità epatica dose-correlata. Gli episodi non sono solitamente severi e si risolvono completamente con la sospensione del farmaco.
- *Tossicità pancreatica*: in rari casi si è sviluppata una pancreatite.
- *Carcinogenicità*: nei pazienti che hanno ricevuto una terapia immunosoppressiva si è notato un aumento nel numero di tumori maligni, soprattutto mesenchimali o linfomi, e tale incremento sembra essere associato anche alla somministrazione di AZA.
- Come per tutti i farmaci citotossici, l'alopecia è un effetto collaterale comune, e può essere presente durante la somministrazione del farmaco. La crescita dei capelli riprende quasi sempre quando il trattamento viene sospeso.
- Molto raramente sono stati riportati casi di febbre, rash cutanei, mialgia e artralgia [48].

Le interazioni con altri farmaci sono responsabili di molti effetti tossici e le principali riguardano: l'allopurinolo (che, essendo un inibitore della AOX, riduce il metabolismo della 6-MP), altri agenti citotossici (che aumentano la tossicità del farmaco soprattutto a livello midollare) e il warfarin (che, se somministrato insieme all'AZA, presenta un'efficacia anticoagulante minore) [49, 50].

MECCANISMO D'AZIONE E METABOLISMO DEI FARMACI TIOPURINICI

L'azione farmacologica dell'AZA è basata sul rilascio di 6-MP attraverso una reazione di coniugazione con il glutatone. Questa conversione è sempre stata considerata una reazione non enzimatica. Recentemente Eklund e colleghi [51] hanno dimostrato che questa conversione è principalmente catalizzata dall'enzima GST: la reazione non enzimatica dell' AZA con il glutatone, infatti, sembra essere inferiore all'1% rispetto alle reazioni catalizzate da GST [51].

La 6-MP è altamente liposolubile per questo motivo attraversa facilmente le membrane cellulari per diffusione semplice [52]; una volta entrata nella cellula può andare incontro a 3 pathways enzimatiche in competizione tra loro. Nel suo metabolismo sono coinvolti un enzima anabolico, l'Ipoxantina Guanina Fosforibosil Transferasi (HGPRT), e due enzimi catabolici, la Xantina Ossidasi/Deidrogenasi (XDH) e la Tiopurina-S-Metiltransferasi (TPMT).

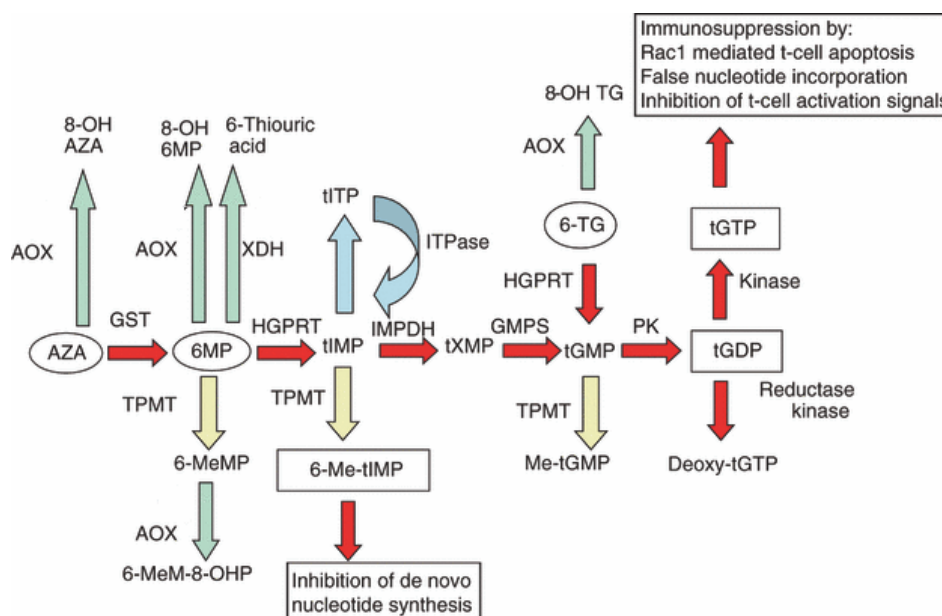


Figura 4: Metabolismo delle Tiopurine

L'HGPRT, appartenente alla salvage pathway per la sintesi dei nucleotidi, è l'enzima responsabile della via anabolica dell'ipoxantina, e quindi, anche di quella

della 6-MP. Questo enzima infatti attiva il farmaco, catalizzandone il legame in posizione 9 con una molecola di ribosio fosfato derivata dal Fosforibosil-Pirofosfato (PRPP): si forma così il nucleotide corrispondente, la Tiinosina Monofosfato (TIMP). Per conversioni enzimatiche successive, a partire da TIMP, si arriva alla formazione del metabolita tionucleotidico attivo 6-TGN. L'intermedio TIMP viene fosforilato in TITP (tiinosina trifosfato): l'enzima Inosina Trifosfato Pirofosfatasi (ITPA) controlla questa reazione, e, catalizzando l'idrolisi dell'Inosina Trifosfato (ITP) in Inosina Monofosfato (IMP) riconverte TITP in TIMP, permettendo quindi di continuare la reazione di formazione dei nucleotidi tioguaninici attivi [53].

I 6-TGN agiscono interferendo con la sintesi *de novo* delle purine e modificando la struttura del DNA. Inoltre, i 6-TGN sono analoghi dei nucleotidi ATP e GTP, essenziali nei processi di trasduzione del segnale e nei processi energetici: possono quindi competere con i composti endogeni in numerose pathways biochimiche. È stato infatti dimostrato che l'apoptosi dei linfociti T, indotta dall'AZA, è mediata dai nucleotidi 6-TGN, che causano un blocco specifico dei meccanismi antiapoptotici cellulari.

Le altre due vie, mediate dagli enzimi TPMT e XDH, portano entrambe alla produzione di metaboliti inattivi, primo step dell'eliminazione delle tiopurine dall'organismo. L'enzima TPMT porta alla metilazione del gruppo tiolico, portando alla formazione del metabolita inattivo 6-Metil-Mercaptopurina (6-MMP) [46]. La XDH, presente nel fegato e nell'intestino, ossida la 6-MP sugli atomi di carbonio in posizione 4 ed 8; si forma così l'Acido 6-Tiourico, prodotto inattivo che viene escreto con le urine [48].

Parallelamente all'azione della XDH, l'Aldeide ossidasi (AOX) ossida la 6-MP in posizione 8. Questa reazione porta alla formazione del metabolita 8-Idrossi 6-Mercaptopurina (8-OH-6MP). L'AOX agisce, inoltre, sull'AZA, e a livello del metabolita metilato dall'enzima TPMT, 6-MMP, portando rispettivamente alla formazione di 8-Idrossi-Azatioprina (8-OH-AZA) e 8-Idrossi 6-Metil Mercaptopurina (8-OH-6-MMP) [54].

ENZIMI COINVOLTI NEL METABOLISMO DELL'AZA

Come già descritto l'AZA e la 6-MP presentano un metabolismo complesso che coinvolge numerosi enzimi. In questa tesi sono stati presi in considerazione gli enzimi, coinvolti in queste vie metaboliche, i cui geni sono polimorfici.

Gli enzimi Glutathione-S-Transferasi e i loro polimorfismi

L'azatioprina è convertita in 6-MP attraverso la reazione con il glutathione: sebbene questa reazione sia in parte non enzimatica [55], alcuni studi hanno dimostrato che le GST, in particolare le isoforme A e M, sono coinvolte in questo processo [51, 56]. Gli enzimi GST inattivano molte sostanze elettrofile, sia di origine endogena che esogena, per coniugazione con il glutathione ridotto (GSH). Questa superfamiglia si compone di diverse sottofamiglie che si distinguono in base alla loro diversa specificità di substrato e alla loro localizzazione tissutale [57].

Sono state descritte tre principali famiglie delle GST, quelle microsomiali, quelle mitocondriali e quelle citosoliche. Nell'uomo la famiglia delle GST citosoliche, codificata da 17 geni, è coinvolta nelle reazioni di fase II, che catalizzano la coniugazione del glutathione con un'ampia varietà di composti.

Esistono sette sottofamiglie di GST citosoliche denominate A, M, O, P, S, T, Z; a ognuna di queste appartengono diversi isoenzimi e la loro distribuzione varia a seconda del tessuto [57]. Le famiglie denominate M, P, T e A [54, 58, 59] presentano polimorfismi genetici.

GST-A2

Di tutte le isoforme delle GST, quelle di classe A sono le più abbondanti a livello epatico e nei linfociti, e quindi maggiormente correlate al metabolismo dei farmaci [51, 60, 61].

L'isoforma GST-A2, il cui gene è collocato sul cromosoma 6p12, presenta 4 polimorfismi non sinonimi, descritti in tabella, che sono spesso studiati in aplotipo:

APLOTIPO secondo Tetlow et al, 2001	C328T Pro110Ser (rs2234951)	G335C Ser112Thr (rs2180314)	A629C Glu210Ala (rs6577)
GST-A2*A	C (Pro)	G (Ser)	A (Glu)
GST-A2*B	C (Pro)	G (Ser)	C (Ala)
GST-A2*C	C (Pro)	C (Thr)	A (Glu)
GST-A2*E	T (Ser)	G (Ser)	A (Glu)

Tabella 2: Aplotipi di GSTA 2 [62]

Gli aplotipi *A, *B, *C sono stati descritti per la prima volta da Tetlow e colleghi [62] nel 2001. Successivamente nel 2004, in due lavori pubblicati da Ning e Tetlow [63, 64], è stato identificato un nuovo polimorfismo: Pro110Ser (C328T), corrispondente all'aplotipo GST-A2*E. Ning e colleghi [63] hanno studiato l'espressione epatica dei vari aplotipi: *A, *B, *E presentano un'espressione 4 volte maggiore rispetto all'aplotipo *C, ma considerando l'efficienza catalitica verso vari substrati, *E, è risultato essere associato ad una ridotta attività catalitica dell'enzima rispetto agli altri aplotipi.

Zhang e colleghi [65] hanno confermato i risultati di Ning [63] su substrati diversi dall'azatioprina; mentre testando l'attività catalitica degli aplotipi di GST-A2 sull'AZA hanno suggerito che gli aplotipi *A, *B, *C sembrano avere un'attività comparabile tra loro, mentre l'aplotipo *E presenta un'efficienza catalitica 3-4 volte superiore rispetto alle altre varianti.

GST-M1

L'isoforma GST-M1, il cui gene è collocato sul cromosoma 1p13.3, è caratterizzata da un polimorfismo genetico che si presenta con una frequenza di circa 50% nella popolazione caucasica [66]. Questo polimorfismo porta ad una delezione parziale all'interno della sequenza codificante che provoca la totale perdita dell'attività dell'enzima. L'isoforma GST-M1 è espressa principalmente nel fegato, nel cervello, nel rene, nei polmoni, nei muscoli scheletrici, nel cuore, nell'intestino, nel midollo osseo e nei linfociti.

GST-T1

L'isoforma GST-T1, il cui gene si trova sul cromosoma 22q11, presenta anch'essa un polimorfismo genetico che porta ad una delezione parziale del gene e quindi ad

una completa assenza di attività enzimatica. Il polimorfismo si presenta con una frequenza del 20% circa negli individui caucasici [66]. Le proteine GST-T1 sono espresse nei reni, nel fegato, nell'intestino tenue, nel cervello, nel fegato e nei linfociti.

GST-P1

L'isoforma GST-P1, il cui gene si trova sul cromosoma 11q13, presenta quattro diversi polimorfismi, di cui tre estremamente rari (1a, 1c e 1d). Il polimorfismo 1b è invece il più diffuso, lo si riscontra in circa il 30% dei caucasici [67] ed è caratterizzato dalla sostituzione di un singolo nucleotide (transizione A-G alla base 1578), che determina il cambiamento amminoacidico Ile105Val nel sito di legame del substrato dell'enzima. L'enzima GST-P1 è espresso nel cervello, nel cuore, nei polmoni, nei reni, nel pancreas e nei linfociti [68].

L'enzima Tiopurina-S-Metiltransferasi e i suoi polimorfismi

L'enzima TPMT rappresenta il principale sistema di inattivazione delle tiopurine. Attraverso una reazione di metilazione, la TPMT agisce sulla 6-MP, sulla tiinosina monofosfato (tIMP) e sulla tioguanina monofosfato (tGMP) portando alla formazione rispettivamente di 6-metil mercaptapurina (6-MMP), 6-metil tiinosina monofosfato (6-M-tIMP) e 6-metil tioguanina monofosfato (6-M-tGMP).

Il gene di TPMT si trova sul braccio lungo del cromosoma 6, è lungo 34 kb, è composto da 10 esoni e 9 introni e presenta diversi polimorfismi.

L'associazione fra il polimorfismo TPMT e la tossicità delle tiopurine è stata largamente studiata nell'ambito della farmacogenetica. La Food&Drugs Administration ha approvato l'utilizzo di un kit per lo studio dei polimorfismi di TPMT nella pratica clinica per ottimizzare il dosaggio dei farmaci al fine di limitarne gli effetti collaterali e migliorarne l'efficacia terapeutica.

Gli alleli mutati più importanti sono TPMT*2 e TPMT*3; la prima variante allelica è caratterizzata dalla mutazione G238C e porta alla sostituzione di un alanina con un residuo di prolina in posizione 80.

L'allele TPMT*3 presenta invece 2 transizioni, una nell'esone 7 (G460A), e una nell'esone 10 (A719G) con conseguente sostituzione rispettivamente di un alanina con una treonina in posizione 154, e di una tirosina con una cisteina in posizione 240; quando sono presenti entrambi i polimorfismi l'allele viene identificato come

TPMT*3A, quando è presente solo la transizione G460A l'allele è TPMT*3B mentre, quando è presente la transizione A719G, l'allele è TPMT*3C. Queste variazioni portano alla riduzione o all'annullamento dell'attività catalitica della proteina [69].

Fra i caucasici, approssimativamente il 90% degli individui presenta il genotipo wild type per entrambi gli alleli, mostrando un'attività enzimatica normale, mentre il 10% presenta il genotipo eterozigote con un'attività enzimatica diminuita. Individui omozigoti mutati rappresentano solo lo 0,3% della popolazione, e, in questi soggetti, l'attività enzimatica non è rilevabile [70]. Nella popolazione asiatica la frequenza degli eterozigoti è più bassa, circa del 2-3% [71].

È stato dimostrato che, somministrando dosi standard di farmaci tiopurinici a soggetti omozigoti mutati, essi presentano concentrazioni molto più elevate di metaboliti attivi, e di conseguenza possono andare incontro ad effetti collaterali. Tali soggetti devono pertanto essere trattati con un dosaggio di azatioprina pari al 5-10% della dose normale.

È stato stimato che circa il 30% degli effetti collaterali dovuti all'AZA sia dovuto alla ridotta attività di TPMT [72].

.

L'enzima Aldeide Ossidasi

L'enzima AOX è coinvolto nel metabolismo delle tiopurine: agisce sull'AZA e la 6-MP contribuendo al catabolismo delle stesse [73] ma ciò nonostante il ruolo specifico dell'AOX resta poco chiaro e poco studiato.

Il gene dell'AOX è presente sul cromosoma 2q33: l'enzima presenta un'unica isoforma, è distribuito in molti tessuti e riconosce numerosi substrati [74, 75].

AOX oltre che sull'AZA e sulla 6-MP, agisce anche sui metaboliti 6-TG e 6-MMP, trasformandoli nei loro composti idrossilati (8-OH-AZA, 8-OH-6MP, 8-OH-TG e 6-MMP-8-OHP) rendendoli così inattivi.

Il ruolo di AOX nel metabolismo delle tiopurine non è stato largamente studiato e a questo enzima è stata attribuita poca rilevanza clinica: il significato funzionale dei suoi metaboliti è poco conosciuto nonostante questi siano stati riscontrati in quantità significativa.

In letteratura sono note variazioni interindividuali nell'attività di AOX [76], ma come questa variabilità possa essere correlata alla presenza di determinati SNPs non è

ancora noto. Recentemente, è stata evidenziata un'associazione significativa tra la ridotta risposta clinica all'AZA in pazienti con MICI e uno SNP del gene dell'AOX1: questo SNP determina il cambiamento amminoacidico in posizione 1135 (Asn-Ser) in seguito alla transizione A-G alla base 3404.

Non sono state invece evidenziate associazioni tra le reazioni tossiche alle tiopurine e il polimorfismo di AOX1 [54].

L'enzima Inosina Trifosfato Pirofosfatasi

L'Inosina Trifosfato Pirofosfatasi (ITPA), il cui gene è presente sul cromosoma 20p, è l'enzima che impedisce l'accumulo dell'ITP (inosina trifosfato) defosforilandolo a IMP (inosina monofosfato). IMP è un intermedio centrale nel metabolismo delle purine e nelle cellule nucleate viene convertito in adenina o guanina che saranno poi utilizzate nella sintesi di ATP o GTP. Un deficit dell'enzima ITPA provoca quindi un blocco nel ciclo metabolico purinico con un conseguente accumulo di ITP negli eritrociti.

Sono stati identificati cinque polimorfismi genetici sul gene ITPA ma soltanto due di questi sono rilevanti nel determinare una riduzione dell'attività dell'enzima:

ITPA C94A, determina una sostituzione amminoacidica (la sostituzione di una prolina con una treonina in posizione 32) nella struttura della proteina, che la rende inattiva;

ITPA IVS2+21 A>C, determina la sintesi di un mRNA instabile.

La riduzione nell'attività di questo enzima influenza il metabolismo degli analoghi purinici, come la 6-MP e il suo profarmaco AZA [53]. In pazienti trattati con AZA o 6-MP e con una carenza di attività dell'enzima ITPA si può riscontrare un accumulo di 6-tioinosina-trifosfato, che alcuni studi hanno dimostrato essere associato con la comparsa di effetti collaterali da AZA [77-79].

SCOPO DELLA TESI

A tutt'oggi una terapia farmacologica curativa per le MICI non esiste e l'approccio terapeutico è diretto al trattamento e controllo dell'infiammazione, attraverso farmaci capaci di indurre e mantenere la remissione della malattia. Tale terapia cronica presenta effetti avversi importanti, particolarmente rilevanti nella popolazione pediatrica che sarà l'oggetto di questo studio. Nonostante l'introduzione in terapia di farmaci biologici altamente efficaci, queste patologie vengono comunemente trattate con una combinazione di steroidi, impiegati principalmente per indurre la remissione della malattia, a cui si associa l'antimetabolita tiopurinico azatioprina, impiegato per il mantenimento della remissione. Una porzione significativa dei pazienti trattati con questa combinazione di steroidi e tiopurine non risponde in maniera soddisfacente oppure va incontro ad effetti avversi che possono essere anche gravi; le cause di questa variabilità nella risposta alla terapia non sono state completamente chiarite. In linea con queste premesse, l'obiettivo della ricerca è di mettere a punto strategie per l'ottimizzazione della terapia delle MICI, riducendo l'incidenza di effetti avversi ed aumentando l'efficacia del trattamento: a questo scopo la ricerca è stata suddivisa in due parti.

Una prima parte si è occupata di studiare retrospettivamente su pazienti pediatrici con MICI la farmacogenetica degli steroidi, con l'obiettivo di identificare marcatori che possano essere utili a predire la risposta clinica ai GC.

Per quanto riguarda questa parte di studio, la nostra ricerca si è proposta in concreto di:

1. Identificare la presenza di polimorfismi del gene del recettore per i GC (NR3C1). In questa tesi è stato studiato in particolare un polimorfismo frequente correlato ad una maggiore risposta a questi farmaci, il polimorfismo *BclI*, ed è stato valutato se la presenza di questo polimorfismo si correla alla risposta ai GC nel paziente pediatrico.
2. Valutare la presenza di polimorfismi della citochina proinfiammatoria IL-1 β , che si associano ad una maggior produzione della stessa, nonché di un polimorfismo del gene della proteina NALP-1, coinvolta nella maturazione dell'IL-1 β , anche in questo caso apparentemente associato ad una maggior

attivazione della citochina. La presenza di questi polimorfismi è stata messa in relazione con la risposta clinica ai GC.

Nella seconda parte dello studio, è stata analizzata la farmacogenetica e farmacocinetica dell'AZA, con lo scopo di predire la risposta clinica all'AZA in pazienti pediatrici con MICI, permettendo di aggiustare i dosaggi e di evitare trattamenti destinati all'insuccesso.

Numerosi studi hanno dimostrato che la tossicità e l'efficacia dell'AZA sono influenzate dalla presenza di polimorfismi genetici di enzimi coinvolti nel metabolismo di questo farmaco: lo scopo di questa tesi è stato quello di analizzare retrospettivamente un gruppo di pazienti pediatrici affetti da MICI trattati con AZA.

