

# Farmacogenetica e farmacogenomica in pediatria: stato dell'arte e prospettive future

Roberta Russo<sup>1,2</sup>, Mario Capasso<sup>1,2</sup>, Achille Iolascon<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di "Federico II", Napoli, Italia

<sup>2</sup>CEINGE Biotecnologie Avanzate, Napoli, Italia

## Riassunto

La variabilità genetica interindividuale è in grado di spiegare la notevole diversità di effetti osservata durante un trattamento farmacologico. La diversa risposta ai farmaci è stata correlata alle differenze genetiche tra gli individui in numerosi studi; la maggior parte di questi, tuttavia, è stata condotta su popolazioni adulte. Di contro, poca attenzione è stata riservata alla popolazione pediatrica. I pazienti pediatrici costituiscono un gruppo particolarmente vulnerabile riguardo al trattamento farmacologico, poiché essi presentano un ulteriore grado di variabilità derivante dalle varie fasi dello sviluppo. Ad oggi, pochi passi sono stati fatti nell'ambito della farmacogenomica dello sviluppo.

Questa *review* si propone di descrivere le principali differenze nella risposta farmacologica tra adulti e bambini, nonché di fornire alcuni esempi di applicazione di studi di farmacogenetica condotti nell'ambito di trattamenti farmacologici di alcune delle condizioni infantili più comuni. Scopo ulteriore è quello di offrire una panoramica sulle implicazioni e l'importanza delle scienze "omiche", genomica, trascrittomica, miRnomica, proteomica e metabonomica negli studi di farmacogenetica e farmacogenomica.

## Summary

*Genetic variability among individuals explains the remarkable diversity of the effects observed during pharmacological treatment. Nevertheless, most studies in this field have been conducted in adults, and little attention has been paid to the pediatric population. Children are particularly vulnerable with respect to the pharmacological treatment, since they may have different stages of development. Until now, few studies have been published in the field of the developmental pharmacogenomics.*

*This review aims to describe the main differences in the drug response between adults and children, as well as to provide some paradigmatic examples of pharmacogenetic studies conducted as part of the pharmacological treatment of a group of extremely common childhood disorders. An additional objective is to provide an overview of the implications and importance of omics sciences, genomics, transcriptomics, miRnomics, proteomics and metabonomics in pharmacogenetics and pharmacogenomics studies.*

## Introduzione

Nell'era della genomica è sempre più evidente la necessità di considerare lo stato genomico dell'individuo come fattore essenziale per la scelta di un farmaco e del suo dosaggio. Le differenze genetiche interindividuali sono in grado di spiegare, in parte, la variabilità della farmacocinetica, dell'efficacia e della tossicità di alcuni farmaci. Esistono numerosi esempi di differenze nella risposta farmacologica determinate da polimorfismi genetici o alterazioni dell'espressione di geni del metabolismo dei farmaci, ma la maggior parte di questi studi sono condotti su popolazioni di individui adulti. Ben pochi sono i lavori in tale ambito condotti su popolazioni pediatriche.

Questa *review* si propone di descrivere le principali differenze biologiche del metabolismo dei farmaci tra bambini e adulti, allo scopo di fornire una panoramica sui campi di ricerca farmacogenetica e -genomica in rapida evoluzione; si propone, inoltre, di illustrare l'impatto che questi studi possono avere sullo sviluppo della medicina personalizzata, soprattutto nei pazienti pediatrici.

### Farmacogenomica e Farmacogenetica

Il termine farmacogenomica (PGx) si riferisce allo studio di geni che modulano la risposta farmacologica; la farmacogenetica (PGt) è un sottoinsieme della PGx, definita come l'influenza di variazioni nella sequenza del DNA sulla risposta al farmaco. In entrambe le definizioni, il termine "risposta al farmaco" include i concetti di biodispo-

nibilità e di effetto dello stesso. La PGx è perlopiù finalizzata alla ricerca e identificazione di nuovi bersagli terapeutici, allo sviluppo di farmaci e allo studio della risposta ad essi correlata. La PGt si occupa, invece, di studiare la variabilità di risposta a un farmaco dovuta a fattori genetici allo scopo di correlarla al dosaggio farmacologico e al rischio di interazioni farmaco-farmaco clinicamente rilevanti (Krekels et al., 2007).