Su questa popolazione è stata valutata:

1. la correlazione tra i polimorfismi genetici degli enzimi coinvolti nel metabolismo dell'AZA e la sua farmacocinetica, per mezzo della quantificazione dei metaboliti plasmatici 6-TGN e 6-MMP;
2. l'eventuale correlazione tra polimorfismi genetici e risposta clinica dei pazienti;
3. l'associazione tra i livelli dei metaboliti dell'AZA e la risposta clinica.

I dati ottenuti potrebbero permettere di ottimizzare la posologia dell'AZA conoscendo il profilo genetico del paziente e/o monitorandone i livelli dei metaboliti plasmatici.

Parallelamente è stato messo a punto un modello sperimentale *in vitro* su colture primarie di cellule mononucleate, su cui testare la citotossicità sia dei GC che dell'AZA, attraverso l'incorporazione della timidina triziata. I dati ottenuti con il test *in vitro* sono stati poi correlati con la presenza di polimorfismi genetici degli enzimi coinvolti nella farmacogenetica di questi farmaci. L'obiettivo di questa parte della ricerca è stato quindi quello di standardizzare una metodica che dovrebbe permettere di predire la risposta alla terapia prima di iniziare il trattamento.

MATERIALI E METODI

PAZIENTI

STUDIO RETROSPETTIVO SULLA FARMACOGENETICA DEI GC

Lo studio retrospettivo ha incluso 154 pazienti giovani con MICI (73 femmine e 81 maschi; età mediana all'esordio della malattia \pm SD; 11.9 ± 5.05). Tutti i pazienti (82 e 2) sono stati reclutati dai reparti di Gastroenterologia degli Ospedali Infantili di Trieste, Genova e Firenze. I dati clinici dei pazienti sono stati ottenuti retrospettivamente e sono stati analizzati in cieco dai risultati delle genotipizzazioni. Lo studio è stato sottoposto ad approvazione da parte dei locali Comitati di Bioetica, e i pazienti sono stati arruolati solo dopo esser stati adeguatamente informati e aver sottoscritto il consenso informato, personalmente, quando possibile, o da parte dei genitori o tutori.

MC e RCU sono state diagnosticate attraverso criteri istologici, radiologici, endoscopici e clinici, e lo score clinico è stato valutato mediante gli indici clinici PCDAI per il MC, e PUCAI per RCU. Tutti i pazienti inclusi nello studio sono stati trattati con GC per almeno 30 giorni, e sono stati seguiti clinicamente per almeno di un anno. Il protocollo farmacologico consiste in un trattamento iniziale con prednisone 1-2 mg/kg/die per 2-4 settimane, finalizzato ad indurre la remissione della malattia; successivamente la dose viene ridotta di 5.0 mg/settimana fino ad arrivare a 20 mg/die, e di 2.5 mg/settimana per arrivare allo scalo completo. Poiché i GC hanno importanti effetti collaterali, più gravi per i pazienti in età pediatrica, e considerando l'alta percentuale di ricadute, il trattamento con steroidi viene associato precocemente ad una terapia con immunosoppressori e amminosalicilati.

Sulla base della risposta clinica ai GC, i pazienti sono stati suddivisi in 3 gruppi: responsivi, dipendenti e resistenti. I pazienti responsivi riescono a scalare lo steroide e a non assumerlo nuovamente per almeno un anno [80]. Vengono definiti dipendenti i pazienti che dopo un iniziale miglioramento, allo scalo dello steroide durante l'anno di follow up presentano ricadute; tali pazienti hanno la necessità di continuare ad assumere il farmaco [81].

In alcuni pazienti il trattamento con GC per 30 giorni non induce nessun

miglioramento: questi soggetti vengono quindi definiti resistenti.

Le caratteristiche dei pazienti considerati sono descritte in Tabella 3:

	GC-RESPONDERS (n=84)	GC-DIPENDENTI (n=55)	GC-RESISTENTI (n=15)
Età all'esordio della malattia media± sd	12.4 ± 5.5	11.05 ± 4.8	12.5 ± 3.3
Sesso			
Maschi n°; (%)	50; (59.5)	24; (43.6)	7; (46.7)
Femmine n°; (%)	34; (40.5)	31; (56.4)	8; (53.3)
Diagnosi			
MC n°; (%)	49; (58.3)	26; (47.3)	7; (46.7)
RCU n°; (%)	35; (41.7)	29; (52.7)	8; (53.3)

Tabella 3: Caratteristiche cliniche dei pazienti dello studio

Tutti i pazienti inclusi nello studio sono stati sottoposti ad un prelievo di sangue (1 - 2 ml) anticoagulato con EDTA.

STUDIO RETROSPETTIVO SULLA FARMACOGENETICA DELL'AZA

Nello studio sono stati arruolati, presso l'Unità di Gastroenterologia dell' Ospedale "Burlo Garofalo" di Trieste, 77 pazienti pediatrici affetti da MICI, in trattamento con farmaci tiopurinici da almeno 3 mesi.

Lo studio è stato approvato dal comitato etico locale ed è stato sottoscritto il consenso informato da tutti i pazienti o dai loro genitori o tutori.

I dati clinici sono stati ottenuti retrospettivamente dalle cartelle dei pazienti al momento della raccolta del prelievo per il dosaggio dei metaboliti dell'AZA.

I dati anagrafici e le caratteristiche cliniche dei soggetti (età, sesso, tipo di MICI, farmaco somministrato al momento dell'arruolamento, durata del trattamento con tiopurina) sono riportati nella Tabella 4.

CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI	n° pazienti : 77
Età all'arruolamento media (range)	15 (1-28)
Sesso	
Maschi n° (%)	40 (51,9%)
Femmine n° (%)	37 (48,1%)
Diagnosi	
Malattia di Crohn (%)	46 (59,7%)
Colite ulcerosa (%)	30 (39,0%)
Colite indeterminata n° (%)	1 (1,3%)
Dose di tiopurina in mg/kg/die mediana (range)	2,0 (0,63-3,36)

Tabella 4: caratteristiche dei pazienti

Tutti i pazienti inclusi nello studio sono stati sottoposti ad una prelievo (circa 5 ml di sangue anticoagulato con eparina e in presenza di ditiotreitolo) per il dosaggio dei metaboliti plasmatici dell'AZA, ed un prelievo di sangue (1 - 2 ml) anticoagulato con EDTA per lo studio genetico

STUDIO DEI POLIMORFISMI GENETICI

ESTRAZIONE DEL DNA DA SANGUE PERIFERICO

L'estrazione del DNA da sangue fresco o congelato, anticoagulato con EDTA, è stata eseguita con il kit GenElute™ Blood Genomic DNA (Sigma-Aldrich) a partire da 200 µl di campione che, dopo l'aggiunta di Proteinasi K (2 mg/ml, Sigma-Aldrich) e di 200 µl di una soluzione di lisi (Lysis solution C, Sigma-Aldrich), è stato incubato a 55 °C per 1 minuto. Al termine dell'incubazione sono stati aggiunti 200 µl di etanolo assoluto e il preparato è stato trasferito nella GenElute Miniprep Binding Column (Sigma-Aldrich) provvista di una membrana di silicio in grado di legare il DNA. Il campione è stato quindi centrifugato a 7.000 rcf per 1 minuto, lavato con 2 soluzioni di lavaggio (Prewash Solution e Wash solution, Sigma-Aldrich) ed il DNA è stato infine eluito aggiungendo 200 µl di soluzione di eluizione (Elution Solution, Sigma-Aldrich) e centrifugando a 7.000 rcf per 1 min.

I polimorfismi *BclI* del gene NR3C1, C3954T del gene dell'IL-1β, Leu155His del gene NALP1, A719G e G460A del gene di TPMT, A1578G dell'isoforma P dell'enzima GST e 94 C>A e IV2+21 A>C del gene dell'ITPA saranno determinati mediante la tecnica di RFLP-PCR.

PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) è una tecnica *in vitro* che permette l'amplificazione di precise sequenze di DNA utilizzando due primers oligonucleotidici scelti in base alla sequenza del gene che si vuole amplificare.

In tabella 5 sono riportate le sequenze dei primers specifici per le regioni di interesse dei geni considerati.

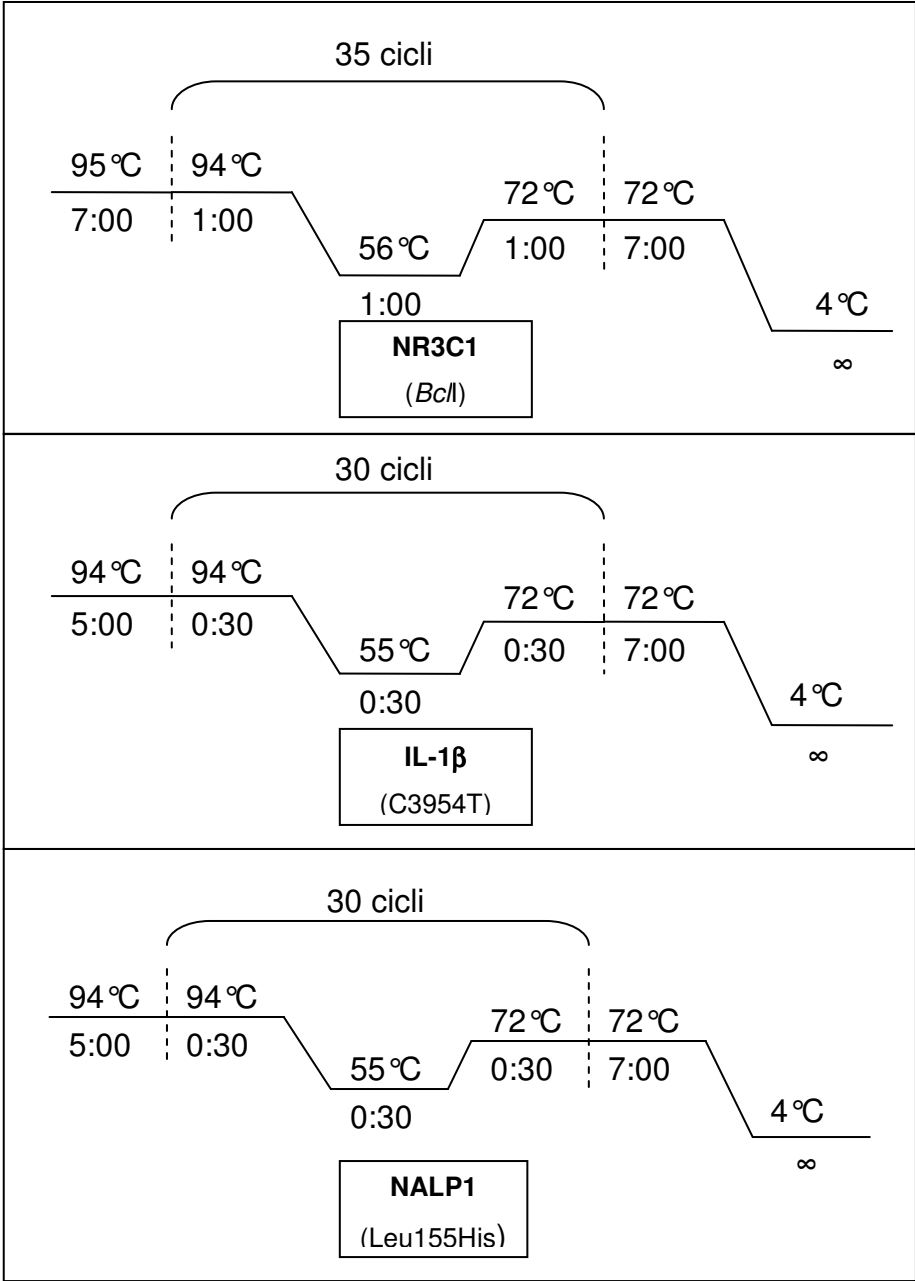
GENE	MUTAZIONE	PRIMERS	AMPLIFICATO
NR3C1	<i>Bcl</i>	F 5'-TGCTGCCTTATTTGTAATTCGT-3'	335 pb
		R 5'-AAGCTTAACAATTTTGGCCATC-3'	
IL-1 β	C3954T	F 5'-CTCAGGTGTCCTCGAAGAAATCAA-3'	194 pb
		R 5'-GCTTTTTTGTGTGAGTCCCG-3'	
NALP-1	Leu155His	F 5'-CCCCTCTACTTCAACATGGTT3'	238 pb
		R 5'-AGCACTGCTGTGGATGTG G-3'	
TPMT	A719G	F 5'-AATCCCTGCTGTCATTCTTCATAGTATTT-3'	401 pb
		R 5'-CACATCATAATCTCCTCTCC-3'	
	G460A	F 5'-AGGCAGCTAGGGAAAAAGAAAGGTG-3'	694 pb
		R 5'-CAAGCCTTATAGCCTTACACCCAGG-3'	
ITPA	94 C>A	F 5'-CAGGTCGTTCAAGATTCTAGGAGAAAAGT-3'	256 pb
		R 5'-CAAGAAGAGCAAGTGTGGGACAAG-3'	
	IVS2+21 A>C	F 5'-AAATTGACCGTATGTCTCTGGAATGTTTT-3'	204 pb
		R 5'-CAAGAAGAGCAAGTGTGGGACAAG-3'	
GST-P	A1578G	F 5'-ACCCCAGGGCTCTATGGGAA-3'	176 bp
		R 5'-AGGGGCTTCTTGTGCCCTCA-3'	

Tabella 5 : Sequenza dei primers utilizzati

Per l'amplificazione è stato utilizzato il termociclature Gene Amp[®]PCR System 9700 (PE Applied Biosystems) e come polimerasi la Red -*Taq* (Sigma-Aldrich).

Per l'amplificazione sono stati preparati 20 μ l totali di mix di reazione contenenti 2 μ l di DNA, 1 unità di Red-*Taq*, 2 μ l di buffer della Red-*Taq* (Red *Taq*™ PCR reaction buffer 10X, Sigma-Aldrich), 2 μ l di primer forward (5 pmoli/ μ l), 2 μ l di primer reverse (5 pmoli/ μ l) e 2 μ l di nucleotidi trifosfato (dATP, dGTP, dCTP, dTTP 100mM, Promega), portati a volume con acqua.

Le condizioni di PCR per ogni frammento di gene amplificato sono riportate schematicamente in Figura 5:



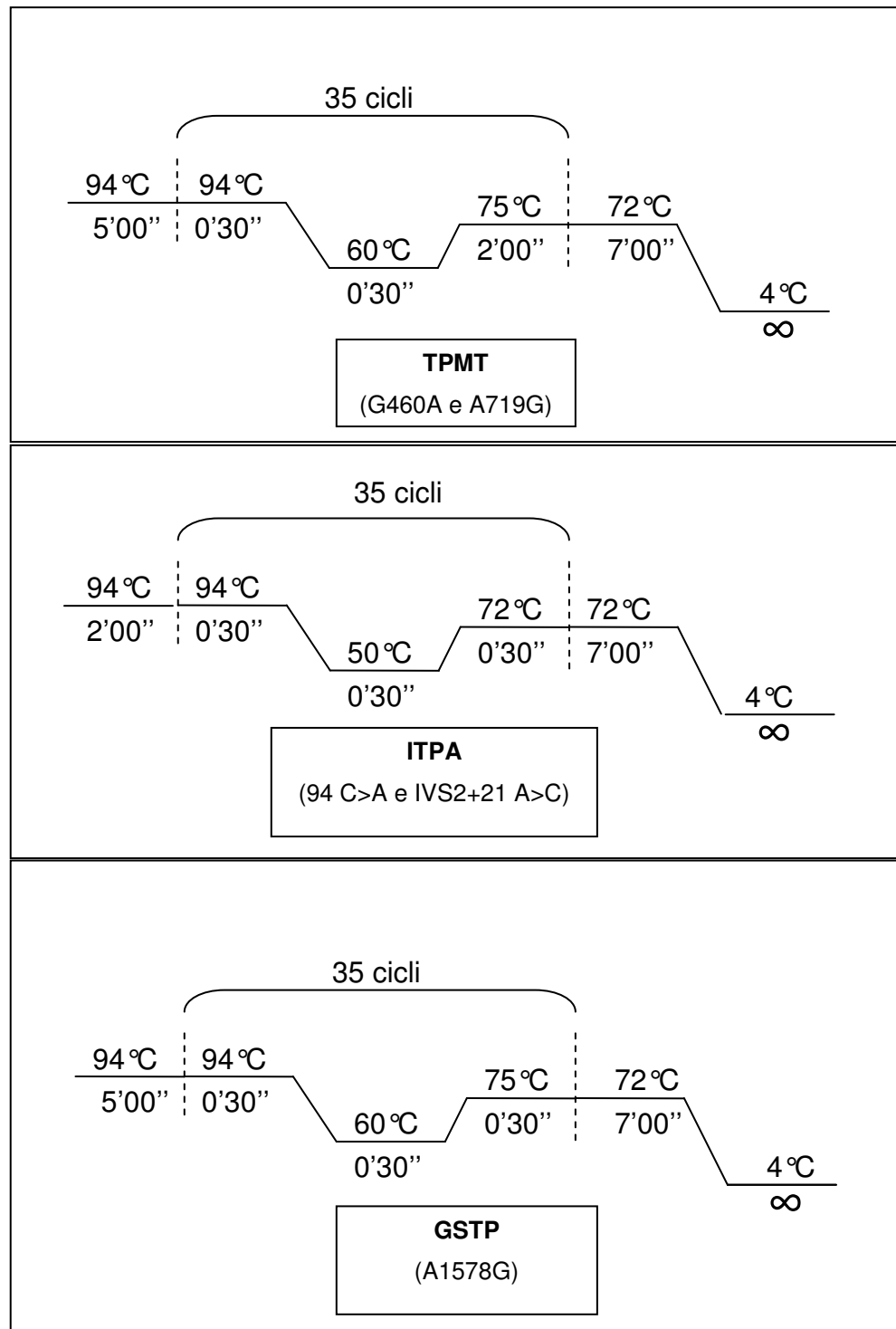


Figura 5: cicli di amplificazione dei polimorfismi studiati

I prodotti di PCR sono in seguito stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio (Sigma-Aldrich) al 2% in buffer TBE (Tris Buffer EDTA; 54 g Tris base, 27,5 g acido borico, 20 ml EDTA 0,5 M pH 8) e colorante Gel Red™ 10000 X (Biotium, Inc.) che si intercala nel DNA e ne permette la visualizzazione in luce UV. Per verificare la lunghezza dei frammenti amplificati i campioni sono stati

caricati assieme ad un marcatore di peso molecolare (100 bp Low Ladder, Sigma-Aldrich).

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Le endonucleasi di restrizione sono enzimi batterici che riconoscono tratti specifici di DNA a doppio filamento e lo tagliano in punti specifici adiacenti o interni alle sequenze riconosciute.

Per ottenere la restrizione enzimatica, per ogni campione è stata preparata una provetta contenente 5µl di amplificato, 1U di enzima specifico, 1µl di buffer (specifico per l'enzima) e l'acqua sufficiente per portare ad un volume finale di 10µl.

La mix di digestione viene incubata ad una temperatura e per un tempo specifico per ogni enzima, condizioni riportate in tabella 6.

GENE (MUTAZIONE)	ENZIMA	CONDIZIONI	TAGLIO
NR3C1 (<i>BclI</i>)	<i>BclI</i>	50 °C 90 min Gel al 2%	WT
IL-1β (C3954T)	<i>TaqI</i>	65 °C 90 min Gel al 3%	WT
NALP-1 (Leu155His)	<i>BseRI</i>	37 °C 90 min Gel al 2%	WT
TPMT (G460A)	<i>MwoI</i>	60°C 90 min Gel al 2%	WT
TPMT (A719G)	<i>AccI</i>	37°C 90 min Gel al 2%	MUT
ITPA (94 C>A e IVS2+21 A>C)	<i>XmnI</i>	37°C 16 ore Gel al 2%	WT (94 C>A) MUT (IVS2+21 A>C)

Tabella 6: Condizioni di restrizione

ASO-PCR

La PCR ASO (Allelic Specific Oligonucleotide PCR) individua le mutazioni mediante l'impiego di primers specifici per ciascun allele, senza utilizzo di endonucleasi batteriche specifiche.

Tramite PCR ASO è stato visualizzato il polimorfismo G238C: per la reazione si impiegano tre primers (Invitrogen Srl, Milano, Italia):

Fw: P2W 5'-GTATGATTTTATACAGGTTTG-3';

Fw: P2M 5'GTATGATTTTATGCAGGTTTC-3';

Re: P2C 5'-TTAATAGGAACCATCGGACAC-3'.

Per genotipizzare questa mutazione si eseguono due reazioni, una utilizzando i primers P2W e P2C ed una i primers P2M e P2C.