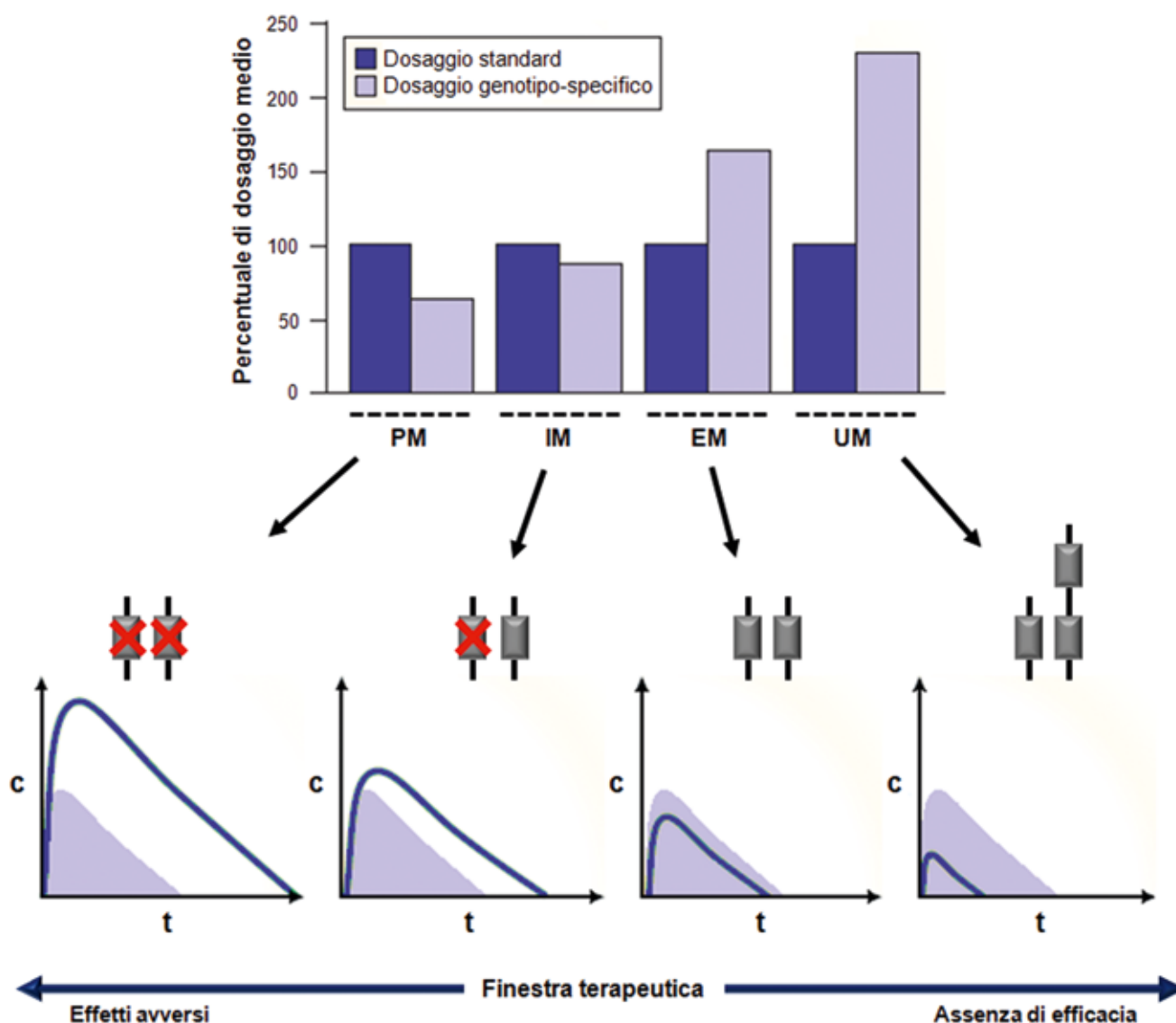
I farmaci possono avere diverse azioni sugli individui, adulti e bambini, a causa di polimorfismi genetici, ovvero differenze di sequenza del DNA tra diversi soggetti. Esistono diversi tipi di alterazioni genetiche, polimorfismi di singolo nucleotide (SNP), variazioni del numero di copie (CNV) e del numero di ripetizioni in tandem (VNTR), microsatelliti e riarrangiamenti citogenetici.

Sono stati descritti effetti avversi ai farmaci (ADR), anche letali, attribuibili a polimorfismi genetici in geni coinvolti nel metabolismo e nella distribuzione dei farmaci, che inducono alterazioni della loro concentrazione e dei loro metaboliti attivi. In particolare, i polimorfismi possono influenzare la variabilità farmacocinetica e la biodisponibilità modulando l'attività di enzimi metabolizzanti (*drug metabolizing enzyme*, DME), di proteine di trasporto (*drug transport protein*, DTP), di proteine sieriche di legame e di fattori di trascrizione (Katz et al., 2008). Uno dei DME più studiati nell'ambito della PGt è il citocromo P450 CYP2D6, responsabile del metabolismo del 25% dei farmaci presenti sul mercato (Teh et al., 2012). Il gene *CYP2D6* è altamente polimorfico, con più di 80

varianti alleliche descritte ad oggi (<http://www.imm.ki.se/cypalleles/cyp2d6.htm>). In particolare, alterazioni dell'attività enzimatica sono state associate a variazioni del numero di copie del gene (Fig. 1). Un esempio, è quello, descritto nel 2006, dell'avvelenamento da morfina (metabolita attivo della codeina) di un neonato allattato da madre sottoposta a trattamento con codeina, classificata poi come metabolizzatrice ultra-rapida per il CYP2D6, in quanto eterozigote per l'allele CYP2D6\*2A con duplicazione del gene. Dato che la frequenza di tale variante è piuttosto elevata in alcune popolazioni (10% in Grecia e Portogallo, 29% in Etiopia), tale polimorfismo è da considerarsi clinicamente rilevante (Koren et al., 2006). L'esempio fornito dal CYP2D6 dimostra come definire

il genotipo di enzimi metabolizzanti possa essere utile nel prevenire sovradosaggi, con conseguenti ADR, o dosaggi sub terapeutici (Kirchheiner et al., 2005) (Fig. 1).

Esistono evidenze a sostegno dell'introduzione della PGt nella prescrizione dei farmaci come elemento per migliorare sensibilmente la sicurezza e l'efficacia della terapia (Stanulla et al., 2005). Tuttavia, attualmente poche linee guida collegano i risultati dei test di PGt a specifiche raccomandazioni terapeutiche. A tale scopo, è stato recentemente istituito un Gruppo di Lavoro della farmacogenetica che ha provveduto a sviluppare raccomandazioni per più di 50 farmaci associati a geni che codificano per numerose proteine coinvolte nel loro metabolismo (Swen et al., 2011).



**Figura 1.**

Regolazione del dosaggio in relazione all'attività enzimatica geneticamente predetta.

La figura illustra il potenziale beneficio della modulazione del dosaggio in relazione al genotipo dell'enzima metabolizzante. L'esempio qui presentato è quello del polimorfismo CNV del CYP2D6, ma il principio può essere trasferito a qualsiasi enzima metabolizzare (che significa metabolizzare? Errore di battuta?) o trasportatore geneticamente polimorfico.

Le curve tempo-concentrazione a dosi standard risultano in un livello di esposizione basso (espresso come AUC, area sotto la curva) nei metabolizzatori estensivi (EM) e ultra-rapidi (UM), portatori di un genotipo con due alleli e di uno duplicato del gene, rispettivamente; al contrario, i metabolizzatori intermedi (IM) e lenti (PM), portatori di un genotipo con delezione di un solo allele o di entrambi rispettivamente, hanno una curva AUC aumentata, con conseguente incremento di effetti avversi. Questo è tipico della relazione lineare tra il numero di alleli attivi di un gene del metabolismo dei farmaci e la misura della *clearance* del farmaco stesso. c, concentrazione di farmaco; t, tempo (Adattata da Kirchheiner et al., 2005).

## Risposta farmacologica in adulti e bambini: cosa cambia?

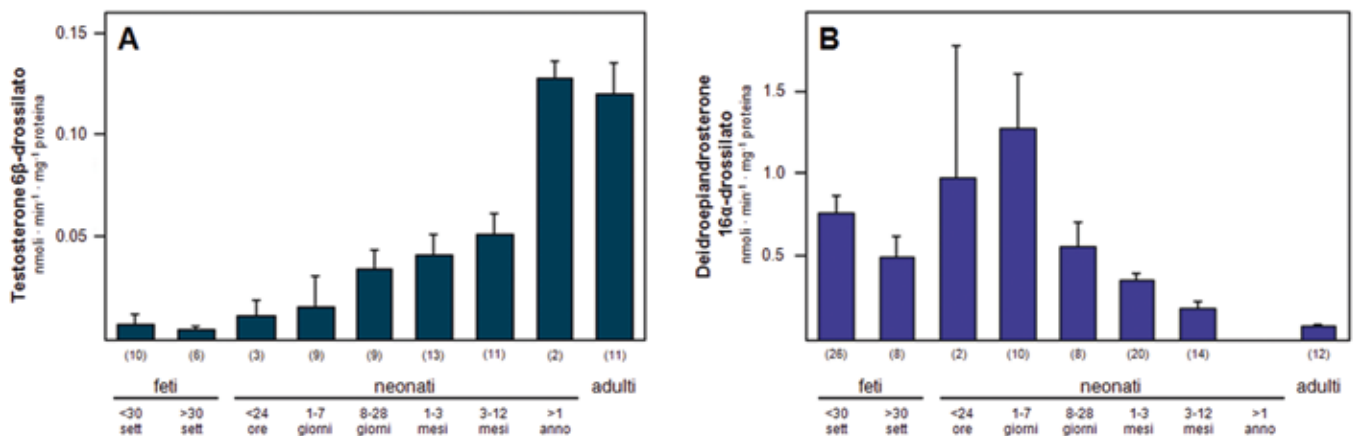
La prima considerazione da fare nel campo della ricerca pediatrica è che lo sviluppo umano, dal periodo prenatale fino alla adolescenza, è un processo dinamico. Neonati e bambini vanno incontro rapidamente a fasi di crescita e mostrano un'ampia variabilità nella risposta ai farmaci e nella capacità di metabolizzarli (Leeder, 2003). Si presume che gli effetti dei farmaci siano differenti nei bambini, ma l'origine di questa percezione deriva dalla mancanza di uno studio adeguato nella popolazione pediatrica a differenti età e in diversi stati patologici (Stephenson, 2005). Mentre è noto il ruolo dei polimorfismi genetici, ben poca attenzione è rivolta alla farmacogenomica dello sviluppo. Alcuni geni sono espressi molto più nelle fasi precoci della vita che negli adulti e tale *switching* genetico può dare origine ad una situazione in cui un farmaco è efficace in una età ma non in un'altra. Uno degli esempi di tale situazione è rappresentato dai geni della famiglia *CYP3A*: l'attività totale della proteina *CYP3A* per l'intero periodo di sviluppo rimane costante, bilanciandosi tra le isoforme *CYP3A7* e *CYP3A4*: tuttavia, differenze nella capacità metabolica durante lo sviluppo possono essere osservate, dal momento che le due isoforme presentano diverse specificità di substrato ed efficacia catalitica (Lacroix et al., 1997) (Fig. 2). La maggior parte dei DME è meno sviluppata nei bambini. Un esempio è l'UDP glucuronosiltransferasi (*UGT*), enzima essenziale per l'eliminazione di sostanze xenobiotiche nonché endogene, come la bilirubina. Alla nascita è presente solo l'1% del normale livello di attività epatica dell'*UGT* dell'adulto. La maturazione post-natale vede un progressivo e rapido aumento di attività enzimatica fino al raggiungimento dei livelli adulti entro 14 settimane (Kawade et al., 1981), probabilmente in relazione allo stato di metilazione e acetilazione del locus genico dell'enzima.

## Studi di farmacogenetica in patologie dell'infanzia

Il numero di associazioni farmacogenetiche è aumentato nel corso degli anni. Dati per oltre 2000 geni coinvolti nella risposta ai farmaci sono stati annotati nel *database* PharmGKB (Tabb. I-II). Presentiamo, di seguito, una panoramica di studi di PGt condotti nell'ambito di trattamenti farmacologici di alcune delle condizioni infantili più comuni.

### Disturbo da deficit di attenzione/iperattività (ADHD)

L'ADHD è un disordine multifattoriale caratterizzato da iperattività fisica e disinibizione comportamentale che emerge, in genere, durante l'infanzia o l'adolescenza e spesso persiste in età adulta. Il trattamento farmacologico più comune è la somministrazione di metilfenidato (MPH), con un tasso di risposta del 70% (Spencer et al., 1996). La PGt dell'ADHD è stata in gran parte orientata all'indagine sui geni del sistema delle catecolamine, bersagli farmacologici dell'MPH. Come mostrato in Tabella I, diversi sono i polimorfismi genetici associati ad un'alterata risposta farmacologica. Tuttavia, nonostante l'elevato numero di studi in questo ambito, una definizione conclusiva non può essere ancora fornita. Una recente metanalisi della letteratura ha mostrato che la maggior parte dei risultati ottenuti fino ad ora sono ingannevoli. L'unico dato positivo è quello relativo al polimorfismo VNTR del gene *DAT1*, trasportatore della dopamina (Contini et al., 2012). Anche su questo punto, tuttavia, esistono risultati contrastanti. Alcuni autori hanno dimostrato una scarsa risposta all'MPH in individui omozigoti per l'allele con 10 ripetizioni (480 bp) del gene (Roman et al., 2002); altri riferiscono, per lo stesso allele, un miglior esito clinico (Kirley et al., 2003) o l'assenza di effetto sulla risposta al medesimo trattamento farmacologico (Langley et al., 2005).



**Figura 2.**

Regolazione dell'attività enzimatica del *CYP3A* durante l'ontogenesi.

Le isoforme enzimatiche *CYP3A4* e *CYP3A7* hanno diverse specificità di substrato e ciò ha consentito il monitoraggio della loro attività durante l'ontogenesi. Il pannello A mostra l'attività del *CYP3A4* valutata misurando l'idrossilazione 6β del testosterone. Il grafico mostra un livello di attività estremamente basso nel fegato fetale (meno del 10% dell'attività dell'adulto) con incremento progressivo dalla nascita, con valori pari al 30-40% di quelli riscontrati negli adulti in neonati di età compresa tra 8 giorni e 12 mesi. I livelli di attività degli adulti vengono raggiunti dopo 1 anno di età. Il pannello B mostra l'attività del *CYP3A7* valutata misurando l'idrossilazione 16α deidroepiandrosterone.