Il programma di amplificazione è il seguente:

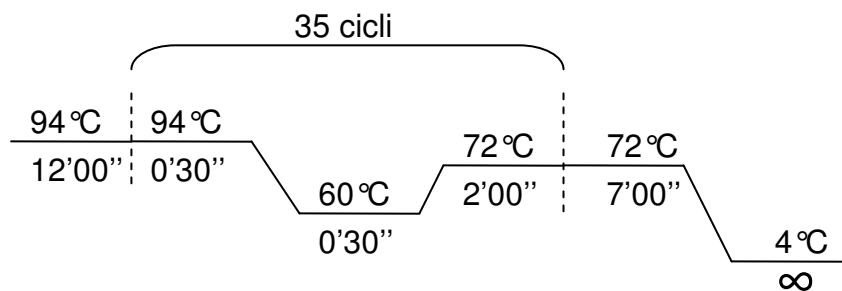


Figura 6: Ciclo di amplificazione di TPMT

Nel caso il soggetto esaminato sia wild type, si ha un prodotto con i primers P2W e P2C e nessun prodotto con i primers P2M e P2C; nel caso il soggetto sia eterozigote mutato, si ha un prodotto con entrambe le reazioni; nel caso sia omozigote mutato, si ha un prodotto solo utilizzando i primers P2M e P2C.

La visualizzazione avviene su un gel di agarosio al 2%.

PCR-MULTIPLEX

Per la genotipizzazione delle isoforme T e M dell'enzima Glutathione-S-Transferasi viene utilizzata una PCR ASO multiplex, in cui vengono impiegate contemporaneamente tre coppie di primers: una coppia specifica per l'isoforma T (480 pb), una per l'isoforma M (219 pb) ed una per il gene della β -globina (286 pb), che viene utilizzata come controllo positivo per verificare l'avvenuta amplificazione. In tutti i soggetti deve essere presente l'amplificato corrispondente alla β -globina (286pb); per i soggetti che presentano la delezione di una delle due isoforme è assente la banda corrispondente (Null); vengono definiti normali (Norm) i genotipi omozigoti wild type ed eterozigoti.

I primers utilizzati sono stati forniti dalla ditta Invitrogen Srl, Milano, Italia:

GST-M Forward: 5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3';

GST-M Reverse: 5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGC-3';

β -Globina Forward: 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGT-3';

β -Globina Reverse: 5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3';

GST-T Forward: 5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3';

GST-T Reverse: 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'.

Come programma di amplificazione è stato utilizzato il seguente:

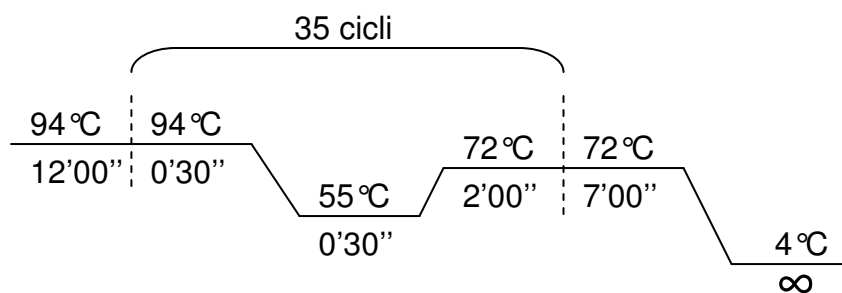


Figura 7: Ciclo di amplificazione di GST T e M

Qualora ci sia la banda corrispondente all'isoforma in analisi, il paziente sarà un soggetto Norm per quell'isoforma. Per un soggetto Null per l'isoforma M, verranno visualizzate solamente le bande di 286 pb e di 480 pb. Per un soggetto Null per l'isoforma T invece, verranno visualizzate le bande di 219 pb e 286 pb. Per un soggetto Null per entrambe le isoforme verrà visualizzata un'unica banda, quella della β -globina, di 286 pb.

METODICA DI GENOTIPIZZAZIONE CON SONDE TAQMAN

Per la genotipizzazione dei polimorfismi dei geni AOX1, MMP4, GSTA2 e NALP1 considerati, è stata utilizzata la metodica TaqMan Genotyping (ABI prism 7500 Sequence Detection System, Applied Biosystems, Foster City, CA). Questa tecnica si basa sui principi della Real-Time PCR, con l'aggiunta di sequenze specifiche complementari al frammento di DNA in cui è contenuto lo SNP oggetto di studio, abbinate a relative sonde.

Il saggio TaqMan® si basa sulla presenza nella miscela di reazione di PCR di un oligonucleotide sonda non estendibile, che ibrida specificatamente una regione del DNA bersaglio compresa tra le due sequenze degli oligonucleotidi primers.

La sonda è marcata con due molecole fluorescenti: il Reporter, una fluoresceina modificata posta all'estremità 5' e il Quencer, una rodamina modificata posta all'estremità 3', la cui fluorescenza è l'unica efficientemente misurabile quando la sonda è integra; durante la PCR, ad ogni ciclo di amplificazione l'enzima Taq polimerasi non solo duplica il bersaglio, ma, con la sua attività 5'-3' endonucleasica, degrada anche la sonda ad esso ibridata separando i due fluorocromi e rendendo così pienamente rilevabile l'emissione del reporter. Dato che una coppia di DNA duplicata durante la PCR è accompagnata dalla liberazione di una molecola di reporter, la fluorescenza relativa che si accumula nel campione è in ogni momento proporzionale alla quantità di DNA amplificato. È stato utilizzato uno strumento ABI PRISM 7900 (Applied Biosystems, Foster City, CA) in grado di funzionare contemporaneamente sia da termociclatore sia da fluorimetro.

Il programma deputato a gestire lo strumento, Sequence Detection System (SDS), acquisisce lo spettro di emissione del campione per tutta la durata della reazione di PCR e converte la variazione di fluorescenza del reporter in una rappresentazione in tempo reale della cinetica di amplificazione.

Lo SNP Genotyping assay (Applied Biosystems, Foster City, CA) contiene i due primers (Forward e Reverse) e le due sonde specifiche per ogni allele, una marcata al 5' con il fluoroforo FAM™ e l'altra marcata con il fluoroforo VIC®.

DOSAGGIO DEI METABOLITI DELL'AZATIOPRINA

I livelli dei due metaboliti principali dell' AZA, il metabolita 6-Tioguanina (6TGN) e la 6-Metilmercatopurina (6-MMP) negli eritrociti, sono stati quantificati mediante un saggio HPLC (High Performance Liquid Cromatography) effettuato sui lisati di eritrociti di pazienti; il saggio HPLC è stato condotto presso il laboratorio di Tossicologia Forense dell'Ospedale di Cattinara.

PREPARAZIONE DEL LISATO DA SANGUE INTERO

Il prelievo e' stato effettuato almeno tre mesi dopo l'inizio del trattamento con la tiopurina. Sono stati prelevati 5 ml di sangue periferico in provette contenenti 10 µl di una soluzione di ditiotreitolo (DTT; Sigma-Aldrich, Milano, Italia) alla concentrazione di 100 mg/ml. Gli eritrociti sono stati separati mediante centrifugazione a 4 °C, a 800xg per 10 minuti, lavati due volte con una soluzione fisiologica allo 0,9% e lisati in 1/2 volume d'acqua dopo averne effettuato la conta in soluzione 1:200, utilizzando una camera Bürker.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Il saggio prevede l'aggiunta a 500 µl di lisato di 10 µl di una soluzione acquosa di DTT 5 mg/10 ml. Dopo mescolamento, si aggiungono 50 µl di acido perclorico al 70% (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA), con agitazione immediata su vortex per 10 secondi. Dopo centrifugazione dei campioni a 16100 Xg per 15 minuti. Il surnatante viene lasciato per 1 ora a 95 °C; il riscaldamento prolungato a 95°C in ambiente acido dei lisati determina l'idrolisi dei nucleotidi con conseguente liberazione delle basi tioguaniniche e metilmercaptopuriniche; in particolare, la 6TGN libera 6TG, mentre il metabolita 6MMP viene convertito durante il riscaldamento in 4-amino-5-metillicarbonil imidazolo. I campioni vengono quindi messi per 10 minuti a -20 °C per bloccare la reazione di idrolisi e poi conservati a 4 °C fino al momento dell'analisi. Si prepara inoltre un bianco aggiungendo ad una eppendorf con DTT, 500 µl di lisati di eritrociti di un soggetto che non ha assunto l'azatioprina.

CURVA DI TARATURA

Per l'analisi quantitativa si prepara una curva di taratura composta da diversi punti che corrispondono a diverse concentrazioni degli standard opportunamente disciolti in sangue di pazienti che non hanno assunto il farmaco.

Bisogna preparare una mix contenente gli standard di 6-TGN (20 μM) e 6-MMP (100 μM); si prepara per ciascuna sostanza una prima soluzione 100 nM in DMSO (il peso molecolare della 6-TGN è 167,2 g/mol, mentre quello della 6-MMP è 166,2 g/mol). Ciascuna di queste due soluzioni viene diluita 1:100 in acqua distillata. A questo punto si prepara un'unica soluzione ad una concentrazione finale di 20 μM per la 6-TGN e 100 μM per la 6-MMP; per questo si aggiungono ad 880 μl di acqua distillata 20 μl di 6-TGN 1mM e 100 μl di 6-MMP 1 mM. Quindi si vortexa per circa 10 secondi. A seconda della concentrazione finale che si vuole ottenere, per ogni punto della curva, verranno aggiunti diversi volumi di questa soluzione e di sangue di un soggetto che non assume azatioprina. I volumi necessari per ogni punto sono riportati in Tabella 7.

Punto della curva di taratura	Composto	Volume di mix	Volume di sangue "bianco"	Concentrazione finale dei composti
1	6-TGN	7,5 μl	492,5 μl	300 nM
	6-MMP			1500 nM
2	6-TGN	15 μl	485 μl	600 nM
	6-MMP			3000 nM
3	6-TGN	25 μl	475 μl	1000 nM
	6-MMP			5000 nM
4	6-TGN	50 μl	450 μl	2000 nM
	6-MMP			10000 nM
5	6-TGN	75 μl	425 μl	3000 nM
	6-MMP			15000 nM

Tabella 7: volumi necessari per la curva di taratura

Le soluzioni così preparate vengono processate allo stesso modo dei campioni.

HPLC: Strumento analitico e condizioni cromatografiche

Per l'analisi si utilizza il cromatografo liquido della ditta Hewlett Packard serie 1100 con rivelatore UV diode array, dotato di autocampionatore, fornetto termostato e software "Chemstation" di gestione dati.

La colonna analitica è di tipo C18 a fase inversa Res Elut della ditta Varian mantenuta a 30°C, in cui vengono iniettati 100 µl di campione preparato come descritto in precedenza. La fase mobile è formata da tampone fosfato acido, e metanolo puro, ed è mantenuta al flusso di 1,1 ml/min. Il tampone fosfato acido 0,02 M a pH 3,5 è stato preparato con 1,3610 g di KH_2PO_4 (Sigma Aldrich, Milano, Italia) in 500 ml d' H_2O con l'aggiunta di 70 µl di H_2PO_4 (Sigma Aldrich, Milano, Italia).

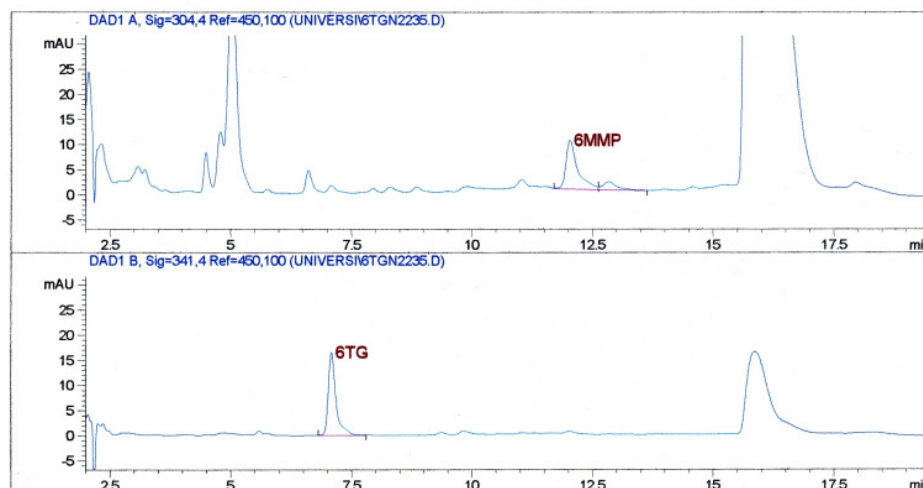


Figura 8: Curve dell'analisi HPLC

Elaborazione dei dati cromatografici

Dalle curve di taratura si sono ottenuti due coefficienti utilizzati per calcolare i valori delle concentrazioni dei metaboliti dei pazienti. I coefficienti sono stati ricavati calcolando la pendenza delle curve di calibrazione per ognuno dei due metaboliti.

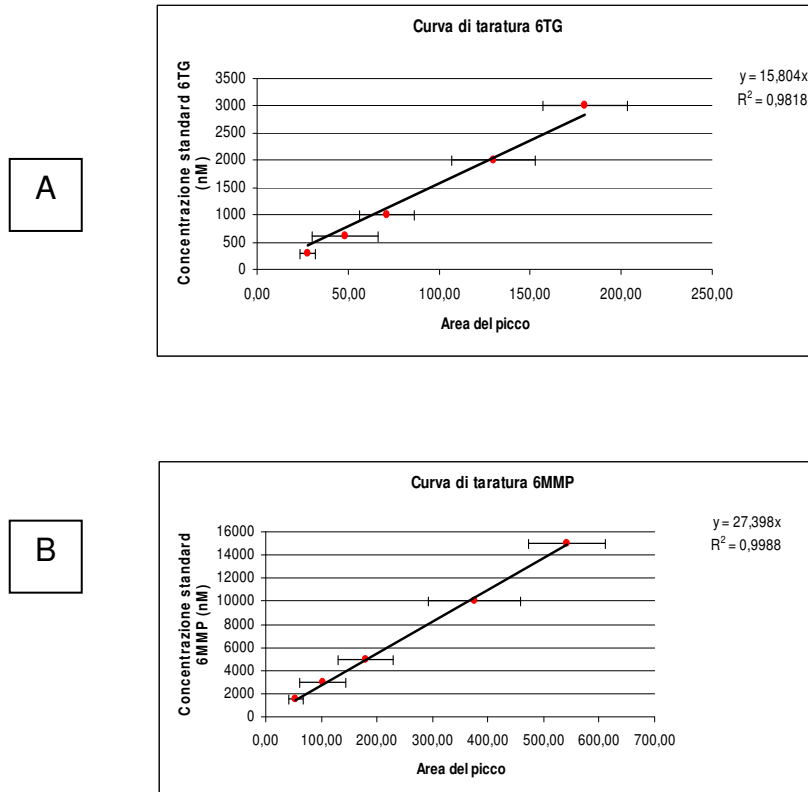


Figura 9: A) Curva di taratura per la 6-TGN; B) Curva di taratura per la 6-MMP

Le concentrazioni dei metaboliti (6-TGN e 6-MMP) dei pazienti sono state calcolate moltiplicando le aree sottostanti ai picchi, ottenuti nella corsa cromatografica, per il corrispettivo coefficiente.

$$[6\text{-MMP}] = A_{6\text{MMP}} * K_{6\text{MMP}}$$

$$[6\text{-TGN}] = A_{6\text{TGN}} * K_{6\text{TGN}}$$

Successivamente le concentrazioni ottenute sono state convertite in valori di $\text{pmol}/8 \times 10^8$ eritrociti in base alla seguente equazione:

$$x = [\text{metabolita}] * 0,8 / n^{\circ}\text{eritrociti del campione}$$

Nello specifico il range terapeutico per 6-TGN va da 235 a 450 pmol/8x10⁸ eritrociti, mentre i metaboliti 6MMP devono essere < 5700 pmol/8x10⁸ eritrociti [82].

COLTURE PRIMARIE DI LINFOCITI

Sono state allestite colture cellulari primarie di linfociti umani ottenuti da donatori di sangue (Buffy Coats) afferenti al "Centro Trasfusionale dell'Ospedale Maggiore di Trieste".

ISOLAMENTO DEI LINFOCITI DA SANGUE PEIFERICO

I linfociti sono stati separati mediante l'utilizzo di Ficoll Paque™ (Ficoll Paque™ Plus; GE Healthcare Milano; Italia), un polimero di carboidrati.

Quattro ml di sangue sono stati stratificati su 3 ml di Ficoll Paque™ in provette da 15 ml, che sono state poi centrifugate a 600 xg per 40 minuti a temperatura ambiente.

Con la centrifugazione si ottiene una separazione dei vari elementi del sangue in fasi secondo gradiente di densità: i globuli rossi e i polimorfonucleati più pesanti si troveranno sul fondo della provetta, il plasma più leggero al di sopra del Ficoll, e le cellule mononucleate in un anello tra Ficoll e plasma.

I linfociti sono stati recuperati aspirando l'anello con una pipetta Pasteur sterile, trasferiti in una provetta Falcon da 15 ml e lavati con 5 ml di PBS (Dulbecco's Phosphate Buffer Saline, Sigma) tramite centrifugazione a 600xg per 7 minuti a temperatura ambiente. È stato effettuato un secondo lavaggio eliminando il surnatante, aggiungendo 5 ml di PBS e centrifugando nuovamente a 600xg per 7 minuti a temperatura ambiente. Le cellule sono state quindi risospese in 2 ml di terreno completo (RPMI 1640 Medium senza rosso fenolo, addizionato con 10% di siero bovino fetale, 1% di Penicillina-Streptomicina e 1% di L-Glutammina).

I linfociti integri sono stati contati dopo averli diluiti 1:100 in una soluzione 1:1 di PBS-Trypan blue (Trypan blue solution 0,4%, Sigma) e PBS. Il Trypan blue è un

cromoforo con carica negativa, viene utilizzato per discriminare fra cellule vitali e cellule morte, in quanto viene incorporato solamente nelle cellule danneggiate o morte.

Le cellule sono state contate mediante l'utilizzo di una camera di Bürker, contando solamente le cellule vitali.

COLTURA DEI LINFOCITI E TRATTAMENTO

I linfociti sono stati seminati alla concentrazione finale di 2×10^5 cellule/pozzetto (in piastre da 96 pozzetti, 200 μ l/pozzetto) in terreno RPMI 1640 (RPMI 1640 Medium; Euro Clone, Milano, Italia) senza rosso fenolo, addizionato con 10% di siero bovino fetale (Sigma-Aldrich, Milano, Italia), 1% di Penicillina-Streptomicina, 1% di L-Glutammina (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) e 5 μ g/ml di Concanavalina A (ConA; Sigma-Aldrich, Milano, Italia). La Concanavalina A è una proteina globulare facente parte del gruppo delle Lectine, proteine polimeriche vegetali da tempo conosciute come capaci di indurre l'attivazione linfocitaria *in vitro*. Le lectine legano selettivamente i carboidrati presenti su alcune glicoproteine di membrana dei linfociti T. La ConA induce trasformazione dei linfociti e agglutinazione dei globuli rossi.

I linfociti seminati sono stati quindi trattati con AZA o 6-MP (range 1mM - 78 μ M) e metilprednisolone (range 54 μ M - 0.05 nM) per 72 ore.

SAGGIO DELLA TIMIDINA TRIZIATA CON VALUTAZIONE DELL'IC50

La timidina triziata è un radionucleotide, ovvero un nucleotide instabile che decade emettendo energia sottoforma di radiazioni: presenta una struttura uguale alla timidina se non per la sostituzione dell'idrogeno con il trizio.

Le cellule durante la fase di crescita replicano il DNA e la timidina triziata si inserisce al posto della normale timidina nei neo-filamenti. Le cellule che hanno proliferato diventano così radioattive e la radioattività emessa può essere misurata: maggiore sarà la replicazione del DNA e più elevata sarà la quantità di timidina triziata incorporata. Il saggio della timidina triziata misura la capacità proliferativa delle cellule.

PRERAPAZIONE DELLA SOLUZIONE DI TIMIDINA TRIZIATA

A partire da una soluzione madre di timidina triziata (PerkinElmer, Milano, Italia) 1 mCi/ml per la messa a punto della tecnica, sono state testate tre concentrazioni finali:

- 5 μ Ci/ml
- 2,5 μ Ci/ml
- 1 μ Ci/ml.

Dagli esperimenti effettuati è stato possibile individuare la concentrazione ottimale in 2,5 μ Ci. È stata quindi preparata una soluzione 0,05 mCi/ml. Cinquanta ore dopo la semina dei linfociti in terreno contenente le diverse concentrazioni di farmaco, sono stati aggiunti in ogni pozzetto 10 μ l di timidina triziata (concentrazione finale di 2,5 μ Ci/ml), e le piastre sono state incubate per ulteriori 22 ore a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂.

LETTURA DELLA RADIOATTIVITA'

La radioattività incorporata nelle cellule è stata quantificata secondo protocollo standard su piastre da 96 pozzetti utilizzando un sistema di filtrazione (MultiScreen Vacuum Manifold, Millipore; Milano, Italia)

I filtri delle piastre sono stati bagnati con PBS, e in contemporanea le piastre con i linfociti trattati sono state messe in agitazione per 30 minuti.