L'enzima *CYP3A7* ha un livello di attività enzimatica rilevabile già a 50-60 giorni di età gestazionale; la sua attività comincia a declinare progressivamente dopo la prima settimana dalla nascita, raggiungendo livelli molto bassi (10 volte inferiore a quella del fegato fetale) negli adulti entro il primo anno di età (Adattata da Lacroix et al., 1997).

**Tabella I.**

Polimorfismi genetici in alcune condizioni comuni dell'infanzia.

Gene	PharmGKB ID	Polimorfismo genetico	*HGVS ID	Localizzazione e funzione del polimorfismo	Effetti biochimici e clinici	§PMID
<b>Disturbo da deficit di attenzione/ iperattività (ADHD)</b>						
DRD4	PA27480	VNTR (2-11 repeats)	–	regione codificante (48 bp sequence)	Gli alleli più corti (2-4 ripetizioni) hanno una riduzione della risposta alla dopamina	1319557; 17979513; 19336242
DAT1	PA311	VNTR (3, 9-10 repeats)	–	3'UTR (40 bp sequence)	L'omozigosità per allele di 480 bp (10 ripetizioni) è associata con scarsa risposta al MPH	10596245; 12172219; 18563707; 7717410
5-HTT	PA312	DIP (rs12720056)	–	promotore (-1212 to -1255)	La delezione di 44 bp riduce i livelli di espressione del gene	11425009; 18200432; 8632190
SNAP-25	PA35980	SNP (rs3746544)	NM_003081.2: c.*239G>T NM_130811.1: c.*239G>T	3'UTR (1065 T>G)	L'allele T migliora la risposta alla dose standard di MPH	15950004; 17023870
COMT	PA117	SNP (rs4680)	NM_000754.2: c.472G>A	regione codificante (Val158Met)	L'allele Val o il genotipo Val/Val esibisce una risposta migliore al MPH	18214865
ADRA2A	PA35	SNP (rs1800544)	NT_030059.12: g.31585029G>C	promotore (-1291 dall'ATG)	L'allele G migliora gli effetti del MPH su sintomi di disattenzione dopo 1 mese di trattamento	17283289; 18200436
<b>Asma</b>						
ADRB2	PA39	SNP (rs1042713)	NM_000024.4: c.46G>A	regione codificante (Arg16Gly)	L'allele Arg migliora la risposta all'albuterolo	9399966; 10340917
		SNP (rs1042714)	NM_000024.4: c.79G>C	regione codificante (Gln27Glu)	Nessuna associazione con la risposta all'albuterolo	
AC9	PA30	SNP (rs2230739)	NM_001116.2: c.2316A>G	regione codificante (Ile772Met)	L'allele Met migliora la risposta all'albuterolo	15879435
CRHR1	PA26874	SNP (rs242941)	NM_004382.3: c.122-1310C>A	introne	L'allele G migliora la funzione polmonare in risposta ai corticosteroidi inalati	15128701; 19210659
TBX21	PA36362	SNP (rs2240017)	NM_013351.1: c.99C>G	regione codificante (His33Gln)	L'allele Gln potenzia gli effetti dei corticosteroidi per via inalatoria sulla reattività delle vie aeree	15604153
LTC4S	PA235	SNP (rs730012)	NT_023133.12: g.24030224A>C	promotore (-444 dall'ATG)	All'allele C si associa una riduzione del rischio di esacerbazione dell'asma	10992553; 14520724
CYSLTR1	PA38453	SNP (rs320995)	NM_006639.2: c.927C>T	regione codificante (Phe309Phe)		19080797
ALOX5	PA46	DIP (rs71921156)	–	5' a monte del gene (-/GGGCGG)	L'omozigosità per gli alleli mutanti (3,4,6 ripetizioni in tandem) riduce la risposta di funzionalità polmonare al trattamento con ABT-761 che significa?	10369259; 12911785; 10369259
ORMDL3	PA32821	rs7216389	NM_001042471.1: c.236-1199G>A	locus che controlla l'espressione genica	L'allele T è associato al rischio di esacerbazioni dell'asma	17611496; 18395550
<b>Leucemia linfoblastica acuta (ALL)</b>						
TPMT	PA356	SNP (rs1800462)	NM_000367.2: c.238G>C	regione codificante (Ala80Pro)	Gli alleli TPMT*2, TPMT*3A e TPMT*3C hanno bassa o intermedia attività enzimatica con conseguente alto rischio di grave tossicità ematopoietica dopo trattamento con tiopurine	1973780; 9103127; 16491071
		SNP (rs1800460)	NM_000367.2: c.460G>A	regione codificante (Ala154Thr)		
		SNP (rs1142345)	NM_000367.2: c.719A>G	regione codificante (Tyr240Cys)		
GSTT1	PA183	GSTT1*0	–	Deletion	Perdita di attività enzimatica	9298582
GSTM1	PA182	GSTM1*0	–	Deletion	Perdita di attività enzimatica	9298582; 9057653
GSTP1	PA29028	SNP (rs1695)	NM_000852.3: c.313A>G	regione codificante (Ile105Val)	L'allele Ile determina elevata clearance degli etoposidi negli Afro-Americani trattati con steroidi	15862746; 12969965
MTHFR	PA245	SNP (rs1801133)	NM_005957.3: c.665C>T	regione codificante (Ala222Val)	L'allele Val è una variante a ridotta funzione (30%), associata ad aumentata epatotossicità in seguito a trattamento con MTX	7647779; 10536004; 11418485; 11274424
		SNP (rs1801131)	NM_005957.3: c.1286A>C	regione codificante (Glu429Ala)	L'allele Ala è una variante a ridotta attività, che tuttavia non altera gli effetti del MTX	
GGH	PA432	SNP (rs115450789)	NM_003878.1: c.452C>T	regione codificante (Thr151Ile)	L'allele Ile si associa ad una ridotta attività catalitica (67%)	16491071
<b>Deficit dell'ormone della crescita (GHD)</b>						
GHR	PA28674	GHRf1 (NM_000163)	–	isoforma <i>full lenght</i>	All'isoforma GHRd3 è associata una velocità di crescita maggiore nel primo anno di terapia sostitutiva con hGH	10764769; 15208626; 16291702
		GHRd3 (AF210633)	–	isoforma deleta dell'esone 3		

SNP, polimorfismo di singolo nucleotide; DIP, polimorfismo di delezione/inserzioni; VNTR, variazione del numero di copie in tandem

MPH, metilfenidato; MTX, metotrexato; hGH, GH ricombinante umano

\* Numero identificativo del *database Human Genetic Variation Society*§ Numero identificativo del *database Pubmed*

### Deficit dell'ormone della crescita (GHD)

La terapia sostitutiva con l'ormone della crescita (GH) è la terapia standard per i bambini con bassa statura da deficit di GH (GHD). Il trattamento usuale è effettuato con dose fissa di GH ricombinante umano (hGH), normalizzata per peso o superficie corporea (Jorge et al., 2006). Nell'uomo, le due isoforme più comuni di recettore del GH (GHR) sono generate dalla ritenzione (GHRfl) o dalla delezione dell'esone 3 (GHRd3). Queste isoforme sono ampiamente distribuite nell'uomo, con una frequenza del 68-75% per la forma GHRfl e 25-32% per GHRd3 (Pantel et al., 2000). Nel 2004, uno studio condotto su due gruppi di 76 e 96 bambini di origine europea, con bassa statura idiopatica o nati piccoli per l'età gestazionale, ha dimostrato che pazienti con almeno un allele GHRd3 presentano un incremento della crescita, indotta da hGH, di 1.7-2 volte in più rispetto a pazienti omozigoti per l'isoforma GHRfl (Dos Santos et al., 2004). Queste osservazioni sono state confermate in alcuni ma non in tutti gli studi, quindi non è chiaro al momento se l'isoforma GHRd3 di fatto comporti una maggiore risposta al GH. È stato anche dimostrato un migliore *outcome* nei pazienti portatori dell'allele GHRd3 nel trattamento a lungo termine con hGH; questo rappresenta un buon esempio nell'ambito degli studi di PGt, dal momento che pochi sono i dati in letteratura su effetti di varianti genetiche nei trattamenti a lungo termine.

### Leucemia linfoblastica acuta (ALL)

La medicina personalizzata è un campo particolarmente *appealing* per gli oncologi a causa della gravità degli eventi avversi o del rischio di mortalità associato alla non-risposta ai chemioterapici. Gli agenti antitumorali dovrebbero essere somministrati a dosi ottimali per aver la maggior possibilità di cura; tuttavia, spesso sono somministrati a dosi prossime ai livelli di tossicità e mostrano ampia variabilità di biodisponibilità e di effetti tra i pazienti. Il cancro è la principale causa di morte per malattia nei bambini tra 1 e 15 anni (Cheok, 2006). L'ALL rappresenta circa il 25% di tutti i tumori pediatrici. Nonostante i significativi progressi nel trattamento, il tasso di sopravvivenza, libera da eventi, a lungo termine è attualmente l'80%, con il 20% dei pazienti non rispondente alla terapia standard. Uno degli esempi più studiati nella PGt della ALL è quello dei polimorfismi della tiopurina metiltransferasi (TPMT) associati a tossicità della mercaptopurina. Anche se ben 23 varianti alleliche sono state identificate nel gene *TPMT* (Ujii et al., 2008), 3 tra esse rappresentano il 95% di alleli a bassa o intermedia attività enzimatica (Tab. I): pazienti con ridotta attività enzimatica sono a rischio elevato di grave tossicità ematopoietica, se trattati con dosi convenzionali di tiopurine, necessitando di una riduzione della dose di più del 90%; gli eterozigoti, invece, hanno un rischio intermedio e potrebbe essere necessaria una riduzione minore della dose (35-50%) (Cheok et al., 2006). Altri geni coinvolti nella terapia dell'ALL sono quelli codificanti gli enzimi della famiglia glutatione-S-transferasi (GST), i cui polimorfismi sono stati associati ad aumentata tossicità. I polimorfismi degli enzimi GSTM1, GSTT1 e GSTP1, riassunti in Tabella I, spaziano da delezioni geniche, con conseguente perdita di attività enzimatica, a sostituzioni nucleotidiche che ne riducono l'attività. Il metotrexato (MTX) è un altro chemioterapico ampiamente usato nel trattamento dell'ALL, metabolizzato dall'enzima metilentetraidrofolato reductasi (MTHFR). Circa il 10% dei caucasici esibisce una variante genetica dell'MTHFR (Ala222Val), che codifica per una proteina con ridotta attività enzimatica (30%), correlata ad epatotossicità dopo trattamento. Al contrario, la variante Glu429Ala esita in un enzima a ridotta funzione, che tuttavia non sembra avere effetti sulla risposta al MTX (Tab. I).

### Asma

L'asma è la malattia cronica più comune tra i bambini. Nel 2002, il numero di affetti è stato stimato intorno a 30 milioni negli Stati Uniti, tra cui 122/1000 bambini (Mattke et al., 2009). I farmaci agonisti del recettore adrenergico  $\beta_2$  (ADRB2) sono i più utilizzati nel trattamento dell'asma: è stato dimostrato che un comune polimorfismo nella regione codificante del gene *ADRB2* influenza la risposta alla terapia con albuterolo (Tab. I). Bleecker e colleghi hanno recentemente testato l'effetto di questo polimorfismo sulla risposta alla terapia in due studi randomizzati, su 2250 e 405 asmatici, rispettivamente. I risultati hanno mostrato assenza dell'effetto farmacogenetico della variante in pazienti trattati con corticosteroidi e  $\beta_2$ -agonisti (Bleecker et al., 2007). Questo è uno dei pochi esempi di applicazione della PGt negli studi clinici su popolazione infantile, e sottolinea il problema delle piccole dimensioni del campione negli studi di associazione caso-controllo, che porta spesso a risultati falsi positivi o negativi. Le altre due modalità di trattamento dell'asma sono i corticosteroidi e gli antagonisti dei leucotrieni e polimorfismi dei geni (*CRHR1*, *LTC4*, *ALOX5*) coinvolti nella loro regolazione sono stati descritti (Tab. I). Tuttavia, anche in questo campo sono stati riportati risultati contraddittori. Per esempio, il polimorfismo del promotore del gene *LTC4S* (-444 A>C) è stato associato, in alcuni studi, ad un ridotto rischio di riacutizzazioni rispetto a individui omozigoti per l'allele *wild type* (Tab. I), laddove in altri studi questa osservazione non è stata confermata (Kedda et al., 2004).