Alle piastre filtranti è stato applicato un vuoto di 500 mm Hg, e sui filtri sono state quindi trasferite le sospensioni cellulari. Dopo 2 lavaggi con PBS la piastra viene fatta asciugare, per poi aggiungere ad ogni pozzetto 25 μ l di liquido di scintillazione (Optiphase 'Super Mix'; Perkin Elmer life sciencer, Milano, Italia). La piastra viene quindi caricata nello scintillatore (Microbeta Trilux, Wallac), e letta overnight.

I valori relativi ai campioni trattati sono state rapportate alle letture dei controlli secondo la formula: $(\text{cmp trattati}/\text{cmp controlli}) \times 100$: la curva dose-effetto è stata utilizzata per calcolare la concentrazione di farmaco che inibisce al 50% la proliferazione delle cellule (IC50), e la inizione della proliferazione massima calcolata alla concentrazione utilizzata più alta (Imax).

ANALISI STATISTICA

Le analisi statistiche sono state effettuate mediante il software R (2.9.1).

Le eventuali associazioni tra risposta ai GC e i polimorfismi studiati sono state investigate calcolando gli odds ratio (OR) e gli intervalli di confidenza al 95% (CI) dalle tabelle di contingenza utilizzando il test esatto di Fisher.

Per confermare i risultati, è stato allestito un modello di analisi multivariata mediante regressione logistica in cui la risposta ai GC è la variabile dipendente, e l'età, il sesso, e la diagnosi e i genotipi studiati, le variabili indipendenti.

E' stata inoltre allestita un'analisi chiamata Classification and regression Tree (CART): quest'analisi valuta tutte le variabili del modello di studio per la farmacogenetica dei GC e le possibili interazioni tra di esse, e le riordina in uno schema ad albero in cui ogni nodo del ramo rappresenta la variabile selezionata come maggiormente caratterizzante la variabile dipendente del modello (risposta ai GC). Quest'analisi viene effettuata utilizzando il software rpart R, un pacchetto del software R [83].

Il test di permutazione (1000 permutazioni) permette di determinare la significatività del modello finale. Sono state allestite due tipi di CART: la prima, costruita analizzando le variabili genetiche e la loro influenza sulla risposta ai GC, la seconda utilizzando tutte le variabili del modello.

Una p value minore dello 0.05 è considerata statisticamente significativa.

L'analisi statistica per lo studio sui metaboliti dell'AZA e' stata effettuata considerando come variabili dipendenti le concentrazioni dei metaboliti TGN, MMPN, la dose di azatioprina ed i rapporti metaboliti TGN/MPN, TGN/dose ed MMPN/dose. Le variabili indipendenti considerate sono state quelle demografiche e cliniche (genere, età, tipo di MICI), quelle farmacologiche (dose di azatioprina e durata del trattamento) e quelle genetiche (genotipi di GST-A2, GST-M, GST-T, GST-P, ITPA, TPMT, AOX1, MDR1 e MRP4).

L'analisi univariata con il test di Wilcoxon (per variabili continue vs variabili categoriche) e il test di Spearman (per paragonare due variabili continue) e' stata fatta considerando la mediana delle misurazioni per pazienti con più di una misurazione.

L'analisi multivariata e' stata eseguita utilizzando i modelli lineari ad effetto misto:

per ciascuna variabile dipendente (concentrazione TGN, concentrazione MMPN, dose di azatioprina, rapporti TGN/MMPN, TGN/dose, MMPN/dose) e' stato costruito un modello iniziale comprendente tutte le variabili indipendenti (demografiche, cliniche e farmacologiche).

Per quanto riguarda la risposta clinica, è stata allestita una regressione logistica: le variabili dipendenti utilizzate sono i livelli di metaboliti TGN ed MMPN, la dose di azatioprina e la durata del trattamento, e come variabile indipendente è stata considerata la malattia in remissione (indici PCDAI o RCU index minore di 10 per una malattia in remissione, maggiori di 10 per una malattia attiva).

RISULTATI**FARMACOGENETICA DEI GC****STUDIO DEI POLIMORFISMI DEI GENI NR3C1, NALP-1 E IL-1 β**

Per questo studio retrospettivo, sono stati arruolati 154 pazienti pediatrici con MICI, trattati con steroidi da almeno un anno: le caratteristiche demografiche e cliniche per i pazienti suddivisi nei tre gruppi di risposta ai GC, sono riportate in Tabella 8:

	GC-RESPONSIVO (n=84)	GC-DIPENDENTI (n=55)	GC-RESISTENTI (n=15)
Età all'esordio media \pm sd	12.4 \pm 5.5	11.05 \pm 4.8	12.5 \pm 3.3
Sesso			
Maschi n°; (%)	50; (59.5)	24; (43.6)	7; (46.7)
Femmine n°; (%)	34; (40.5)	31; (56.4)	8; (53.3)
Diagnosi			
MC n°; (%)	49; (58.3)	26; (47.3)	7; (46.7)
RCU n°; (%)	35; (41.7)	29; (52.7)	8; (53.3)

Tabella 8: caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti arruolati nello studio

Le distribuzioni dei genotipi per i polimorfismi considerati sono state analizzate nei pazienti con MICI suddivisi in base alla risposta ai GC (Tabella 7) in responders (54.5%), dipendenti (35.7%) e resistenti (9.8%); inoltre, i pazienti dipendenti e resistenti sono stati accorpati in un unico gruppo (non responders, 45.5%). Tutti i polimorfismi analizzati rispettano l'equilibrio di Hardy-Weinberg. Nella Tabella 9 sono riportate tutte le possibili associazioni tra risposta ai GC e polimorfismi considerati, analizzati calcolando odds ratio (OR) e l'intervallo di confidenza al 95% mediante tavole di contingenza e utilizzando il test esatto di Fisher:

NR3C1 <i>Bcl</i>	GENOTIPO			OR (95%) CI MUT vs NON MUT	P- value
	WT	HET	MUT		
Responders (84)	35 (41.7%)	31 (36.9%)	18 (21.4%)	-	-
Dipendenti (55)	22 (40.0%)	29 (52.7%)	4 (7.3%)	0.29 (0.09-0.90)	0.03
Resistenti (15)	9 (60.0%)	5 (33.3%)	1 (6.7%)	0.27 (0.03-2.13)	0.29
<i>Non responders</i> (70)	31 (44.3%)	34 (48.6%)	5 (7.1%)	0.28 (0.09-0.80)	0.02
IL-1 β C-511T	WT	HET	MUT	MUT vs NON MUT	
Responders (79)	39 (49.4%)	34 (43.0%)	6 (7.6%)	-	-
Dipendenti (54)	28 (51.9%)	24 (44.4%)	2 (3.7%)	0.47 (0.04-2.76)	0.47
Resistenti (14)	6 (42.9%)	6 (42.9%)	2 (14.2%)	0.49 (0.07-5.60)	0.34
<i>Non responders</i> (68)	34 (50.0%)	30 (44.1%)	4 (5.9%)	0.76 (0.15-3.37)	0.75
NALP1 rs2670660/C	WT	HET	MUT	MUT vs NON MUT	
Responders (77)	21 (27.3%)	36 (46.7%)	20 (26.0%)	-	-
Dipendenti (54)	16 (29.6%)	21 (38.9%)	17 (31.5%)	1.30 (0.56-3.01)	0.55
Resistenti (13)	1 (7.6%)	6 (46.2%)	6 (46.2%)	0.41 (0.10-1.68)	0.18
<i>Non responders</i> (67)	17 (25.4%)	27 (40.3%)	23 (34.3%)	1.48 (0.68-3.25)	0.28
NALP1 Leu155His	WT	HET	MUT	MUT vs NON MUT	
Responders (84)	13 (15.5%)	56 (66.7%)	15 (17.8%)	-	-
Dipendenti (55)	16 (29.1%)	23 (41.8%)	16 (29.1%)	1.69 (0.77-4.57)	0.146
Resistenti (15)	1 (6.7%)	6 (40.0%)	8 (53.3%)	0.19 (0.05-0.71)	0.0059
<i>Non responders</i> (70)	17 (24.3%)	29 (41.4%)	24 (34.3%)	2.38 (1.07-5.45)	0.02

Tabella 9: Frequenze dei genotipi ed analisi univariata (test esatto di Fisher) nei pazienti responders, dipendenti, resistenti e dipendenti + resistenti

Il genotipo mutato del polimorfismo *Bcl* del gene NR3C1 è risultato significativamente più frequente nel gruppo GC responders (21.4%) rispetto al gruppo non responders, che combina i pazienti GC resistenti e dipendenti (7.1%; OR = 0.28, 95% CI = 0.09 - 0.80, $P= 0.02$); questo polimorfismo risulta inoltre distribuito in maniera significativamente differente anche tra responders e i soli dipendenti (7.3%; OR = 0.29, 95% CI = 0.09 - 0.90, $P= 0.03$).

Il polimorfismo del gene dell' IL-1 β , C-511T, e il polimorfismo del promotore del gene NALP1 (rs2670660/C), sono risultati essere equamente distribuiti nei gruppi dei pazienti considerati.

Al contrario, il genotipo omozigote mutata per il polimorfismo Leu155His del gene

NALP1, è significativamente meno frequente nel gruppo responder (17.8%) rispetto al gruppo GC resistente (53.3%; OR = 0.19, 95% CI = 0.05 - 0.71, $P=0.0059$). Un'altra correlazione statisticamente significativa è stata osservata tra responders ed il gruppo non-responders (34.3%; OR = 2.38, 95% CI = 1.07 - 5.45, $P=0.02$; Tabella 9). Questi risultati sono stati ulteriormente analizzati per mezzo di una regressione logistica, con un modello di analisi multivariata che utilizza la risposta ai GC come variabile dipendente, e l'età dei pazienti all'esordio della malattia, il tipo di MICI, il sesso e i genotipi considerati come variabili indipendenti.

Modello di regressione logistica		
Non Responders (n = 70) vs Responders (n = 84)		
VARIABILE	OR (CI)	P-value
Età all'esordio (<i>anni</i>)	0.96 (0.89 – 1.04)	0.33
Sesso (<i>maschi vs femmine</i>)	0.46 (0.22 – 0.94)	0.034
IBD (<i>UC vs CD</i>)	1.51 (0.74 – 3.12)	0.26
NR3C1 BclI (<i>MUT vs NON MUT</i>)	0.29 (0.09 – 0.89)	0.030
IL-1β C-511T (<i>MUT vs NON MUT</i>)	0.84 (0.20 – 3.54)	0.81
NALP1 rs2670660/C (<i>MUT vs NON MUT</i>)	0.85 (0.31 – 2.34)	0.76
NALP1 Leu155His (<i>MUT vs NON MUT</i>)	3.12 (1.10 – 8.90)	0.033

Modello di regressione logistica		
Resistenti (n =15) vs Responders (n = 84)		
VARIABILE	OR (CI)	P-value
Età all'esordio (<i>anni</i>)	0.99 (0.85 – 1.16)	0.95
Sesso (<i>maschi vs femmine</i>)	0.58 (0.14 – 2.40)	0.45
IBD (<i>UC vs CD</i>)	1.26 (0.30 – 5.32)	0.75
NR3C1 BclI (<i>MUT vs NON MUT</i>)	0.34 (0.03 – 3.26)	0.35
IL-1β C-511T (<i>MUT vs NON MUT</i>)	2.41 (0.31 – 18.60)	0.40
NALP1 rs2670660/C (<i>MUT vs NON MUT</i>)	0.82 (0.11 – 6.14)	0.85
NALP1 Leu155His (<i>MUT vs NON MUT</i>)	8.25 (1.18 – 57.96)	0.034

Tabella 10: Modello di regressione logistica che utilizza come variabile dipendente la risposta ai GC

Il modello di regressione logistica è stato utilizzato utilizzando come variabile dipendente sia i pazienti responders verso i non-responders, sia i responders verso i resistenti: la prima analisi ha confermato un'associazione significativa tra il genotipo mutato del polimorfismo *BclI* e la risposta agli steroidi (adjusted OR = 0.29, 95% CI = 0.09 – 0.089, $P= 0.030$), e tra la variante mutata del polimorfismo Leu155His del gene NALP1 e la non risposta (adjusted OR = 3.12, 95% CI = 1.10 – 8.90, $P= 0.033$). Inoltre, è stata osservata un'associazione significativa tra risposta ai GC e i pazienti con sesso maschile (adjusted OR = 0.46, 95% CI = 0.22 – 0.94, $P= 0.034$). La seconda analisi multivariata che analizza i pazienti resistenti in confronto ai responder, ha confermato il ruolo significativo del polimorfismo Leu155His del gene di NALP1 sulla resistenza ai GC (adjusted OR = 8.25, 95% CI = 1.18 – 57.96, $P= 0.034$). Tutte le altre variabili analizzate non sono risultate significativamente associate.

Il modello di studio, è stato inoltre considerato per un'analisi mediante Classification and Regression Tree (CART), che ha il vantaggio di esplorare tutti i possibili fattori che possono influenzare la risposta agli steroidi, e le possibili interazioni che sussistono tra di essi [84]. Sono state considerati due modelli di analisi CART: il primo comprende le interazioni risultate significative per la variabile dipendente "risposta ai GC" (Figure 10, permutation P value for the CART = 0.046), ovvero le variabili genetiche. Quest'analisi ha dimostrato che il polimorfismo *BclI* del gene NR3C1 risulta essere la variabile che maggiormente caratterizza i pazienti responders ai GC: la presenza del genotipo mutato per questo polimorfismo conferisce una maggiore probabilità di risposta ai GC (78.3%) rispetto ai pazienti non mutati per questo SNP (50.4 %, $P= 0.018$). A questo punto l'analisi procede caratterizzando il gruppo non mutato per il polimorfismo *BclI*, composto da 131 pazienti: la variabile maggiormente rappresentativa del gruppo non mutato per *BclI*, è risultato essere il polimorfismo Leu155His del gene NALP1. Il 67.7% dei pazienti omozigoti mutati per questo polimorfismo non rispondono al trattamento steroideo, mentre solo il 44% dei soggetti non mutati è resistente ai GC, e questa differenza è statisticamente significativa ($P= 0.023$).

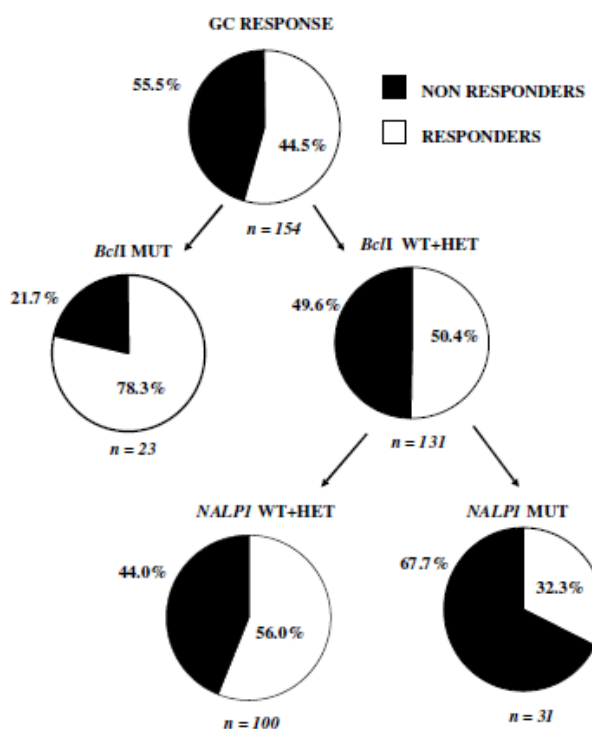


Figura 10: Analisi CART costruita analizzando le variabili genetiche del modello

La seconda CART invece, analizza un modello che comprende tutte le variabili indipendenti presenti nello studio (età all'esordio, sesso, tipo di MICI, e i polimorfismi selezionati): anche in questo caso si conferma l'effetto significativo dei polimorfismi *BclI* e *Leu155His* sulla risposta ai GC. Inoltre, quest'analisi aggiunge l'età all'esordio della malattia, e il sesso maschile, come un'importante variabile che influenza la risposta ai GC. Tra i 100 pazienti non mutati sia per *BclI* che per *NALP1*, per i quali quindi i fattori genetici non sembrano influenzare la risposta ai GC, la variabile che maggiormente caratterizza la risposta ai GC è l'età all'esordio della malattia: il 61.1% dei pazienti con età all'esordio minore di 7.5 anni hanno una maggiore probabilità di non rispondere alla terapia (il 40.2% sono i non responders con un'età maggiore de 7.5 anni). Tra gli 82 pazienti rimanenti, cioè i non mutati per *BclI* e *NALP1* e con un'età all'esordio della malattia maggiore di 7.5 anni, la variabile maggiormente associata alla risposta ai GC sembra essere il sesso maschile, con il 27.5% dei pazienti maschi non responders ai GC, contro il 52.4% delle femmine non responders.

Per indagare su questo risultato, è stata allestita una regressione logistica sui 100 pazienti non mutati per i polimorfismi associati alla risposta ai GC, considerando sempre la risposta ai GC come variabile dipendente, e l'età all'esordio della malattia e sesso come variabili indipendenti: il risultato ottenuto conferma i dati mostrati dalla seconda CART analizzata, ed è evidente un'associazione significativa tra età e sesso del paziente (adjusted OR = 0.10, 95 % CI = 0.01 – 0.88, $P = 0.038$). Quindi pazienti maschi con un'età all'esordio maggiore dei 7,5 anni, hanno una minor probabilità di non risposta rispetto alle femmine e a pazienti più piccoli: è interessante notare che questa interazione non è significativa considerando tutta la popolazione del modello ($P = 0.081$), ma lo è escludendo i pazienti mutati per i polimorfismi associati nella CART alla risposta ai GC.

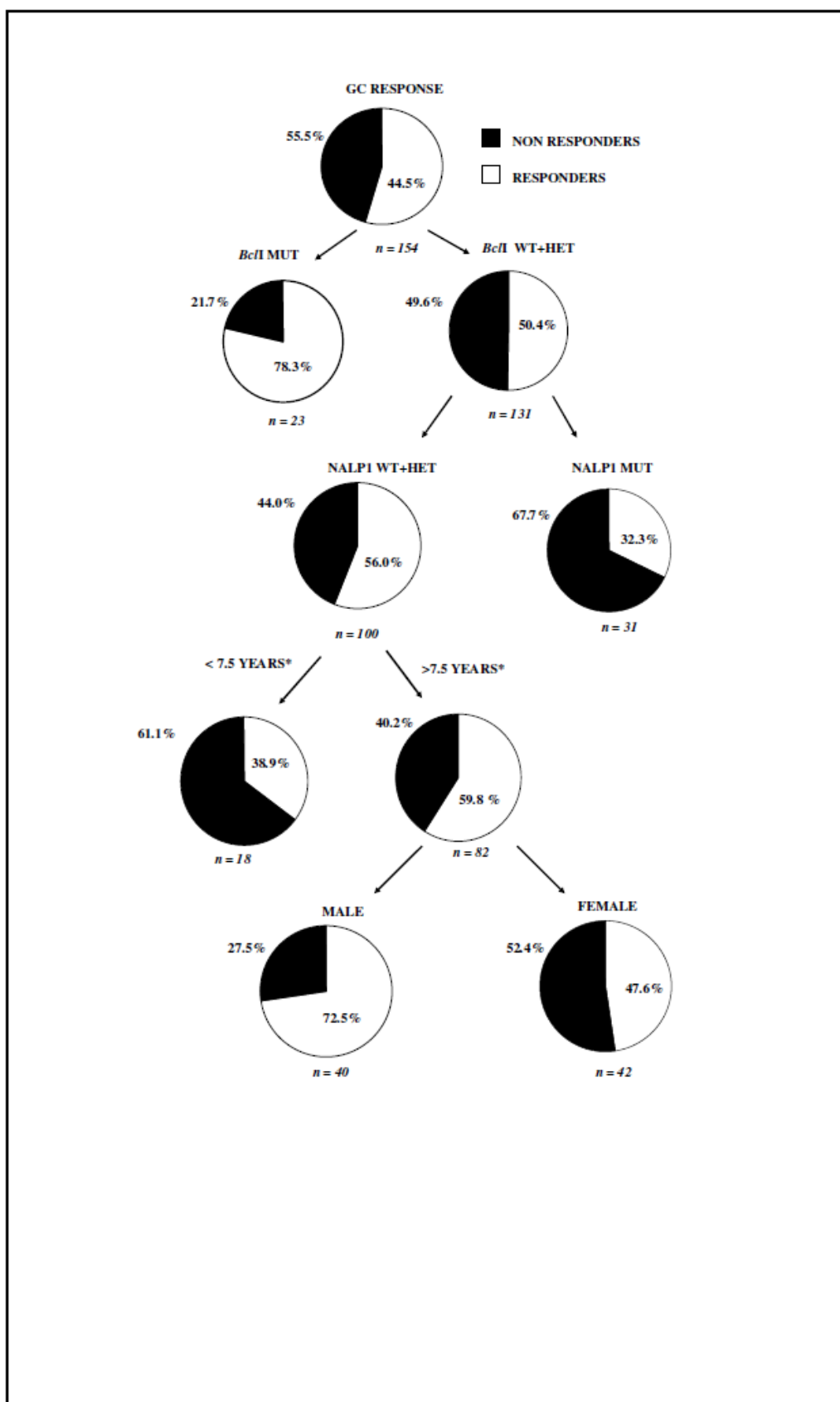


Figura 11: Analisi CART costruita considerando tutte le variabili del modello

Modello di regressione logistica		
Non Responders (n = 56) vs Responders (n = 44) tra i pazienti non mutati per i polimorfismi <i>BclI</i> del gene NR3C1 e Leu155His del gene NALP1		
VARIABILE	OR (CI)	P-value
Età all'esordio della malattia (≥ 7.5 vs < 7.5)	1.47 (0.29 - 7.37)	0.64
<i>Sesso (maschi vs femmine)</i>	3.56 (0.48 - 26.28)	0.21
Interazione età: sesso	0.10 (0.01 - 0.88)	0.038

Tabella 11: Modello di regressione logistica sui 100 pazienti non mutati per entrambi i polimorfismi selezionati

FARMACOGENETICA DELL'AZATIOPRINA

Lo studio ha arruolato 77 pazienti pediatrici o giovani adulti con MICI trattati con AZA da almeno 3 mesi.