### Il mondo "omico": genomica, trascrittomic, mlRnomica, proteomica e metabonomica negli studi di farmacogenetica e farmacogenomica

La comprensione della multifattorialità della risposta ai farmaci ha aperto la strada agli studi di genomica, ovvero l'analisi del genoma in termini di struttura, contenuto, funzione ed evoluzione. La disponibilità di tecnologie *high throughput* di analisi del DNA, *SNP-array in primis* e NGS (*next-generation sequencing*) più di recente, ha consentito di sviluppare banche dati pubbliche, quali il progetto HapMap e 1000 Genomes rispettivamente, contenenti informazioni sulle variazioni di sequenza del DNA (Tab. II). La creazione di questi *database* ha fornito a genetisti e clinici un potente ed efficace strumento per identificare varianti del DNA che contribuiscono all'espressione fenotipica e alla variabilità interindividuale. Gli studi di PGx attuali sono stati progettati per identificare varianti genetiche comuni, specialmente SNP, a basso impatto sulla determinazione del fenotipo, pur rappresentando il 30-50% della variabilità interindividuale osservata nella risposta ai farmaci. Una valutazione più approfondita del contributo di varianti genetiche sulla risposta ai farmaci potrebbe essere realizzata utilizzando i dati genotipici più completi forniti dal progetto 1000 Genomi. In particolare, data la dimensione del campione in esame, questi dati potrebbero permettere l'identificazione di alcune varianti rare ma ad alta penetranza, ovvero con effetti fenotipici importanti (Zhang et al., 2010).

La trascrittomic si riferisce allo studio di tutti i trascritti genici, analizzati mediante *microarray* di espressione. Tali studi, basati su approcci di analisi globale, consentono da un lato di valutare geni modulati durante i trattamenti farmacologici, portando così all'identificazione di nuovi bersagli terapeutici, dall'altro possono determinare l'aumento di falsi positivi (cioè, geni poco rilevanti, identificati per caso). La limitazione principale degli studi *microarray* è la disponibilità della fonte appropriata di campione biologico, sangue, escreti o tessuti in cui siano espressi i trascritti pertinenti, nonché il

**Tabella II.**

Banche dati per l'annotazione di polimorfismi genetici e interazioni farmacologiche.

Database	Contenuti	PMID
HapMap	Progetto internazionale che ha come scopo l'identificazione e la catalogazione dei polimorfismi genetici in diverse popolazioni del globo. Tali informazioni, contenute in un dominio pubblico, sono di supporto per l'identificazione di geni-malattia o coinvolti in risposte individuali ai farmaci. <a href="http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/">http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/</a>	20811451
1000 Genomes	Il primo progetto di sequenziamento dell'intero genoma di un gran numero di individui (1092), nato allo scopo di fornire una risorsa completa sulle variazioni genetiche umane. L'obiettivo principale del progetto è stato quello di identificare varianti genetiche rare (al di sotto dell'1%) in diverse popolazioni. Tale progetto si è avvalso delle recenti tecnologie di NGS cosa vuol dire questa abbreviazione? <a href="http://www.1000genomes.org/home">http://www.1000genomes.org/home</a>	23128226
SNPexp	Rappresenta uno strumento per calcolare e visualizzare la correlazione tra i genotipi di polimorfismi, annotati in HapMap, e i livelli di espressione genica associati ad essi, annotati nel database GENEVAR. <a href="http://app3.titan.uio.no/biotools/tool.php?app=snpexp">http://app3.titan.uio.no/biotools/tool.php?app=snpexp</a>	21167019
PolymiRTS	Si tratta di una banca dati di SNP che cadono in siti di legame di miRNA, predetti o identificati sperimentalmente, andando ad alterare l'espressione del gene miRNA-mediata. <a href="http://compbio.uthsc.edu/miR SNP/">http://compbio.uthsc.edu/miR SNP/</a>	22080514
PharmGKB	Si tratta di una fonte di annotazioni nell'ambito della PGx e PGt, tra cui indicazioni per il dosaggio farmacologico, associazione gene-farmaco e relazioni genotipo-fenotipo. PharmGKB raccoglie, cura e diffonde la conoscenza circa l'impatto della variabilità genetica umana sulla risposta ai farmaci. <a href="http://www.pharmgkb.org/">http://www.pharmgkb.org/</a>	11908751
PACdb	Database di farmacogenomica cellulare, che rende disponibili le relazioni tra SNP, espressione genica e sensibilità cellulare a diversi farmaci in modelli cellulari, per aiutare a determinare le varianti genetiche associate alla risposta ai farmaci. <a href="http://www.pacdb.org/">http://www.pacdb.org/</a>	20216476
DTome	Si tratta di un network finalizzato allo studio della relazione tra farmaci, interazioni avverse, bersagli farmacologici, proteine e geni che interagiscono con i target farmacologici. <a href="http://bioinfo.mc.vanderbilt.edu/DTome/">http://bioinfo.mc.vanderbilt.edu/DTome/</a>	22901092

Aggiungere qui le abbreviazioni come nella tabella 1 (ad es. SNP)

limite etico connesso allo studio su tessuti di individui sani.

L'analisi del trascrittoma è complementare alla genomica, portando all'identificazione di SNP che modulano l'espressione di geni correlati alla risposta farmacologica. Questa idea ha portato alla costruzione di banche dati pubbliche, come SNPexp, che correla i dati dei polimorfismi genetici annotati in HapMap con l'espressione genica relativa (Tab II).

Lo studio dei profili di espressione dell'intero spettro di microRNA in un dato genoma è definito miRNoma. I microRNA (miRNA) sono piccoli RNA non codificanti, evolutivamente ben conservati, definiti "micro-managers dell'espressione genica"; esplicano la loro funzione di inibitori della traduzione proteica e di destabilizzazione degli RNA messaggeri (mRNA), legandosi alla 3'-UTR dei loro mRNA bersaglio (Selbach et al., 2008).