A partire da febbraio 2004 e fino a novembre 2010 sono stati effettuati un totale di 156 prelievi di sangue periferico, e sono stati dosati i metaboliti dell'AZA. In media sono stati raccolti 2 campioni (range 1–6) per paziente.

E' stato inoltre estratto il DNA per determinare il profilo genetico per ogni paziente e valutare eventuali correlazioni tra polimorfismi genetici degli enzimi coinvolti nella farmacocinetica dell'AZA e i livelli dei metaboliti plasmatici di questo immunosoppressore.

Tutti i polimorfismi studiati risultano essere in equilibrio di Hardy-Weinberg e hanno una frequenza paragonabile a quella riportata in letteratura per i soggetti caucasici.

Gene	SNP	WT (%)	HET (%)	MUT(%)	NA(%)	P-HW(2)
TPMT(1)	G460A	72 (93.5%)	2 (2,6%)	0	3 (3.9%)	
	A719G	71 (92.2%)	3 (3.9%)	0	3 (3.9%)	0.801
GST-A2	A629C	55 (71.4%)	8 (10.4%)	0	14 (18.2%)	0.295
	G335C	38 (49.4%)	25 (32,5%)	0	14 (18.2%)	0.052
GST-P	A1578G	27 (35.1%)	33 (42.9%)	6 (7.8%)	6 (7.8%)	0.464
ITPA	C94A	67 (87.0%)	4 (5.2%)	0	6 (7.8%)	0.062
	IVS2+21A C	55 (71.4%)	14 (18.2%)	0	8 (10.4%)	0.277
AOX1	A3404G	52 (67.5%)	13 (16.9%)	0	12 (15.6%)	0.104
MRP4	G2269A	63 (81.8%)	0	0	14 (18.2%)	-
Gene		NON DELEZIONE (%)		DELEZIONE (%)		NA(%)
GST	M	30 (39 %)		44 (57,1%)		3 (3,9%)
	T	58 (75.3%)		16 (20.8%)		3 (3.9%)

Tabella 12: distribuzione del genotipo nei 77 pazienti

(1) I 2 polimorfismi del gene TPMT G460A e A719G sono studiati in associazione; e la presenza di entrambe definisce l'aplotipo TPMT*3;

(2) P-value dell'equilibrio di Hardy-Weinberg

È stata effettuata inizialmente un'analisi con il test non parametrico di Wilcoxon. Per ciascun paziente sono state calcolate le mediane dei valori dei metaboliti 6-

TGN, 6-MMP, della dose di AZA al momento del prelievo e del rapporto TGN/dose. Questi valori sono stati messi in correlazione con le variabili cliniche, demografiche e genetiche dei pazienti.

Considerando le variabili demografiche dei 77 pazienti studiati, si nota (Figura) una correlazione statisticamente significativa tra età dei pazienti e dose (mg/Kg) di AZA: pazienti più piccoli vengono trattati con dosi più alte di farmaco ($p= 0.021$). Non è evidente al contrario una correlazione tra età e concentrazione dei metaboliti 6-TGN ($p=0.69$) e 6-MMP ($p=0.47$) nè tra età e rapporto 6TGN/dose ($p=0.62$), utilizzando il test di Spearman, un'analisi univariata tra due variabili continue.

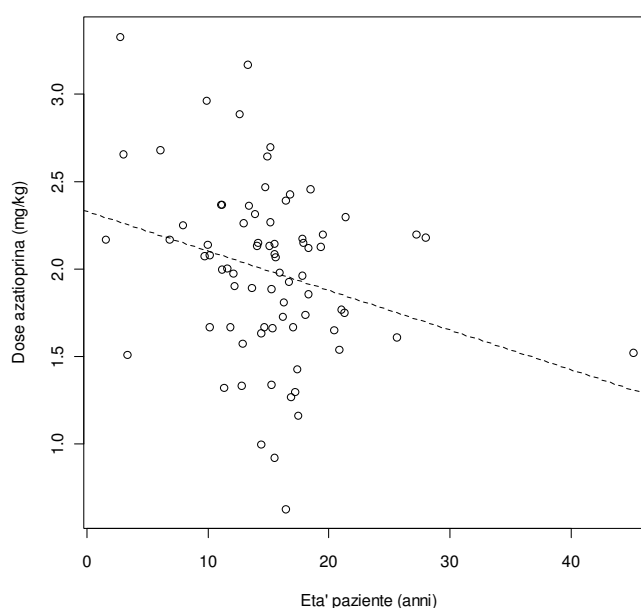


Figura 12: grafico della correlazione tra età del paziente e dose di AZA assunta

È evidente una differenza statisticamente significativa tra pazienti con MC e RCU per quel che riguarda rapporto tra metabolita 6-TGN e dose di AZA. Questo rapporto è infatti significativamente più basso nei 45 pazienti con MC ($p= 0.0087$). Inoltre questa differenza è indipendente dal genotipo di TPMT, enzima noto per influenzare in maniera diretta il metabolismo dell'AZA: il genotipo eterozigote di TPMT infatti è equamente distribuito nei pazienti suddivisi in base alla diagnosi (1 paziente con MC, 2 con RCU; p -value Fisher exact test= 0.25). Non c'è invece una correlazione statisticamente significativa tra livelli di 6-TGN ($p=0.13$), livelli di 6-MMP ($p=0.44$), dose del farmaco somministrata ($p=0,34$) e tipo di MICI.

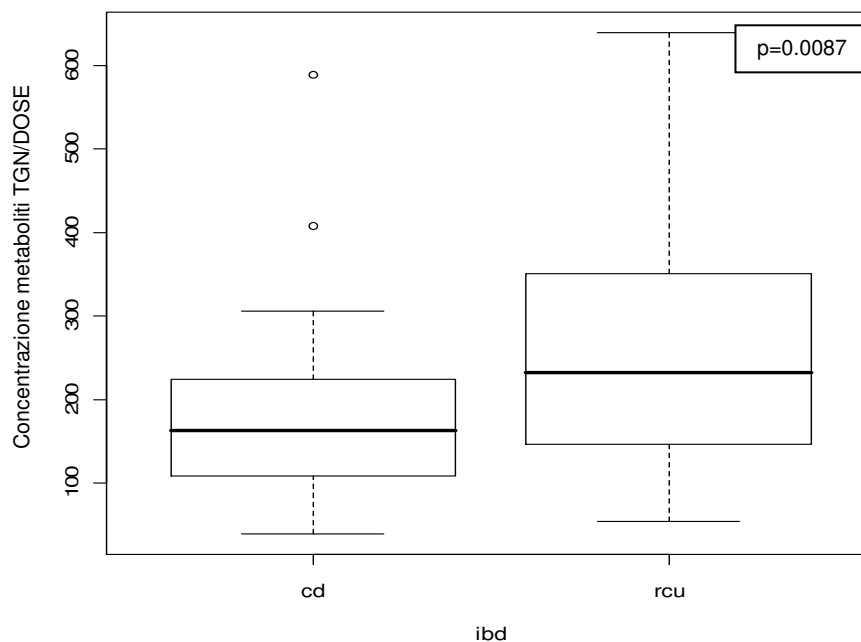


Figura 13: box plot della correlazione tra IBD e rapporto metaboliti TGN/dose

Tra i polimorfismi studiati, è stato confermato il ruolo importante dei polimorfismi dell'enzima TPMT, sulle concentrazioni dei metaboliti dell'AZA.

L'enzima TPMT è coinvolto nella metilazione della 6-MP e polimorfismi del suo gene determinano una riduzione dell'attività enzimatica. L'allele TPMT*3A presenta entrambe le transizioni A719G e G460A: nel nostro studio, genotipo variante per questi polimorfismi è risultato correlato al metabolismo dell'AZA, ed è infatti marginalmente associato ai valori plasmatici dei metaboliti 6-TGN ($p=0.079$) e significativamente associato ai livelli di metaboliti 6-MMP ($p=0.018$), alla dose di AZA ($p=0.027$) e al rapporto TNG/dose ($p=0.0057$).

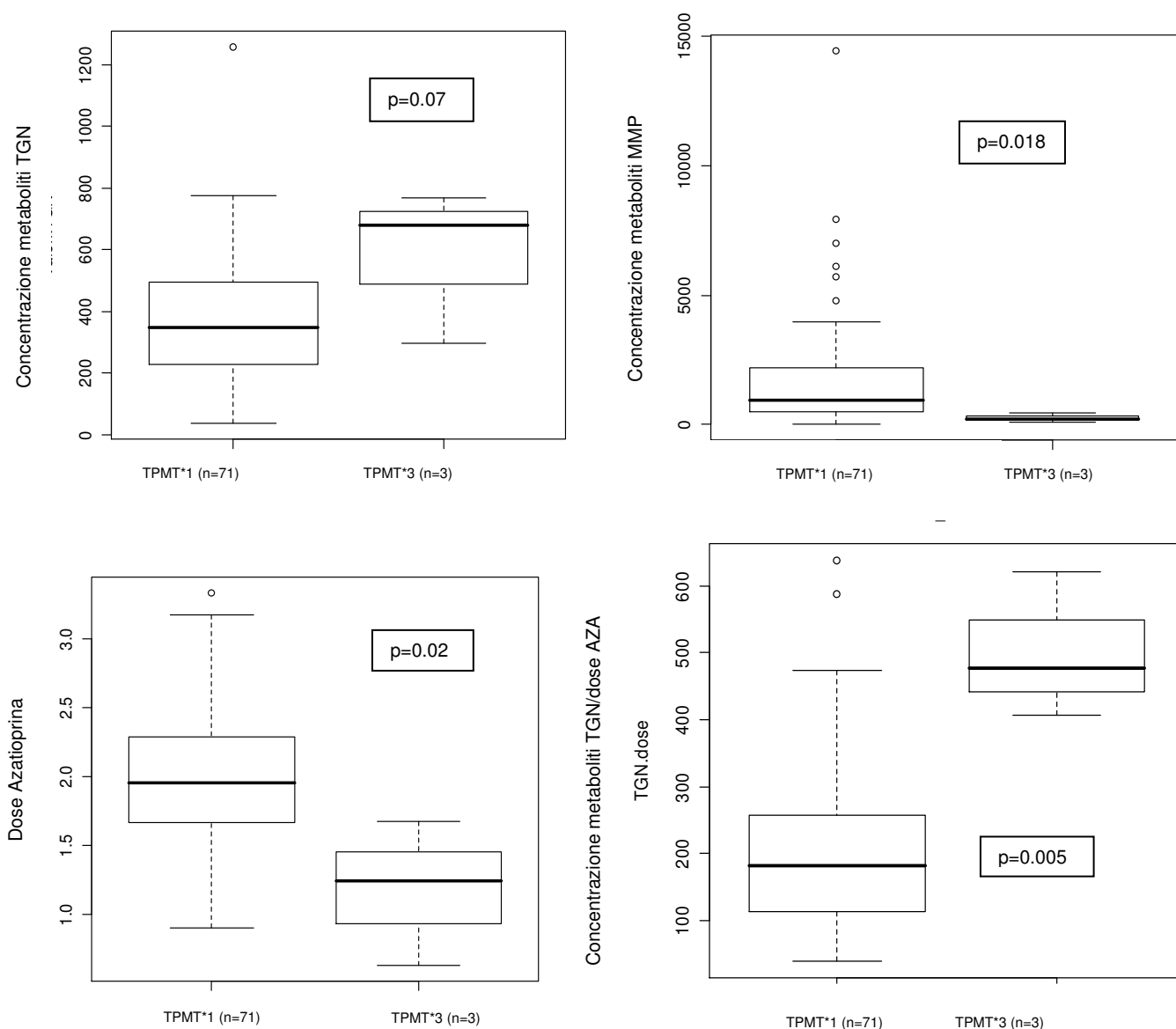


Figura 14 : concentrazioni dei metaboliti TGN (pmol/ 8×10^8 eritrociti), MMP (pmol/ 8×10^8 eritrociti), dose di AZA (mg/kg) e rapporto TGN/dose in pazienti con TPMT*1 e TPMT*3

Altri risultati interessanti riguardano il polimorfismo dell'isoforma M dell'enzima GST, responsabile dell'attivazione dell'AZA in 6-MP.

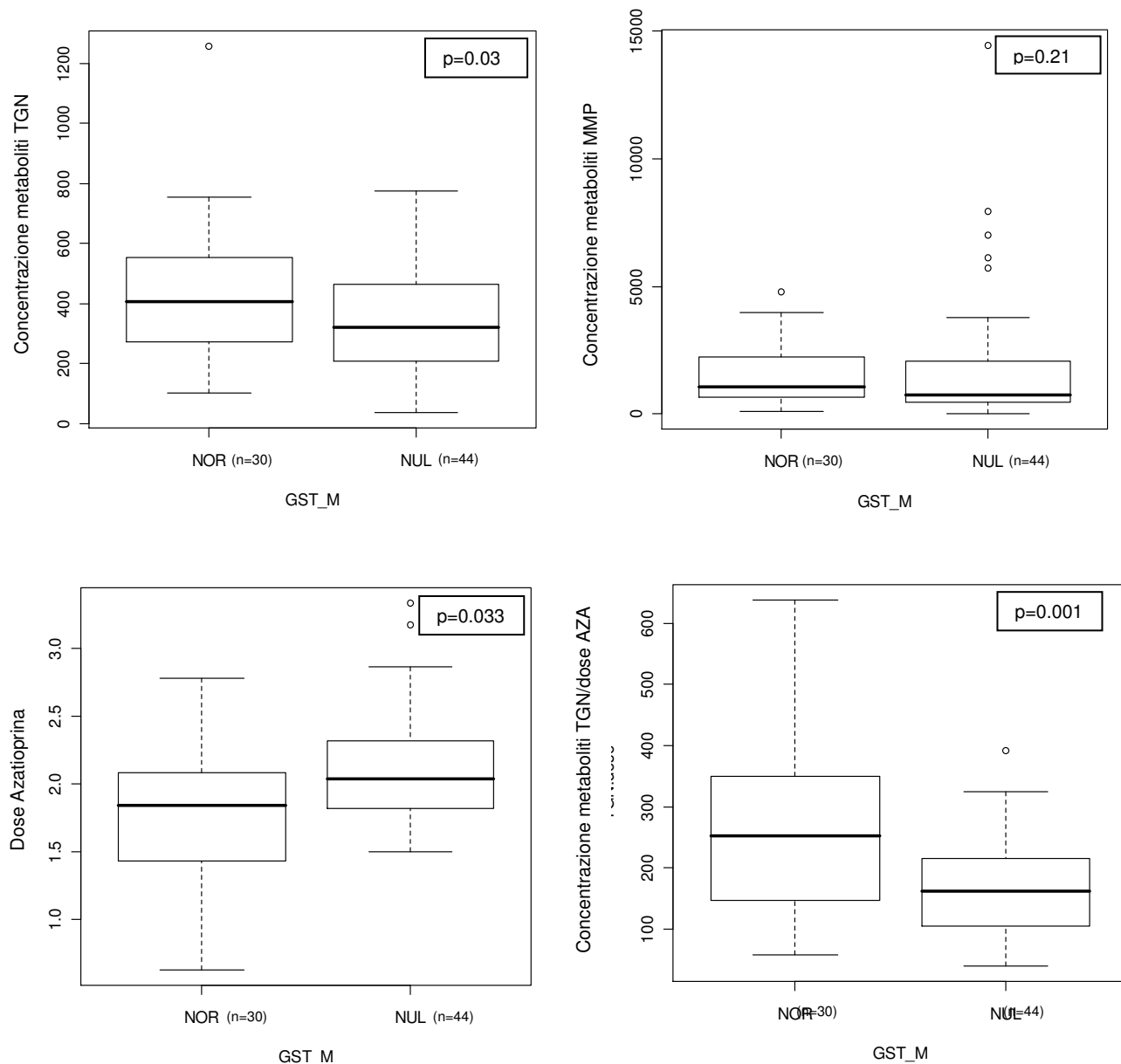


Figura 15: concentrazioni dei metaboliti TGN (pmol/8x10⁸ eritrociti), MMP (pmol/8x10⁸ eritrociti), dose di AZA (mg/kg) e rapporto TGN/dose in pazienti con genotipo GST-M normale (NORM) o nullo (NUL)

Il polimorfismo del gene GST-M è una delezione che, se presente, porta a perdita dell'attività enzimatica. Il genotipo nullo nei nostri 77 pazienti risulta associato a valori plasmatici di 6-TGN significativamente più bassi rispetto ai pazienti con genotipo normale (p=0.033) mentre non si è osservata una correlazione significativa con i metaboliti metilati (p=0.21). I pazienti che presentano un

genotipo GST-M null, hanno anche ricevuto una dose di AZA significativamente più alta ($p=0.001$) e il rapporto tra metaboliti attivi e dose è significativamente più basso ($p=0.033$).

Anche l'isoforma A dell'enzima GST, coinvolta nel metabolismo dell'AZA e della 6-MP, presenta alcuni polimorfismi genetici che vengono studiati in aplotipo: dai nostri risultati, la presenza dell'aplotipo *A/*A (l'aplotipo che presenta genotipo wild type per i tre polimorfismi rs6577, rs2180314 e rs2234951) risulta associato, ad una dose somministrata di AZA più alta rispetto agli aplotipi *A/*B/*C (l'aplotipo che presenta genotipo wild type per il polimorfismo rs2234951 e rs6577 e eterozigote per il polimorfismo rs2180314) e *A/*C (l'aplotipo che presenta genotipo wild type per i polimorfismi rs6577, rs2180314 e rs2234951) (Kruskall-Wallis test, $p=0.031$). Non si sono evidenziate differenze statisticamente significative tra gli aplotipi GST-A2 e i livelli plasmatici dei metaboliti 6-TGN ($p=0.99$), dei metaboliti metilati ($p=0.32$), rapporto tra 6-TGN e dose di farmaco ($p=0.48$).