La PGx dei miRNA rappresenta un nuovo e promettente campo di ricerca scientifica per lo sviluppo della medicina personalizzata ed è definita come lo studio di polimorfismi che interferiscono con la funzione dei miRNA con conseguente perdita di regolazione di geni target farmacologici, conferendo resistenza ai trattamenti terapeutici (Mishra et al., 2009). La PGx dei miRNA ha forti implicazioni cliniche, soprattutto nell'ambito dei tumori, poiché i miRNA sono differenzialmente espressi nelle cellule maligne e regolano l'espressione di molte proteine importanti per la funzione cellulare. L'interesse crescente per questo ambito di ricerca ha portato allo sviluppo di banche dati come PolymiRTS, un database di SNP che alterano putativi siti di legame miRNA-mRNA (Tab II).

La proteomica, ovvero lo studio di tutte le proteine codificate dal genoma, ha avuto successo in diversi settori della ricerca di base.

Sebbene sia stata stimata una media di circa 3 proteine umane per ciascun gene (Xing et al., 2004), il numero reale sembra essere molto più elevato. La proteomica, come la trascrittomica, presenta gli stessi limiti di disponibilità di campione da analizzare. Da questo punto di vista, diversa è la situazione delle analisi condotte sul metabonoma. La metabonamica si riferisce allo studio del profilo dei metaboliti (Plumb et al., 2002). Il metabonoma rappresenta un sistema integrato di risposta, in tempo reale, a tutti gli stimoli endogeni ed esogeni e potrebbe fornire un mezzo estremamente sensibile per seguire il fenotipo di un singolo paziente in funzione dell'età, stato nutrizionale, corso della malattia o terapia, in particolare nei bambini, poiché la capacità di risposta ai farmaci può essere diversa a seconda dell'età. Questa tecnica offre grandi promesse nella terapia farmacologica personalizzata. La metabonamica potrebbe essere considerata analoga ad un'analisi del "profilo epatico" in patologia clinica, fatta eccezione per la maggiore sensibilità che la caratterizza, avendo la capacità di misurare metaboliti presenti a concentrazioni molto basse.

## Conclusioni

Farmacogenetica e farmacogenomica rappresentano ambiti di studio promettenti per la terapia farmacologica individualizzata. La loro traslazione nella pratica clinica è piuttosto lenta, sia per le malattie dell'età adulta che per quelle infantili. Gli studi di PGt e PGx mostrano spesso risultati contraddittori, che riflettono metodi di ricerca incoerenti, campioni di piccole dimensioni, assenza di studi-replica e di misure standardizzate dei risultati o scarsa considerazione di

potenziali covariate come la co-morbilità. La creazione di *database* pubblici (Tab II) potrebbe portare all'identificazione di nuovi geni nonché di determinanti poligenici della risposta ai farmaci. L'applicazione di approcci di PGt e PGx per il trattamento di malattie pediatriche richiede un'attenta valutazione dei cambiamenti dinamici dell'espressione genica che accompagnano le fasi di crescita. Se da un lato la PGt può essere considerata simile negli adulti e nei bambini, dall'altro la definizione di "farmacogenomica" come studio di interazioni tra geni che contribuiscono a determinare la risposta ai farmaci è particolarmente interessante nel contesto pediatrico, poiché questa definizione coglie l'essenza dei processi evolutivi che caratterizzano lo sviluppo, della nascita fino alla età adulta. I pro-

gressi in questo campo sono, tuttavia, piuttosto lenti dal momento che gli studi clinici nella popolazione pediatrica sono complicati dalla disponibilità di un numero limitato di pazienti, da restrizioni sul volume del campione biologico da prelevare, nonché da problemi etici connessi con il consenso allo studio. La mancanza di dati nei bambini, congiuntamente alle ben note differenze nella farmacocinetica e nella farmacodinamica rispetto agli adulti, rende la scelta di adeguati regimi di dosaggio alquanto empirica.

L'ambizione per il futuro è che le innovazioni apportate nel campo della PGt e della PGx possano essere traslate nella pratica clinica mediante la realizzazione di *trials* clinici randomizzati controllati.

## Box di orientamento

### Che cosa si sapeva prima

La risposta ai trattamenti farmacologici, misurata in termini di efficacia della terapia o dell'insorgenza di eventi avversi, risulta variabile da un individuo all'altro.

La risposta al trattamento farmacologico è condizionata, in maniera analoga a tutti i fenotipi complessi, da una serie di aspetti, quali ambiente, dieta, età, sesso, stile di vita, stato socio-economico. Oltre ai fattori non-genetici, essa risente dell'influenza di molti geni "predisponenti": è in tal senso un tratto multifattoriale.

L'attività di diversi enzimi metabolizzatori varia durante lo sviluppo e ciò spiega le differenze farmacocinetiche e -dinamiche tra adulti e bambini.

### Cosa sappiamo adesso

Un numero sempre crescente di studi di farmacogenetica e farmacogenomica ha correlato la variabilità della risposta farmacologica a polimorfismi genetici in geni coinvolti nel metabolismo dei farmaci.

Tuttavia, tali studi mostrano spesso risultati contraddittori, sottolineando ancora l'inadeguatezza di talune ricerche in questo settore.

La maggior parte degli studi di PGt e PGx è condotta su popolazioni adulte. Di contro, poca attenzione è stata riservata alla popolazione pediatrica.

### Quali ricadute sulla pratica clinica

La conoscenza approfondita del background genetico di un individuo potrebbe essere la chiave per la realizzazione della medicina personalizzata, che mira a massimizzare l'efficacia di un farmaco riducendone al minimo gli eventi avversi.

Sono ancora pochi gli studi di PGt che hanno una ricaduta nella pratica clinica; l'ambizione per il futuro è che le innovazioni apportate in questo ambito vengano traslate nella pratica mediante la realizzazione di *trials* clinici randomizzati controllati.

## Bibliografia

Bleecker ER, Postma DS, Lawrance RM, et al. *Effect of ADRB2 polymorphisms on response to longacting  $\beta$ 2-agonist therapy: a pharmacogenetic analysis of two randomised studies.* Lancet 2007;370:2118-5.

Cheok MH, Evans WE. *Acute lymphoblastic leukaemia: a model for the pharmacogenomics of cancer therapy.* Nat Rev Cancer 2006;6:117-29.

Contini V, Rovaris DL, Victor MM, et al. *Pharmacogenetics of response to methylphenidate in adult patients with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD): A systematic review.* Eur Neuropsychopharmacol 2012.