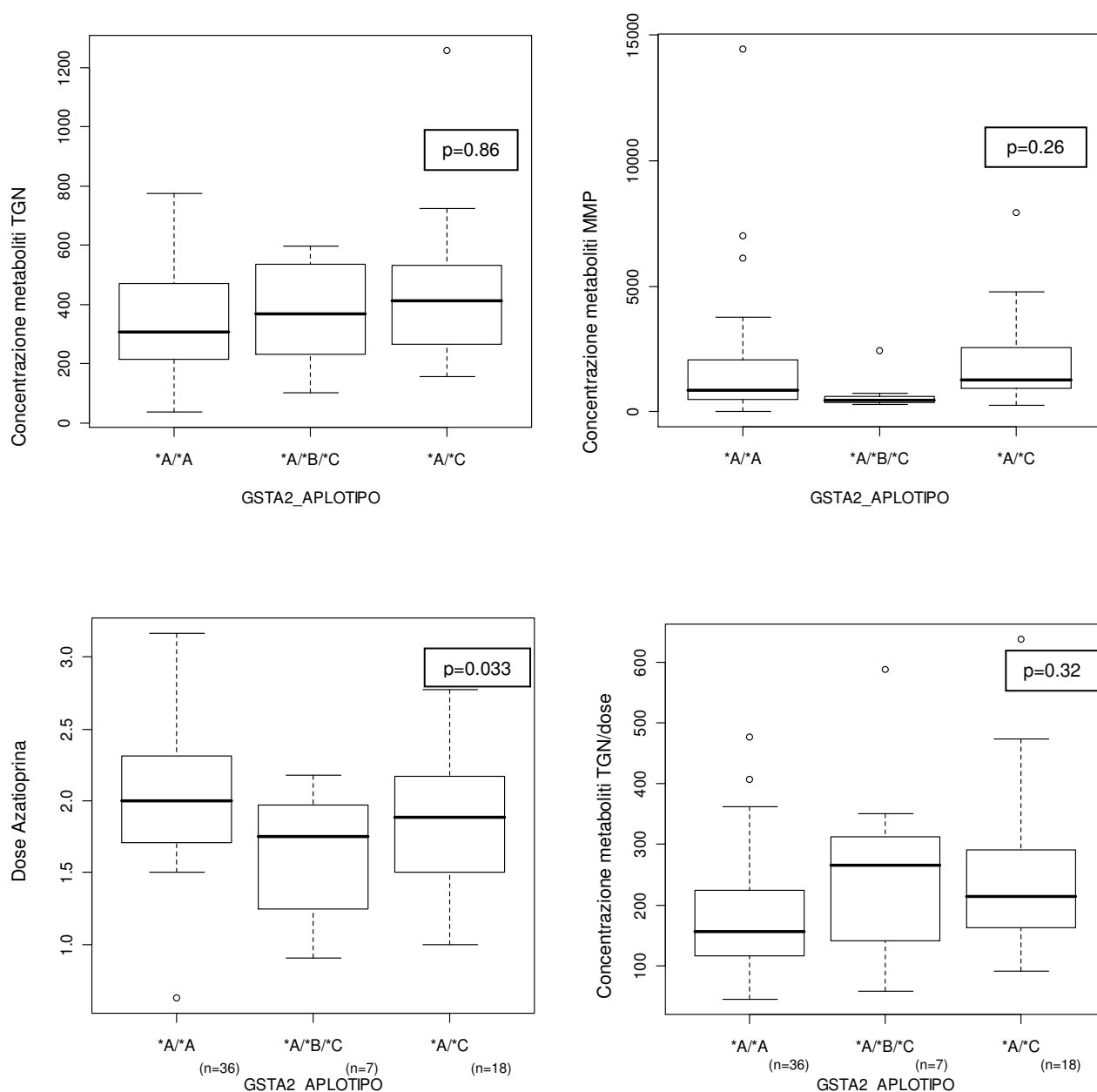


Figura 16: concentrazioni di metaboliti TGN (pmol/8x10⁸ eritrociti), MMP (pmol/8x10⁸ eritrociti), dose di AZA (mg/kg) e rapporto TGN/dose in pazienti con aplotipo *A/*A, *A/*B/*C e *A/*C

Per quanto riguarda i polimorfismi delle isoforme P e T, non sono state osservate differenze statisticamente nelle quantificazioni dei metaboliti dell’AZA.

Sono stati studiati due polimorfismi tra i più frequenti nel gene dell’ITPA: C94A e IVS2+21AC. Il polimorfismo ITPA C94A ha un effetto marginalmente significativo sulle concentrazioni dei metaboliti TGN ($p=0.063$) ed un effetto pienamente significativo sui metaboliti metilati ($p=0.037$): in entrambi i casi, i soggetti con genotipo variante presentano concentrazioni più elevate dei metaboliti. Non si

osserva invece un effetto significativo sulla dose di AZA assunta e sul rapporto TGN/dose.

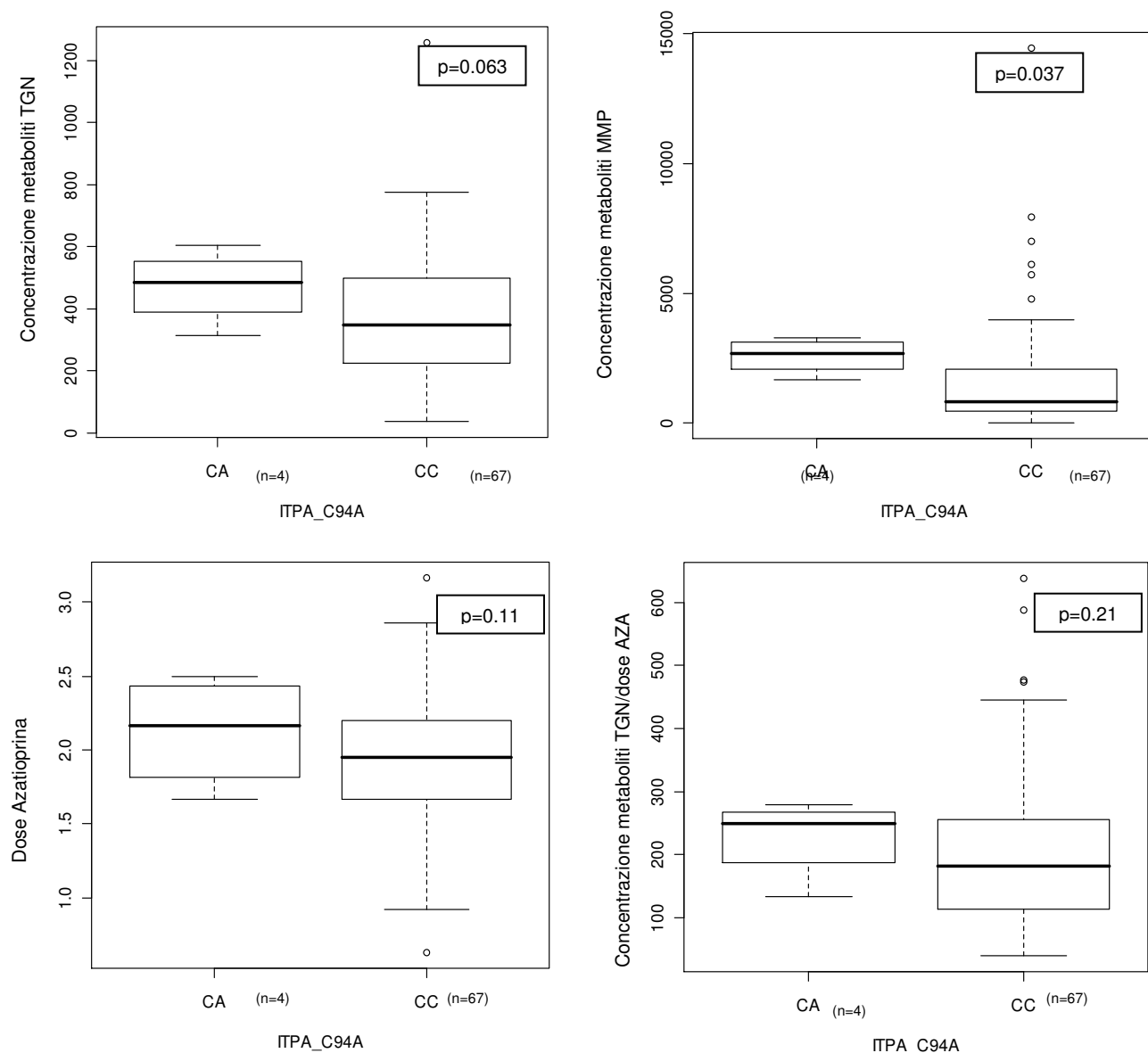


Figura 17: concentrazioni dei metaboliti TGN (pmol/8x10⁸ eritrociti), MMP (pmol/8x10⁸ eritrociti), dose di AZA (mg/kg) e rapporto TGN/dose in pazienti con genotipo ITPA C94A wild type (CC) o eterozigote (CA)

Il secondo polimorfismo studiato dell'enzima ITPA è IVS2+21AC. Questo polimorfismo non è risultato correlato in maniera statisticamente significativa al metabolismo dell'AZA.

Anche i polimorfismi del gene AOX1 non ha evidenziato differenze statisticamente significative nei valori dei metaboliti plasmatici, nella dose dell'AZA e nel rapporto TGN/dose.

I dati sono stati ulteriormente analizzati mediante un modello lineare ad effetto misto (LME) nel quale sono stati considerati singolarmente tutti i dosaggi per ogni paziente: in tabella è riportata l'analisi globale di tutte le variabili cliniche, demografiche e genetiche, e la loro correlazione con i valori dei metaboliti 6-TGN, 6-MMP, la dose di AZA e il rapporto TGN/dose.

	Pazienti	Prelievi	TGN	MMPN	dose	TGN/dose
VARIABILI DEMOGRAFICHE						
GENERE (M vs F)	77	156	0.49	0.96	0.98	0.58
ETA'	77	156	0.31	0.44	0.032	0.96
VARIABILI CLINICHE						
TIPO MICI (RCU vs MC) ⁽¹⁾	76	155	0.17	0.89	0.27	0.060
DURATA TRATTAMENTO	77	156	0.41	0.96	0.37	0.24
GENOTIPI						
TPMT A719G	74	153	0.014	0.0095	0.0070	0.0001
GST-M ⁽²⁾	74	152	0.010	0.22	0.021	0.0002
GST-T ⁽²⁾	74	152	0.40	0.90	0.82	0.40
GST-P ⁽³⁾	69	136	0.24	0.27	0.60	0.69
ITPA 94CA	71	149	0.072	0.046	0.23	0.32
ITPA IVS +21 AC	69	146	0.85	0.96	0.61	0.63
AOX1	64	121	0.24	0.17	0.77	0.40

Tabella 13: correlazione dei valori dei metaboliti 6-TGN, 6-MMP, dose di AZA e rapporto TGN/dose con tutte le variabili cliniche, demografiche e genetiche del modello

(1) : escluso un paziente con Colite Indeterminata.

(2): confronto fatto fra pazienti con genotipo nullo vs non nullo

(3): confronto fatto fra pazienti con genotipo mutato vs genotipo wt/eterozigote.

Il modello lineare ad effetto misto ha confermato in gran parte i risultati ottenuti con il test di Wilcoxon. Questa analisi ha evidenziato anche una correlazione statisticamente significativa tra il genotipo variante TPMT e i valori dei metaboliti

tioguaninici dell'AZA ($p=0.014$). Le correlazioni tra i metaboliti metilati ($p=0.96$) e il rapporto TGN/dose ($p=0.24$) con la durata del trattamento, significative all'analisi univariate, non sono al contrario confermate dall'analisi multivariata.

La risposta clinica alla terapia è stata valutata su 49 pazienti utilizzando l'indice PCDAI per i pazienti con MC (26) e l'RCU index per i pazienti con RCU (23): per entrambi gli indici un valore inferiore a 10 è considerato indicativo di una malattia in remissione. È stato allestito un modello di regressione logistica utilizzando come variabile dipendente la risposta alla terapia con AZA (indice clinico < 10), e come variabili indipendenti l'età del paziente, il genere, il tipo di MICI, la durata del trattamento, la dose pro kg e i metaboliti plasmatici dell'AZA al primo prelievo.

Effetto di variabili cliniche, farmacocinetiche e farmacogenetiche sulla risposta alla terapia alla prima misurazione (p-value da regressione logistica)		
Variabile	Effetto	p-value
Eta'	-0.021	0.77
Genere (M vs F)	0.72	0.28
Tipo MICI (RCU vs MC)	19.42	1.6×10^{-5}
Durata trattamento (giorni)	0.00091	0.31
Dose	-1.13	0.14
TGN	0.0040	0.065
MMP	0.00023	0.25
TGN/dose	0.013	0.0048
TGN/MMP	0.84	0.24

Tabella 14: risultati del modello di regressione logistica (se l'effetto è positivo, all'aumentare, o al valore corrispondente, della variabile, aumenta la probabilità di risposta, se l'effetto è negativo, diminuisce)

È evidente una correlazione statisticamente significativa tra malattia in remissione e RCU ($P<0.0001$). Infatti, tutti i pazienti con RCU (23), in corrispondenza del primo prelievo per la quantificazione dei metaboliti, quindi in trattamento da almeno 90 giorni con AZA, presentavano un RCU score minore di 10, e quindi una

malattia non attiva, a differenza dei pazienti con MC (26), di cui solo 14 risultavano in remissione.

La concentrazione dei metaboliti 6-TGN tende ad essere più alta nei soggetti con malattia in completa remissione rispetto ai soggetti con malattia attiva ($P=0.065$), e questa differenza diventa statisticamente significativa riportando i valori del metabolita TGN alla dose ($P=0.0048$). La regressione logistica è stata applicata anche utilizzando come variabili indipendenti i genotipi dei pazienti: non sono emerse correlazioni statisticamente significative tra genetica e risposta clinica all'AZA, probabilmente anche per il ridotto numero di pazienti di cui sono disponibili i dati clinici.

STUDIO IN VITRO SULLA SENSIBILITA' AGLI STEROIDI

E' stato allestito un test *in vitro* su linfociti di donatori di sangue, per valutare un'eventuale correlazione tra sensibilità individuale agli steroidi e presenza dei polimorfismi studiati associati ad alterata risposta ai GC nei pazienti pediatrici con MICI. La sensibilità *in vitro* al metilprednisolone (MP) è stata valutata su linfociti estratti da sangue intero di 42 volontari sani, ed una grande variabilità interindividuale in termini di IC₅₀ ed I_{max} era evidente (IC₅₀ median value 1.43×10^{-7} M, range 7.43×10^{-10} M– 2.94×10^{-4} M; I_{max} median value 91.5%, range 50.0–98.0%). Sulla base dei risultati ottenuti nello studio retrospettivo sui pazienti, abbiamo deciso di analizzare la distribuzione dei genotipi per i polimorfismi *BclI* e NALP1 in correlazione alla sensibilità individuale al MP *in vitro*.

E' stata osservata una maggiore sensibilità *in vitro* ai GC nei soggetti mutati per il polimorfismo *BclI* [85]: questo SNP è risultato essere associato ad una minore IC₅₀ (mediana 2.39×10^{-9} M, range 7.43×10^{-10} M– 1.46×10^{-7} M) in confronto ai soggetti non mutati (wild-type ed eterozigoti; mediana 2.76×10^{-7} M, range 2.03×10^{-9} M– 2.94×10^{-4} M, $p=0.0058$ Mann-Whitney test; Figura 17). Questo risultato è confermato anche considerando l'I_{max}: soggetti con genotipo mutato per *BclI* presentano un'I_{max} più alta rispetto ai non mutati (mediana mutati 95%, range 95–98%; mediana wild-type ed eterozigoti 90%, range 50–98%, $p=0.0078$ Mann-Whitney test; Figura 21). Nessuna associazione significativa è stata invece ottenuta considerando la distribuzione dei genotipi per il polimorfismo del gene NALP1, sia in termini di IC₅₀ che di I_{max} (IC₅₀ mutati: median 3.78×10^{-7} M, range 7.60×10^{-10} M– 2.93×10^{-4} M; wild-type ed eterozigoti: mediana 1.25×10^{-7} M, range 7.43×10^{-10} M– 2.94×10^{-5} M, $p=0.5544$; I_{max} mutati: mediana 89.5%, range 50–98%; wild-type ed eterozigoti: median 92.5%, range 50–98%, $p=0.56$ Mann-Whitney test; Figura 17).

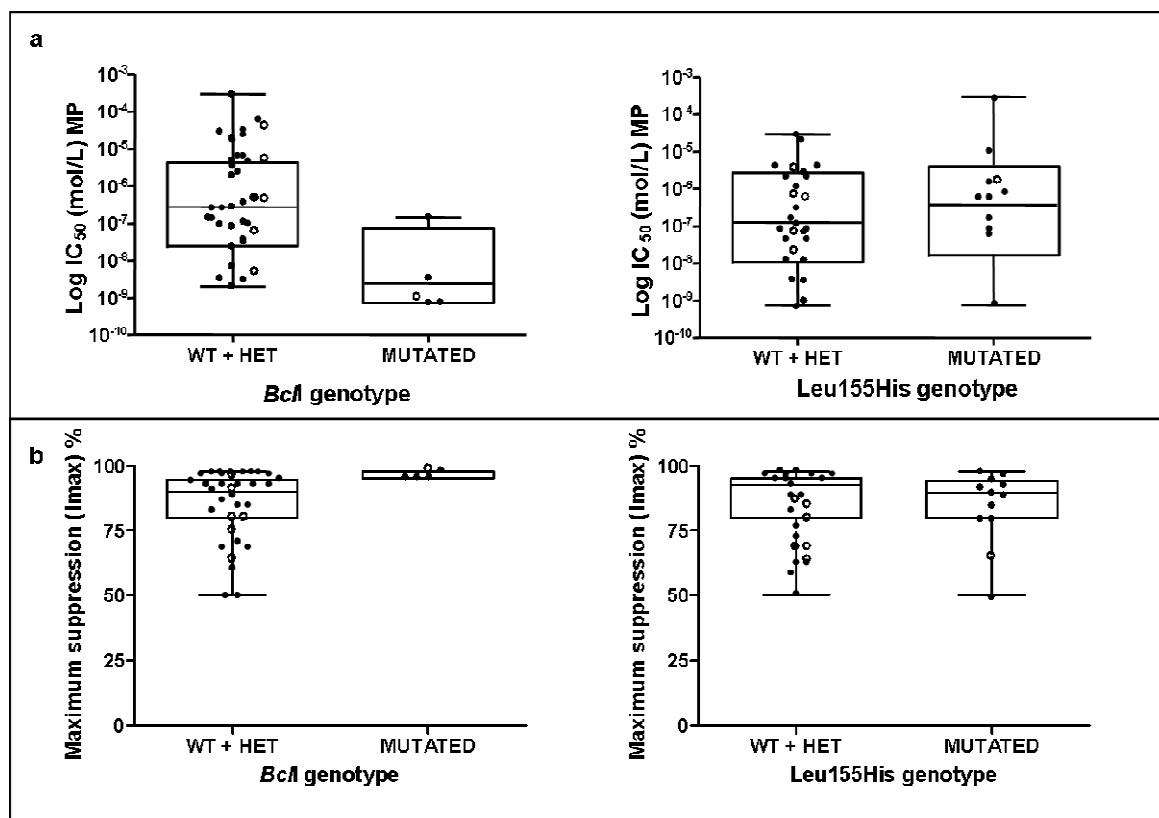


Figura 17: IC₅₀ ed Imax per i gruppi di soggetti mutati e non mutati per i polimorfismi *Bcl* e Leu155His

STUDIO IN VITRO SULLA SENSIBILITA' ALL'AZATIOPRINA

La tossicità dell'AZA è stata studiata *in vitro* sui linfociti ottenuti da 38 prelievi ematici di volontari sani utilizzando concentrazioni scalari di AZA: una variabilità interindividuale nella sensibilità a questo farmaco è evidente, sia in termini di IC₅₀ che di I_{max} (mediana IC₅₀ 1.36x10⁻⁵ M, range 3.00x10⁻⁷ M - 6.38x10⁻⁵ M; mediana I_{max} 98%, range 75.0 % - 99.0 %). Gli stessi volontari sani sono stati genotipizzati per i polimorfismi di enzimi coinvolti nel metabolismo di questo farmaco, ma nessuno dei polimorfismi studiati è risultato essere correlato ad un'alterata sensibilità *in vitro* all'AZA. Inoltre, è stato indagato il ruolo della delezione dell'isoforma M dell'enzima GST sulla sensibilità *in vitro* all'AZA: questo enzima è coinvolto nell'attivazione dell'AZA in 6-MP, e la delezione dell'isoforma M è stata associata ad una minor quantificazione dei metaboliti attivi di questo farmaco, e quindi ad una minor attivazione dell'AZA nei pazienti studiati. Ipotizziamo quindi una minor sensibilità dei linfociti di un soggetto con genotipo nullo per GSTM all'AZA rispetto alla 6-MP.

I risultati ottenuti però non confermano questa tesi: i linfociti di 9 soggetti sani trattati con AZA e 6-MP alle stesse dosi, non hanno mostrato una diversa sensibilità individuale a questi due farmaci dipendente dalla presenza del genotipo nullo per l'enzima GSTM.

Polimorfismo	Numero (%)	IC ₅₀ AZA mediana (range)	I _{max} AZA mediana (range)	IC ₅₀ 6-MP mediana (range)	I _{max} 6- MP mediana (range)
GST-M1 normal	3 (22.2%)	1,95X10 ⁻⁵ (6,39X10 ⁻⁶ -2,13X10 ⁻⁵)	4 (3-6)	1,17X10 ⁻⁵ (1,06X10 ⁻⁵ -3,66X10 ⁻⁵)	10 (8-12)
GST-M1 null	6 (77.8%)	1,16X10 ⁻⁵ (4,14X10 ⁻⁷ -2,82X10 ⁻⁵)	16 (1-25)	3,19X10 ⁻⁶ (5,72X10 ⁻⁷ -6,66X10 ⁻⁵)	10 (2-12)

Tabella 14: Valori mediani dell' IC₅₀ dell'AZA e 6-MP

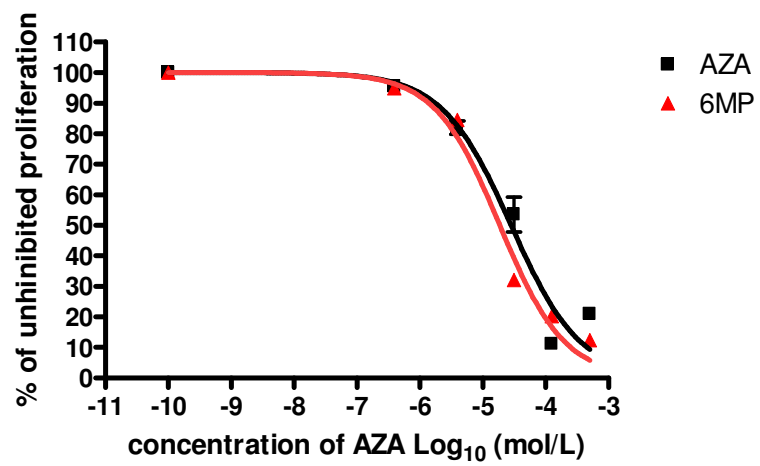


Figure 17: Curve d'inibizione dell'AZA e 6-MP

DISCUSSIONE

Con il termine “Malattie Infiammatorie Croniche Intestinali (MICI)” vengono indicate due principali patologie, il Morbo di Crohn (MC) e la Rettocolite Ulcerosa (RCU), che, pur essendo sostanzialmente diverse sul piano patogenetico, presentano aspetti clinici comuni quali la risposta terapeutica a steroidi ed immunosoppressori, la tendenza alle ricadute e l'elevata frequenza di manifestazioni extraintestinali. Per quanto l'età di massima incidenza si collochi nel terzo decennio di vita, più di un terzo dei casi esordisce prima dei sedici anni e questi casi sono in continuo aumento nei paesi occidentali [10, 86]: le MICI quindi possono essere considerate oggi un'importante malattia anche a esordio pediatrico.

Nelle MICI in fase moderata/severa la terapia iniziale consiste in genere in un ciclo di steroidi per indurre la remissione. Questi ormoni non sono sempre efficaci e hanno diversi effetti collaterali anche gravi; tali effetti sono particolarmente importanti nella popolazione pediatrica [12]. Per questo motivo, dopo un ciclo iniziale con questi farmaci, la terapia viene continuata con altri immunosoppressori, che negli ultimi anni vengono utilizzati sempre più precocemente, proprio per cercare aumentare l'efficacia e di limitare le complicanze da steroidi. Tra gli immunosoppressori più utilizzati vi sono le tiopurine 6-MP e AZA: quest'ultima è la tiopurina più utilizzata nelle MICI pediatriche.

Abbiamo analizzato tramite analisi univariate e multivariate in uno studio retrospettivo su pazienti pediatrici con MICI, il ruolo di polimorfismi genetici sulla farmacocinetica e sull'alterata risposta ai GC e alla AZA.

Per quanto riguarda l'analisi fatta sui polimorfismi associati al meccanismo d'azione dei GC, è stato dimostrato un effetto significativo del polimorfismo *Bcl* del gene NR3C1, e del polimorfismo Leu155His del gene NALP1 sulla risposta ai GC. Questa associazione è stata dimostrata mediante analisi univariate (responders vs non responders $p=0.02$) e multivariate (responders vs non responders $p=0.03$) e confermata anche esaminando il modello con l'analisi CART (classification and regression tree): la CART ha permesso di selezionare le variabili più rappresentative del modello, attraverso l'utilizzo di un software che applicando la teoria della minimizzazione dell'errore, costruisce un modello in cui

le variabili indipendenti (fattori genetici e caratteristiche cliniche) vengono ordinate in base al loro effetto sulla variabile dipendente, nel nostro caso la risposta agli steroidi. Il polimorfismo *BclI*, è risultato essere la prima variabile selezionata dall'analisi: il genotipo mutato per questo polimorfismo è indicatore di una migliore risposta ai GC, risultato confermato da tutte le analisi applicate. Questo risultato è in linea con pubblicazioni precedenti ottenuti dal nostro laboratorio [43], e di altri laboratori che hanno correlato questo polimorfismo ad un'ipersensibilità ai GC [87-91].

L'analisi CART procede considerando i pazienti non mutati per *BclI*, e tra questi i portatori di genotipo mutato per il polimorfismo Leu155His di NALP1 mostrano un'alta probabilità di resistenza al trattamento con GC, sia utilizzando un'analisi univariata (responders vs resistenti $p=0.0059$), che multivariata mediante regressione logistica (responders vs resistenti $p=0.034$). NALP1 è un membro della famiglia chiamata nucleotide oligomerization domain (NOD)-like receptor (NLRs); queste proteine, legandosi alle caspasi-1 e caspasi-5, formano un complesso definito NALP1 inflammasoma, che ha un ruolo centrale nell'attivazione della pro IL-1 β in IL-1 β [92, 93]. Il polimorfismo studiato (rs12150220) è non sinonimo, consiste in una sostituzione di una Leu in His in posizione 155, ed è stato associato in letteratura a malattie autoimmuni ed infiammatorie [94, 95]. La regione in cui si trova questo polimorfismo, è altamente conservata durante l'evoluzione, suggerendo un ruolo importante di questo SNP nella funzionalità proteica [94]. Mutazioni in altri geni della NACHT family ed in particolare nel gene NOD2/CARD15 e NALP3, sono stati associati a malattie autoimmuni e infiammatorie [96-98]. Molti di questi polimorfismi sono localizzati in regioni localizzate nel dominio NACHT come lo SNP Leu155His, e comportano un'aumentata secrezione di citochine proinfiammatorie. L'elevata frequenza di questo polimorfismo nei pazienti resistenti ai GC, potrebbe quindi essere correlata all'attivazione dell' IL-1 β mediata dall'inflammosoma: è noto che questa citochina è espressa in alti livelli nella mucosa intestinale dei pazienti con MICI [99, 100].

Oltre a queste variabili genetiche, nei pazienti non mutati per i polimorfismi *BclI* e NALP1, età all'esordio della malattia e sesso del paziente sono state selezionate nell'algoritmo: pazienti maschi con un'età all'esordio maggiore di 7 anni e mezzo, rispondono meglio al trattamento con GC, rispetto alle femmine più piccole, e la regressione logistica fatta sui 100 pazienti non mutati, dimostra una correlazione

statisticamente significativa di queste due variabili con la risposta clinica.

Questi risultati confermano dati di letteratura, secondo i quali i pazienti piccoli con MC hanno una più alta probabilità di ricaduta [101]. Inoltre, l'influenza degli ormoni femminili è stata correlata all'attività della malattia: nella linea cellulare AtT-20, il progesterone influenza la dissociazione dei GC dai loro recettori, portando ad una minor attività di questi ormoni [102]. È interessante notare che l'81% delle 42 pazienti femmine presenti in questo nodo di analisi ha un'età all'esordio della malattia minore di 11 anni.

In conclusione quindi, questo studio retrospettivo condotto su pazienti pediatriche con MICI per individuare markers genetici, demografici e clinici coinvolti nella risposta ai GC, ha concluso che i polimorfismi *BclI* e *Leu155His*, potrebbero essere utilizzati in clinica, per personalizzare la terapia steroidea sulla base del profilo genetico del paziente.

In parallelo, è stato condotto uno studio retrospettivo su pazienti pediatriche con MICI trattati con AZA, per valutare correlazioni tra farmacocinetica e farmacogenetica, che possano essere utili al clinico per modulare la dose di questo farmaco ed ottimizzare la terapia.

L'AZA è un profarmaco dell'antimetabolita tiopurinico 6-MP e viene particolarmente utilizzata in clinica nelle malattie autoimmuni e infiammatorie, in quanto è caratterizzata da una efficace azione immunosoppressiva [45]. Nonostante il suo ampio utilizzo, questo farmaco non è sempre efficace e in alcuni casi può indurre effetti collaterali importanti. Le cause di questa variabilità individuale non sono del tutto chiare, ma i polimorfismi genetici dell'enzima tiopurina metiltransferasi (TPMT) sono stati definiti come una causa importante di variabilità nella risposta, e sono uno degli esempi più chiari di marker farmacogenetici importanti dal punto di vista clinico [103].

Per esplicare i loro effetti farmacologici, le mercatopurine necessitano di un'attivazione intracellulare a nucleotidi tiopurinici. Nelle cellule, la mercatopurina è convertita dall'enzima HGTPR in thio-IMP e successivamente a tioguanosina monofosfato da un meccanismo che coinvolge gli enzimi inosina monofosfato deidrogenasi e guanosina monofosfato sintetasi [45]. Questo processo è in competizione con la metilazione da parte dell'enzima TPMT [70, 104]. TPMT converte la 6-MP nei metaboliti inattivi metilmercaptipurinici, ma metabolizza

anche tio-IMP in metil-tio-IMP, una molecola che può andare ad inibire la sintesi de novo delle purine [105]. Numerose varianti alleliche sono state associate con una ridotta attività dell'enzima TPMT: studi in varie popolazioni hanno dimostrato che TPMT*3A, *3C e *2 sono le varianti più frequentemente associate ad una ridotta attività dell'enzima [70, 104]. Queste varianti alleliche codificano per proteine che sono rapidamente degradate [104, 106].

Nel nostro studio, 3 pazienti pediatrici con MICI trattati con AZA da almeno 90 giorni, presentavano la variante allelica TPMT*3A: in questi pazienti i livelli di metaboliti plasmatici 6-TGN sono risultati significativamente più elevati (LME $p=0.014$), anche rapportandoli alla dose somministrata TGN/dose (LME $p=0.0001$). I 3 pazienti con TPMT*3A erano trattati con una dose di farmaco significativamente più bassa rispetto ai pazienti con genotipo wild type (LME $p=0.007$), e ciò è probabilmente dovuto al fatto che la terapia viene aggiustata dal clinico, in base all'efficacia e ad eventuali effetti collaterali.

Inoltre, come atteso, il genotipo variante era associato a livelli significativamente più bassi dei metaboliti plasmatici metilati (LME $p=0.0095$).

I nostri dati confermano dati precedenti di letteratura che hanno chiaramente dimostrato come i polimorfismi dell'enzima TPMT siano associati ad un aumento della concentrazione dei nucleotidi 6-TGN e ad un rischio significativamente più alto di tossicità ematopoietica in seguito al trattamento con AZA nelle leucemie [103], in diverse malattie infiammatorie [107] e nelle MICI [72, 108, 109] in pazienti adulti evidenziando come tale relazione sia importante anche nel bambino.

Come detto sopra, per esplicitare la sua azione farmacologica, l'AZA deve inizialmente essere convertita in 6-MP [46] attraverso una conversione mediata dal glutatione. Questa reazione è in parte non enzimatica [45], ma è anche controllata, come dimostrato da alcuni recenti lavori, dall'enzima GST, in particolar modo dalle isoforme A ed M [110-112].

Un recente studio condotto nel nostro laboratorio, ha analizzato un polimorfismo dell'isoforma GST-M che porta ad una delezione del gene con conseguente perdita di attività dell'enzima, dimostrando che in pazienti pediatrici con MICI trattati con AZA, il genotipo GST-M normale è associato alla comparsa di effetti avversi importanti come pancreatiti, neuropatia ed epatotossicità [113].

In questa tesi sono state quindi studiate le possibili correlazioni tra i polimorfismi dell'enzima GST-M e i livelli dei metaboliti plasmatici dell'AZA. Abbiamo

dimostrato un effetto statisticamente significativo della delezione dell'isoforma M dell'enzima GST sui livelli dei metaboliti dell'AZA: soggetti con delezione del gene presentano infatti una concentrazione più bassa dei metaboliti attivi 6-TGN (LME $p=0.010$) ed un rapporto TGN/dose più basso (LME $p= 0.0002$); questo suggerisce che nei soggetti GST-M deleti meno AZA verrebbe convertita in 6-MP a sua volta pro farmaco del metabolita attivo 6-TGN.

L'altra isoforma importante nell'attivazione dell'AZA è la GST-A: anche i polimorfismi di questa isoforma potrebbero avere un impatto nel metabolismo di questo immunosoppressore. Nel nostro studio abbiamo osservato una differenza significativa nel dosaggio di AZA tra i vari aplotipi, e i pazienti con aplotipo *A/*A assumevano un dosaggio mediamente più elevato. In letteratura i dati che riguardano questi polimorfismi non sono univoci, infatti alcuni autori hanno evidenziato una maggior espressione dell'enzima nel aplotipo *C [63], mentre altri hanno dimostrato che l'aplotipo *E ha una maggior efficienza catalitica nei confronti dell'AZA [65]. Nella nostra casistica non sono presenti soggetti con l'aplotipo *E, probabilmente per il ridotto numero di pazienti analizzati.

Oltre alle isoforme A e M del gene GST sono state valutate anche le isoforme P e T. Infatti, sebbene sia noto che queste isoforme non sono direttamente coinvolte nell'attivazione dell'AZA [51], in letteratura ci sono dati contrastanti per quanto riguarda la correlazione di queste isoforme e l'efficacia e la tossicità del farmaco [113]: i dati del presente studio non dimostrano un effetto dei genotipi GST-P e T sui livelli dei metaboliti plasmatici e sull'efficacia del farmaco.

Un altro enzima coinvolto nel metabolismo e nell'attivazione delle tiopurine è l'ITPA, questo enzima catalizza l'idrolisi dell'inosina trifosfato (ITP) a inosina monofosfato (IMP) [114]. IMP è un intermedio centrale nel metabolismo delle purine e può essere convertito principalmente a ITP. Il ruolo principale dell'ITPA è quello di proteggere le cellule dall'accumulo di potenziali nucleotidi dannosi (ITP) che potrebbero essere incorporati nell' RNA e nel DNA [78].

Anche l'ITPA presenta numerosi polimorfismi tra cui i più importanti sembrano essere il polimorfismo C94A e l'IVS2+21AC. Il polimorfismo C94A porta ad un'attività enzimatica nulla nei soggetti omozigoti e ad una riduzione fino al 35% nei soggetti eterozigoti, provocando un blocco nel ciclo metabolico purinico con conseguente accumulo di ITP. Tale condizione è benigna in soggetti sani [78], ma nei pazienti trattati con una tiopurina, la presenza di questo polimorfismo porta ad

un accumulo di tio-ITP. Mentre questa variante allelica non è stata associata a differenze nei valori di metaboliti 6-TGN, è stato dimostrato che, nelle cellule leucemiche e negli eritrociti di pazienti che presentano l'allele variante le concentrazioni dei metaboliti metilati dell'AZA sono significativamente più elevate [79]. Il meccanismo che sta alla base dell'accumulo di metaboliti non è ancora del tutto chiaro. Uno dei nucleotidi metilati della mercaptopurina è prodotto dall'azione diretta di TPMT sul tio-ITP [105]. Poiché l'ITPA trasforma il tio-ITP a tio-IMP, pazienti con ridotta attività di questo enzima dovrebbero avere un accumulo di tio-ITP e successivamente, per azione della TPMT, del nucleotide metilato metil-tio-ITP. In accordo con quanto dimostrato da Stocco e colleghi [113], nel nostro studio i 4 pazienti che presentavano un genotipo variante per il polimorfismo C94A del gene ITPA avevano concentrazioni dei metaboliti metilati significativamente più alte rispetto ai pazienti con genotipo wild type (LME $p=0.046$), mentre non era evidente una correlazione con i metaboliti 6-TGN.

Oltre agli aspetti genetici, sono state analizzate anche le correlazioni tra le variabili cliniche e demografiche dei pazienti e i livelli dei metaboliti plasmatici.

Nell'analisi multivariata i pazienti sono stati suddivisi in due gruppi in base alla risposta clinica e i pazienti con un indice di attività della malattia inferiore a 10 sono stati considerati in remissione.

Un dato sorprendente è che, nel nostro campione, la frequenza di remissione è significativamente più alta nei pazienti con RCU; come atteso è stata poi dimostrata una correlazione tra remissione della malattia e livelli dei metaboliti TGN in rapporto alla dose: nei pazienti con MICI in remissione il rapporto 6-TGN/dose è significativamente più elevato ($P=0.0048$) rispetto ai pazienti con malattia attiva, e questo rapporto è anche più alto nei pazienti con RCU rispetto a quelli affetti da MC ($p=0.0087$).

In letteratura la correlazione tra i metaboliti tiopurinici e la risposta alla terapia è stata dimostrata in pazienti leucemici [79], mentre in pazienti con MICI i dati sono meno convincenti [115]; i nostri risultati confermano il ruolo nella pratica clinica del dosaggio dei metaboliti per ottimizzare la terapia anche in questi pazienti. Studi prospettici dovranno essere realizzati in futuro, per valutare l'efficacia di strategie di dosaggio dell'AZA basate sulla quantificazione dei metaboliti e sull'analisi dei polimorfismi degli enzimi TPMT, GST-M e ITPA per migliorare la risposta al farmaco e ridurre gli effetti avversi.

Il test *in vitro*, da noi messo a punto su volontari sani, si è dimostrato semplice, riproducibile e facilmente applicabile alla clinica. Questo test, eseguibile rapidamente sulle cellule mononucleate dei pazienti, potrebbe infatti essere estremamente utile per predire la risposta individuale ai farmaci, e ottimizzare quindi il trattamento fin dalle primissime somministrazioni. Abbiamo testato la sensibilità *in vitro* di metilprednisolone e AZA, ottenendo risultati e prospettive future differenti: per quanto riguarda il saggio messo a punto per testare la sensibilità dei linfociti agli steroidi, il risultato interessante è l'associazione tra genotipo mutato per il polimorfismo *BclI* del gene NR3C1 ed una maggiore sensibilità *in vitro* a questi ormoni: questo dato si aggiunge alla correlazione significativa tra questo polimorfismo e una buona risposta al trattamento con GC osservata nei pazienti pediatrici con MICI. Le prospettive future prevedono l'allestimento di uno studio prospettico su pazienti pediatrici con MICI, per confermare i risultati mostrati in letteratura di una correlazione tra sensibilità *vivo-vitro* [116], analizzando la risposta ai GC nei linfociti per ogni paziente all'esordio, e dopo il primo ciclo di steroidi di circa 30 giorni.

Sulla base di questi risultati, si conferma il ruolo importante del polimorfismo *BclI*, risultato associato ad una migliore risposta ai GC nello studio retrospettivo, e correlato inoltre ad una maggior sensibilità *in vitro*, come marker genetico di risposta ai GC, che potrebbe essere utilizzato dal clinico per selezionare i pazienti responders dai non responders, e trattare questi ultimi con associazioni di altri immunosoppressori in maniera precoce.

Lo studio sulla sensibilità dell'AZA sui linfociti di volontari sani, non ha evidenziato correlazioni statisticamente significative tra i polimorfismi degli enzimi coinvolti nel metabolismo dell'AZA, e la sensibilità individuale a questo farmaco *in vitro*. È stata inoltre valutata l'eventuale correlazione tra la delezione dell'isoforma M dell'enzima GST, coinvolto nell'attivazione dell'AZA in 6-MP, e la sensibilità individuale ad AZA e 6-MP, ipotizzando una diversa IC_{50} nei pazienti con attività enzima nulla, e quindi minor attivazione dell'AZA. I risultati però non hanno confermato quest'ipotesi: pazienti deleti e non deleti rispondevano allo stesso modo ad entrambi i farmaci. Un possibile significato per questi risultati, può derivare dal fatto che il metabolismo dell'AZA è principalmente di tipo epatico, e i linfociti probabilmente non rappresentano un buon modello per studiare questa

correlazione: studi futuri riguarderanno l'utilizzo di linee cellulari epatiche, su cui verrà testata l'alterata sensibilità all'AZA e 6-MP, in condizioni di iperspressione o silenziamento dei geni di nostro interesse, tra cui GST.

Nel complesso, questa tesi ha sviluppato un set di valutazioni farmacologiche, integranti dati di farmacocinetica, farmacodinamica e farmacogenomica, da applicare all'ottimizzazione della terapia delle MICI pediatriche con steroidi ed AZA, in modo da aumentarne l'efficacia e ridurre gli effetti avversi. I markers che sono risultati essere correlati ad un'alterata risposta a questi farmaci potrebbero essere utilizzati dal clinico per selezionare i pazienti responders dai non responders, e per trattare questi ultimi con associazioni di altri immunosoppressori in maniera precoce.