\* In questo lavoro è descritta la revisione sistematica della letteratura sul ruolo dei polimorfismi genetici e la risposta al MPH in pazienti ADHD. Si tratta di uno studio importante perché sottolinea la contraddittorietà che caratterizza spesso gli studi di PGt.

Dos Santos C, Essioux L, Teinturier C, et al. *A common polymorphism of the growth hormone receptor is associated with increased responsiveness to growth hormone.* Nat Genet 2004;36:720-4.

Jorge AA, Marchisotti FG, Montenegro LR, et al. *Growth Hormone (GH) Pharmacogenetics: Influence of GH Receptor Exon 3 Retention or Deletion on First-Year Growth Response and Final Height in Patients with Severe GH Deficiency.* J Clin Endocrinol Metab 2006;91:1076-80.

\*\* Questo studio è uno dei pochi esempi su effetti a lungo termine di trattamenti farmacologici in relazione a polimorfismi genetici.

Katz DA, Murray B, Bhatena A, et al. *Defining drug disposition determinants: a pharmacogenetic-pharmacokinetic strategy.* Nat Rev Drug Discov 2008;7:293-305.

Kawade N, Onishi S. *The prenatal and postnatal development of UDP-glucuronyltransferase activity towards bilirubin and the effect of premature birth on this activity in the human liver.* Biochem J 1981;196:257-60

Kedda MA, Shi J, Duffy D, et al. *Characterization of two polymorphisms in the leukotriene C4 synthase gene in an Australian population of subjects with mild, moderate, and severe asthma.* J Allergy Clin Immunol 2004;113:889-95.

Kirchheiner J, Fuhr U, Brockmüller J. *Pharmacogenetics-based therapeutic recommendations--ready for clinical practice?* Nat Rev Drug Discov 2005;4:639-47.

Kirley A, Lowe N, Hawi A, et al. *Association of the 480bp DAT1 allele with methylphenidate response in a sample of Irish children with ADHD.* Am J Med Genet 2003;121B:50-4.

Koren G, Cairns J, Chitayat D, et al. *Pharmacogenetics of morphine poisoning in a breastfed neonate of codeine-prescribed mother.* Lancet 2006;368:704.

\*\* Questo *case report* è uno degli esempi di reazione avversa ai farmaci letale dovuta ad un polimorfismo, molto frequente in alcune popolazioni, dell'enzima metabolizzatore CYP2D6.

Krekels EH, van den Anker JN, Baiardi P, et al. *Pharmacogenetics and paediatric drug development: issues and consequences to labelling and dosing recommendations.* Expert Opin Pharmacother 2007;8:1787-99.

\* Questa *review* illustra, in maniera esaustiva, i metodi di indagine farmacogenetica, i suoi limiti e i suoi vantaggi, ponendo l'accento sullo sviluppo di farmaci in ambito pediatrico.

Lacroix D, Sonnier M, Moncion A, et al. *Expression of CYP3A in the human liver--evidence that the shift between CYP3A7 and CYP3A4 occurs immediately after birth.* Eur J Biochem 1997;247:625-34.

\*\* In questo studio è delucidato il concetto di espressione/attività enzimatica differenziale durante l'ontogenesi.

Langley K, Turic D, Peirce TR, et al. *No support for association between the dopamine transporter (DAT 1) gene and ADHD.* Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 2005;139:7-10.

Leeder JS. *Developmental and pediatric pharmacogenomics.* Pharmacogenomics 2003;4:331-41.

- Mattke S, Martorell F, Sharma P, et al. *Quality of care for childhood asthma: estimating impact and implications*. Pediatrics 2009;123:S199-204.
- Mishra PJ, Bertino JR. *MicroRNA polymorphisms: the future of pharmacogenomics, molecular epidemiology and individualized medicine*. Pharmacogenomics 2009;10:399-416.
- Pantel J, Machinis K, Sobrier ML, et al. *Species-specific alternative splice mimicry at the growth hormone receptor locus revealed by the lineage of retroelements during primate evolution*. J Biol Chem 2000;275:18664-9.
- Plumb RS, Stumpf CL, Gorenstein MV, et al. *Metabonomics: the use of electrospray mass spectrometry coupled to reversed-phase liquid chromatography shows potential for the screening of rat urine in drug development*. Rapid Commun Mass Spectrom 2002;16:1991-6.
- Roman T, Szobot C, Martins S, et al. *Dopamine transporter gene and response to methylphenidate in attention-deficit/hyperactivity disorder*. Pharmacogenetics 2002;12:497-9.
- Teh LK, Bertilsson L. *Pharmacogenomics of CYP2D6: molecular genetics, interethnic differences and clinical importance*. Drug Metab Pharmacokinet 2012;27:55-67.
- Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, et al. *Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs*. Nature 2008;455:58-63.
- Spencer T, Biederman J, Wilens T, et al. *Pharmacotherapy of attention-deficit/hyperactivity disorder across the lifespan*. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry 1996;35:409-28.
- Stanulla M, Schaeffeler E, Flohr T, et al. *Thiopurine methyltransferase (TPMT) genotype and early treatment response to mercaptopurine in childhood acute lymphoblastic leukemia*. JAMA 2005;293:1485-9.
- Stephenson T. *How children's response to drugs differ from adults*. Br J Clin Pharmacol 2005;59:670-3.
- Swen JJ, Nijenhuis M, de Boer A, et al. *Pharmacogenetics: from bench to byte--an update of guidelines*. Clin Pharmacol Ther 2011;89:662-73.
- Ujiiie S, Sasaki T, Mizugaki M, et al. *Functional characterization of 23 allelic variants of thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT\*2 - \*24)*. Pharmacogenet Genomics 2008;18:887-93.
- Xing Y, Resch R, Lee C. *The multi-assembly problem: reconstructing multiple transcript isoforms from EST fragment mixtures*. Genome Res 2004;14:426-41.
- Zhang W, Dolan ME. *Impact of the 1000 genomes project on the next wave of pharmacogenomic discovery*. Pharmacogenomics 2010;11:249-56.

## Corrispondenza

Achille Iolascon, CEINGE - Biotecnologie Avanzate, via Gaetano Salvatore 486, 80145 Napoli. Tel. +39 081 3737898. Fax +39 081 3737804. Email: achille.iolascon@unina.it