BIBLIOGRAFIA

1. Castro, M., et al., *Inflammatory bowel disease in children and adolescents in Italy: data from the pediatric national IBD register (1996-2003)*. *Inflamm Bowel Dis*, 2008. **14**(9): p. 1246-52.
2. Hyams, J.S., et al., *Development and validation of a pediatric Crohn's disease activity index*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1991. **12**(4): p. 439-47.
3. Friedman, S., *Management of inflammatory bowel disease during pregnancy and nursing*. *Semin Gastrointest Dis*, 2001. **12**(4): p. 245-52.
4. Hampe, J., et al., *Association of NOD2 (CARD 15) genotype with clinical course of Crohn's disease: a cohort study*. *Lancet*, 2002. **359**(9318): p. 1661-5.
5. Hampe, J., et al., *A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1*. *Nat Genet*, 2007. **39**(2): p. 207-11.
6. Rioux, J.D., et al., *Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis*. *Nat Genet*, 2007. **39**(5): p. 596-604.
7. Dubinsky, M.C., et al., *IL-23 receptor (IL-23R) gene protects against pediatric Crohn's disease*. *Inflamm Bowel Dis*, 2007. **13**(5): p. 511-5.
8. Peltekova, V.D., et al., *Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease*. *Nat Genet*, 2004. **36**(5): p. 471-5.
9. Friedman S., B.R., *Harrison's Principles of internal Medicine-Inflammatory Bowel Disease* 17° edizione ed, ed. M. Graw-Hill. 2007.
10. Baumgart, D.C. and W.J. Sandborn, *Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies*. *Lancet*, 2007. **369**(9573): p. 1641-57.
11. Markowitz, J., et al., *A multicenter trial of 6-mercaptopurine and prednisone in children with newly diagnosed Crohn's disease*. *Gastroenterology*, 2000. **119**(4): p. 895-902.
12. Hyams, J., et al., *The natural history of corticosteroid therapy for ulcerative colitis in children*. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2006. **4**(9): p. 1118-23.
13. Markowitz, J., et al., *Corticosteroid therapy in the age of infliximab: acute and 1-year outcomes in newly diagnosed children with Crohn's disease*. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2006. **4**(9): p. 1124-9.
14. Hyams, J.S. and J.F. Markowitz, *Can we alter the natural history of Crohn disease in children?* *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2005. **40**(3): p. 262-72.
15. Hyams, J.S., et al., *Long-term outcome of maintenance infliximab therapy in children with Crohn's disease*. *Inflamm Bowel Dis*, 2009. **15**(6): p. 816-22.
16. DeRijk, R.H., M. Schaaf, and E.R. de Kloet, *Glucocorticoid receptor variants: clinical implications*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2002. **81**(2): p. 103-22.
17. Detera-Wadleigh, S.D., et al., *A TthIII1 polymorphism on the 5' flanking region of the glucocorticoid receptor gene (GRL)*. *Nucleic Acids Res*, 1991. **19**(8): p. 1960.
18. Webster, J.C., et al., *Mouse glucocorticoid receptor phosphorylation status influences multiple functions of the receptor protein*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(14): p. 9287-93.
19. Hollenberg, S.M. and R.M. Evans, *Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor*. *Cell*, 1988. **55**(5): p. 899-

- 906.
20. McKay, L.I. and J.A. Cidlowski, *Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways*. *Endocr Rev*, 1999. **20**(4): p. 435-59.
 21. Oakley, R.H., M. Sar, and J.A. Cidlowski, *The human glucocorticoid receptor beta isoform. Expression, biochemical properties, and putative function*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(16): p. 9550-9.
 22. Encio, I.J. and S.D. Detera-Wadleigh, *The genomic structure of the human glucocorticoid receptor*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(11): p. 7182-8.
 23. Chrousos, G.P., S.D. Detera-Wadleigh, and M. Karl, *Syndromes of glucocorticoid resistance*. *Ann Intern Med*, 1993. **119**(11): p. 1113-24.
 24. Charmandari, E., et al., *A novel point mutation in the ligand-binding domain (LBD) of the human glucocorticoid receptor (hGR) causing generalized glucocorticoid resistance: the importance of the C terminus of hGR LBD in conferring transactivational activity*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. **90**(6): p. 3696-705.
 25. van Rossum, E.F., et al., *A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene, which decreases sensitivity to glucocorticoids in vivo, is associated with low insulin and cholesterol levels*. *Diabetes*, 2002. **51**(10): p. 3128-34.
 26. Huizenga, N.A., et al., *A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene may be associated with and increased sensitivity to glucocorticoids in vivo*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998. **83**(1): p. 144-51.
 27. van Rossum, E.F., et al., *Identification of the BclI polymorphism in the glucocorticoid receptor gene: association with sensitivity to glucocorticoids in vivo and body mass index*. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2003. **59**(5): p. 585-92.
 28. Panarelli, M., et al., *Glucocorticoid receptor polymorphism, skin vasoconstriction, and other metabolic intermediate phenotypes in normal human subjects*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998. **83**(6): p. 1846-52.
 29. Rosmond, R., et al., *A glucocorticoid receptor gene marker is associated with abdominal obesity, leptin, and dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis*. *Obes Res*, 2000. **8**(3): p. 211-8.
 30. Derijk, R.H., et al., *A human glucocorticoid receptor gene variant that increases the stability of the glucocorticoid receptor beta-isoform mRNA is associated with rheumatoid arthritis*. *J Rheumatol*, 2001. **28**(11): p. 2383-8.
 31. van Winsen, L.M., et al., *A glucocorticoid receptor gene haplotype (TthIII1/ER22/23EK/9beta) is associated with a more aggressive disease course in multiple sclerosis*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009. **94**(6): p. 2110-4.
 32. Church, L.D., G.P. Cook, and M.F. McDermott, *Primer: inflammasomes and interleukin 1beta in inflammatory disorders*. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2008. **4**(1): p. 34-42.
 33. Dinarello, C.A., *Therapeutic strategies to reduce IL-1 activity in treating local and systemic inflammation*. *Curr Opin Pharmacol*, 2004. **4**(4): p. 378-85.
 34. Shanahan, F., *Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut V. Mechanisms of immunologic sensation of intestinal contents*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000. **278**(2): p. G191-6.
 35. Balding, J., et al., *Inflammatory bowel disease: the role of inflammatory cytokine gene polymorphisms*. *Mediators Inflamm*, 2004. **13**(3): p. 181-7.
 36. Nemetz, A., et al., *IL1B gene polymorphisms influence the course and severity of inflammatory bowel disease*. *Immunogenetics*, 1999. **49**(6): p.

- 527-31.
37. Alnemri, E.S., et al., *Human ICE/CED-3 protease nomenclature*. Cell, 1996. **87**(2): p. 171.
 38. Schmitz, J., et al., *IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines*. Immunity, 2005. **23**(5): p. 479-90.
 39. Martinon, F., et al., *NALP inflammasomes: a central role in innate immunity*. Semin Immunopathol, 2007. **29**(3): p. 213-29.
 40. Schreiber, S., et al., *Genetics of Crohn disease, an archetypal inflammatory barrier disease*. Nat Rev Genet, 2005. **6**(5): p. 376-88.
 41. Srinivasula, S.M., et al., *The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1*. J Biol Chem, 2002. **277**(24): p. 21119-22.
 42. Jin, Y., et al., *NALP1 in vitiligo-associated multiple autoimmune disease*. N Engl J Med, 2007. **356**(12): p. 1216-25.
 43. De Iudicibus, S., et al., *Association of Bcll polymorphism of the glucocorticoid receptor gene locus with response to glucocorticoids in inflammatory bowel disease*. Gut, 2007. **56**(9): p. 1319-20.
 44. De Iudicibus, S., et al., *Genetic predictors of glucocorticoid response in pediatric patients with inflammatory bowel diseases*. J Clin Gastroenterol. **45**(1): p. e1-7.
 45. Elion, G.B., *The purine path to chemotherapy*. Science, 1989. **244**(4900): p. 41-7.
 46. Lennard, L., *The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine*. Eur J Clin Pharmacol, 1992. **43**(4): p. 329-39.
 47. Al Hadithy, A.F., et al., *Thiopurines in inflammatory bowel disease: pharmacogenetics, therapeutic drug monitoring and clinical recommendations*. Dig Liver Dis, 2005. **37**(4): p. 282-97.
 48. Gilman's, G.e., *The pharmacological basis of therapeutics*. 11th ed, ed. M.P.D. Mc Graw-Hill. 2006.
 49. Venkat Raman, G., V.L. Sharman, and H.A. Lee, *Azathioprine and allopurinol: a potentially dangerous combination*. J Intern Med, 1990. **228**(1): p. 69-71.
 50. Ng, H.J. and M.A. Crowther, *Azathioprine and inhibition of the anticoagulant effect of warfarin: evidence from a case report and a literature review*. Am J Geriatr Pharmacother, 2006. **4**(1): p. 75-7.
 51. Eklund, B.I., et al., *Divergent activities of human glutathione transferases in the bioactivation of azathioprine*. Mol Pharmacol, 2006. **70**(2): p. 747-54.
 52. Boobis AR, B.D., Davies DM, Harrison PI, Orme MLE, Park BK et al, *Therapeutic Drugs*, ed. C. Livingstone. Vol. Vol. 2. 1991.
 53. Fraser, J.H., et al., *Individual variation in inosine triphosphate accumulation in human erythrocytes*. Clin Biochem, 1975. **8**(6): p. 353-64.
 54. Smith, M.A., et al., *Novel pharmacogenetic markers for treatment outcome in azathioprine-treated inflammatory bowel disease*. Aliment Pharmacol Ther, 2009. **30**(4): p. 375-84.
 55. Schwab, M. and U. Klotz, *Pharmacokinetic considerations in the treatment of inflammatory bowel disease*. Clin Pharmacokinet, 2001. **40**(10): p. 723-51.
 56. Coles, B.F. and F.F. Kadlubar, *Human alpha class glutathione S-transferases: genetic polymorphism, expression, and susceptibility to disease*. Methods Enzymol, 2005. **401**: p. 9-42.
 57. Hayes, J.D., J.U. Flanagan, and I.R. Jowsey, *Glutathione transferases*.

- Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2005. **45**: p. 51-88.
58. Bora, P.S., et al., *Human fatty acid ethyl ester synthase-III gene: genomic organization, nucleotide sequencing and chromosomal localization*. Mol Cell Biochem, 1997. **173**(1-2): p. 145-51.
59. Morrow, C.S., K.H. Cowan, and M.E. Goldsmith, *Structure of the human genomic glutathione S-transferase-pi gene*. Gene, 1989. **75**(1): p. 3-11.
60. Hayes, J.D. and R.C. Strange, *Potential contribution of the glutathione S-transferase supergene family to resistance to oxidative stress*. Free Radic Res, 1995. **22**(3): p. 193-207.
61. Mendoza, J.L., et al., *MDR1 polymorphisms and response to azathioprine therapy in patients with Crohn's disease*. Inflamm Bowel Dis, 2007. **13**(5): p. 585-90.
62. Tetlow, N., D. Liu, and P. Board, *Polymorphism of human Alpha class glutathione transferases*. Pharmacogenetics, 2001. **11**(7): p. 609-17.
63. Ning, B., et al., *Human glutathione S-transferase A2 polymorphisms: variant expression, distribution in prostate cancer cases/controls and a novel form*. Pharmacogenetics, 2004. **14**(1): p. 35-44.
64. Tetlow, N. and P.G. Board, *Functional polymorphism of human glutathione transferase A2*. Pharmacogenetics, 2004. **14**(2): p. 111-6.
65. Zhang, W., O. Moden, and B. Mannervik, *Differences among allelic variants of human glutathione transferase A2-2 in the activation of azathioprine*. Chem Biol Interact. **186**(2): p. 110-7.
66. Cotton, S.C., et al., *Glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer: a HuGE review*. Am J Epidemiol, 2000. **151**(1): p. 7-32.
67. Verlaan, M., et al., *Glutathione S-transferase Mu null genotype affords protection against alcohol induced chronic pancreatitis*. Am J Med Genet A, 2003. **120A**(1): p. 34-9.
68. Welfare, M., et al., *Polymorphisms in GSTP1, GSTM1, and GSTT1 and susceptibility to colorectal cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1999. **8**(4 Pt 1): p. 289-92.
69. Ujiie, S., et al., *Functional characterization of 23 allelic variants of thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT*2 - *24)*. Pharmacogenet Genomics, 2008. **18**(10): p. 887-93.
70. Yates, C.R., et al., *Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance*. Ann Intern Med, 1997. **126**(8): p. 608-14.
71. Pierik, M., et al., *Pharmacogenetics in inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(23): p. 3657-67.
72. Gisbert, J.P., et al., *Thiopurine methyltransferase (TPMT) activity and adverse effects of azathioprine in inflammatory bowel disease: long-term follow-up study of 394 patients*. Am J Gastroenterol, 2006. **101**(12): p. 2769-76.
73. Rashidi, M.R., et al., *In vitro study of 6-mercaptopurine oxidation catalysed by aldehyde oxidase and xanthine oxidase*. Drug Metab Pharmacokinet, 2007. **22**(4): p. 299-306.
74. Kitamura, S., K. Sugihara, and S. Ohta, *Drug-metabolizing ability of molybdenum hydroxylases*. Drug Metab Pharmacokinet, 2006. **21**(2): p. 83-98.
75. Moriwaki, Y., et al., *Widespread cellular distribution of aldehyde oxidase in human tissues found by immunohistochemistry staining*. Histol Histopathol, 2001. **16**(3): p. 745-53.

76. Al-Salmy, H.S., *Individual variation in hepatic aldehyde oxidase activity*. IUBMB Life, 2001. **51**(4): p. 249-53.
77. Marinaki, A.M., et al., *Genetic determinants of the thiopurine methyltransferase intermediate activity phenotype in British Asians and Caucasians*. Pharmacogenetics, 2003. **13**(2): p. 97-105.
78. Sumi, S., et al., *Genetic basis of inosine triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency*. Hum Genet, 2002. **111**(4-5): p. 360-7.
79. Stocco, G., K.R. Crews, and W.E. Evans, *Genetic polymorphism of inosine-triphosphate-pyrophosphatase influences mercaptopurine metabolism and toxicity during treatment of acute lymphoblastic leukemia individualized for thiopurine-S-methyl-transferase status*. Expert Opin Drug Saf. **9**(1): p. 23-37.
80. Ardizzone, S., et al., *Randomised controlled trial of azathioprine and 5-aminosalicylic acid for treatment of steroid dependent ulcerative colitis*. Gut, 2006. **55**(1): p. 47-53.
81. Binder, V., C. Hendriksen, and S. Kreiner, *Prognosis in Crohn's disease--based on results from a regional patient group from the county of Copenhagen*. Gut, 1985. **26**(2): p. 146-50.
82. Aberra, F.N. and G.R. Lichtenstein, *Review article: monitoring of immunomodulators in inflammatory bowel disease*. Aliment Pharmacol Ther, 2005. **21**(4): p. 307-19.
83. Venables, W. and B. Ripley, *Modern applied statistic with S*. 2002: Springer.
84. Davies, S.M., et al., *Pharmacogenetics of minimal residual disease response in children with B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group*. Blood, 2008. **111**(6): p. 2984-90.
85. Cuzzoni, E., et al., *Association between BclI polymorphism in the NR3C1 gene and in vitro individual variations in lymphocyte-responses to methylprednisolone*. Br J Clin Pharmacol.
86. Sawczenko, A., et al., *Prospective survey of childhood inflammatory bowel disease in the British Isles*. Lancet, 2001. **357**(9262): p. 1093-4.
87. van Rossum, E.F., et al., *Identification of the BclI polymorphism in the glucocorticoid receptor gene: association with sensitivity to glucocorticoids in vivo and body mass index*. Clinical Endocrinology, 2003. **59**(5): p. 585-92.
88. Ukkola, O., et al., *Glucocorticoid receptor Bcl I variant is associated with an increased atherogenic profile in response to long-term overfeeding*. Atherosclerosis, 2001. **157**(1): p. 221-4.
89. Buemann, B., et al., *Abdominal visceral fat is associated with a BclI restriction fragment length polymorphism at the glucocorticoid receptor gene locus*. Obes Res, 1997. **5**(3): p. 186-92.
90. Di Blasio, A.M., et al., *The relation between two polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and body mass index, blood pressure and cholesterol in obese patients*. Clinical Endocrinology, 2003. **59**(1): p. 68-74.
91. Tremblay, A., et al., *Long-term adiposity changes are related to a glucocorticoid receptor polymorphism in young females*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(7): p. 3141-5.
92. Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp, *The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta*. Mol Cell, 2002. **10**(2): p. 417-26.

93. Martinon, F., K. Hofmann, and J. Tschopp, *The pyrin domain: a possible member of the death domain-fold family implicated in apoptosis and inflammation*. *Curr Biol*, 2001. **11**(4): p. R118-20.
94. Jin, Y., et al., *Genetic variations in NALP1 are associated with generalized vitiligo in a Romanian population*. *J Invest Dermatol*, 2007. **127**(11): p. 2558-62.
95. Magitta, N.F., et al., *A coding polymorphism in NALP1 confers risk for autoimmune Addison's disease and type 1 diabetes*. *Genes Immun*, 2009. **10**(2): p. 120-4.
96. Hugot, J.P., et al., *Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease*. *Nature*, 2001. **411**(6837): p. 599-603.
97. Miceli-Richard, C., et al., *CARD15 mutations in Blau syndrome*. *Nat Genet*, 2001. **29**(1): p. 19-20.
98. Ting, J.P., D.L. Kastner, and H.M. Hoffman, *CATERPILLERS, pyrin and hereditary immunological disorders*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(3): p. 183-95.
99. Raddatz, D., M. Bockemuhl, and G. Ramadori, *Quantitative measurement of cytokine mRNA in inflammatory bowel disease: relation to clinical and endoscopic activity and outcome*. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2005. **17**(5): p. 547-57.
100. Sawa, Y., et al., *Comprehensive analysis of intestinal cytokine messenger RNA profile by real-time quantitative polymerase chain reaction in patients with inflammatory bowel disease*. *Int J Mol Med*, 2003. **11**(2): p. 175-9.
101. Romberg-Camps, M.J., et al., *Influence of phenotype at diagnosis and of other potential prognostic factors on the course of inflammatory bowel disease*. *Am J Gastroenterol*, 2009. **104**(2): p. 371-83.
102. Svec, F., J. Yeakley, and R.W. Harrison, 3rd, *Progesterone enhances glucocorticoid dissociation from the AtT-20 cell glucocorticoid receptor*. *Endocrinology*, 1980. **107**(2): p. 566-72.
103. Relling, M.V., et al., *Mercaptopurine therapy intolerance and heterozygosity at the thiopurine S-methyltransferase gene locus*. *J Natl Cancer Inst*, 1999. **91**(23): p. 2001-8.
104. Krynetski, E. and W.E. Evans, *Drug methylation in cancer therapy: lessons from the TPMT polymorphism*. *Oncogene*, 2003. **22**(47): p. 7403-13.
105. Krynetski, E.Y., et al., *Methylation of mercaptopurine, thioguanine, and their nucleotide metabolites by heterologously expressed human thiopurine S-methyltransferase*. *Mol Pharmacol*, 1995. **47**(6): p. 1141-7.
106. Tai, H.L., et al., *Thiopurine S-methyltransferase deficiency: two nucleotide transitions define the most prevalent mutant allele associated with loss of catalytic activity in Caucasians*. *Am J Hum Genet*, 1996. **58**(4): p. 694-702.
107. Schedel, J., et al., *Impact of thiopurine methyltransferase activity and 6-thioguanine nucleotide concentrations in patients with chronic inflammatory diseases*. *Ann N Y Acad Sci*, 2006. **1069**: p. 477-91.
108. Ansari, A., et al., *Prospective evaluation of the pharmacogenetics of azathioprine in the treatment of inflammatory bowel disease*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2008. **28**(8): p. 973-83.
109. Roblin, X., et al., *A 6-thioguanine nucleotide threshold level of 400 pmol/8 x 10⁸ erythrocytes predicts azathioprine refractoriness in patients with inflammatory bowel disease and normal TPMT activity*. *Am J Gastroenterol*, 2008. **103**(12): p. 3115-22.
110. Kaplowitz, N., *Enzymatic thiolysis of azathioprine in vitro*. *Biochem*

- Pharmacol, 1976. **25**(21): p. 2421-6.
111. Kaplowitz, N. and J. Kuhlenkamp, *Inhibition of hepatic metabolism of azathioprine in vivo*. Gastroenterology, 1978. **74**(1): p. 90-2.
 112. Cara, C.J., et al., *Reviewing the mechanism of action of thiopurine drugs: towards a new paradigm in clinical practice*. Med Sci Monit, 2004. **10**(11): p. RA247-54.
 113. Stocco, G., et al., *Glutathione-S-transferase genotypes and the adverse effects of azathioprine in young patients with inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2007. **13**(1): p. 57-64.
 114. Bierau, J., M. Lindhout, and J.A. Bakker, *Pharmacogenetic significance of inosine triphosphatase*. Pharmacogenomics, 2007. **8**(9): p. 1221-8.
 115. Osterman, M.T., et al., *Association of 6-thioguanine nucleotide levels and inflammatory bowel disease activity: a meta-analysis*. Gastroenterology, 2006. **130**(4): p. 1047-53.
 116. Hirano, T., et al., *Individual variations in lymphocyte-responses to glucocorticoids in patients with bronchial asthma: comparison of potencies for five glucocorticoids*. Immunopharmacology, 1998. **40**(1): p. 57-66.