

LAVORO ORIGINALE

I polimorfismi della metilentetraidrofollato reduttasi (MTHFR) nel trattamento con methotrexate di pazienti con artrite reumatoide.

Revisione della letteratura ed esperienza personale*

Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms in methotrexate treatment of rheumatoid arthritis patients. Review of the literature and personal experience

M. Taraborelli¹, L. Andreoli¹, S. Archetti², M. Ferrari², R. Cattaneo¹, A. Tincani¹

¹U.O. Reumatologia e Immunologia Clinica, Spedali Civili e Università degli Studi di Brescia, Brescia, Italia;

²Dipartimento Diagnostica dei Laboratori, 3° Servizio Analisi Chimico-Cliniche, Biotecnologie, Spedali Civili di Brescia, Brescia, Italia

SUMMARY

Methotrexate is still a mainstay of rheumatoid arthritis treatment, but a significant variability in drug response is observed among patients. It has been proposed that C677T and A1298C polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), an enzyme involved in the folate pathway, could be related to its efficacy and toxicity. Many studies have investigated the predictive value of such polymorphisms for Methotrexate outcome, though with discordant results. Our experience on 79 patients did not find any significant association between genotype and drug response and the review of the literature did not provide sufficient evidences to support the use of MTHFR genetic screening in clinical practice.

Reumatismo, 2009; 61(2):98-106

INTRODUZIONE

Per il trattamento dell'artrite reumatoide (AR) sono disponibili numerose molecole e oggi particolare attenzione è rivolta ai nuovi farmaci biologici. Ciononostante il methotrexate (MTX), sintetizzato sessanta anni fa e introdotto nel trattamento dell'AR negli anni '80, resta in gran parte dei pazienti un pilastro della terapia, associato o meno alle altre molecole.

Le ragioni per cui l'MTX è il farmaco di fondo (DMARD) più comunemente usato sono molteplici. In primo luogo è in grado di ridurre l'attività di malattia e di rallentare la progressione del danno osseo (1). In confronto agli altri DMARDs ha un'efficacia superiore, un'insorgenza d'azione relativamente rapida (1-2 mesi) (2) e la più lunga sopravvivenza in terapia (3). Infine il suo costo è contenuto e l'esperienza con il suo utilizzo è significativa. Tuttavia esiste una considerevole variazione interindividuale nella risposta al farmaco e in modo analogo nella sua tossicità. Quest'ultima inoltre rappresenta spesso un fattore limitante il trattamento (4). È stato calcolato che solo il 50% dei pazienti ottiene una buona risposta clinica e fino al 30% dei soggetti sospende la terapia a causa degli effetti collaterali (5, 6). Anche i dosaggi di MTX richiesti sono molto variabili tra paziente e paziente.

*Lavoro premiato al XLV Congresso SIR, Venezia 2008.

Indirizzo per la corrispondenza:

Prof.ssa Angela Tincani
Reumatologia e Immunologia Clinica
Spedali Civili, piazzale Spedali Civili, 1
25123 Brescia
E-mail: tincani@brescia.reumatologia.it

Se dunque è di fondamentale importanza iniziare una terapia adeguata il più precocemente possibile per evitare la progressione del danno e il declino funzionale (7), d'altro canto stabilire quale sia il trattamento individuale più adeguato risulta problematico a causa della difficoltà di predire accuratamente l'esito della cura.

In questo contesto gli studi di farmacogenetica possono rappresentare uno strumento utile per identificare gli elementi predittivi di risposta e tossicità (8).

Questa disciplina studia le basi genetiche della variabilità di risposta ai farmaci, indagando i polimorfismi genetici, minime variazioni della sequenza del DNA particolarmente frequenti nella popolazione (frequenza allelica $\geq 1\%$). Tra questi particolare importanza hanno i polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) dovuti alla sostituzione di una singola base azotata.

Stabilire il dosaggio in base al genotipo del paziente, cioè determinando l'eventuale presenza di SNPs prima di iniziare il trattamento, è più vantaggioso rispetto a un approccio convenzionale in termini di costo-beneficio sia per il singolo paziente, che avrà una maggiore probabilità di controllare la malattia e un minor rischio di sviluppare effetti collaterali, sia per il sistema sanitario, che dovrà sostenere una minore spesa per il controllo dell'AR e della sua evoluzione (9).

L'MTX, un analogo dell'acido folico, deve la sua azione (2) alla capacità di inibire il metabolismo dei folati, necessari ai processi di sintesi degli acidi nucleici e dunque alla proliferazione cellulare. In particolare il farmaco (Fig. 1) inibisce un enzima, la diidrofolato reduttasi (DHFR), necessario alla sintesi

del tetraidrofolato (THF), la forma biologicamente attiva dell'acido folico, che funziona come trasportatore di frammenti carboniosi nella sintesi delle purine, delle pirimidine e della metionina. Il THF, arricchitosi di un gruppo metilenico, può agire come substrato della timidilato sintetasi per la sintesi delle pirimidine oppure può essere ridotto dalla metilentetraidrofolato reduttasi (MTHFR) e partecipare alla metilazione dell'omocisteina a metionina. Oltre a questo noto meccanismo d'azione, ne è stato individuato uno, mediato da composti derivati dalla poligluttammazione dell'MTX, che giustifica l'effetto immunosoppressivo (oltre che antiproliferativo) della molecola. I composti poligluttammati inibiscono infatti altri enzimi, tra cui l'amino-imidazolo-carbossamide-ribonucleotide-trasformilasi: questo comporta un'iperproduzione di adenosina, una molecola dotata di un potente effetto anti-infiammatorio e immunosoppressivo su varie linee cellulari.

Numerosi geni e rispettivi SNPs sono stati indagati nel tentativo di identificare possibili fattori genetici predittivi della risposta all'MTX. L'MTHFR è stato oggetto di particolare interesse a partire dal 2001, quando uno studio prospettico condotto da Van Ede et al. (10) su 236 soggetti olandesi affetti da AR ha mostrato una correlazione significativa tra la presenza, sia in omozigosi che in eterozigosi, dell'SNP C677T (sostituzione di una citosina in timina al nucleotide in posizione 1298) (11) e la sospensione del trattamento con MTX per tossicità epatica.

In realtà numerosi SNPs sono stati descritti a carico del gene dell'MTHFR, tuttavia solo il C677T e l'A1298C (sostituzione di un'adenina in citosina al nucleotide in posizione 1298) (12) sono relativa-

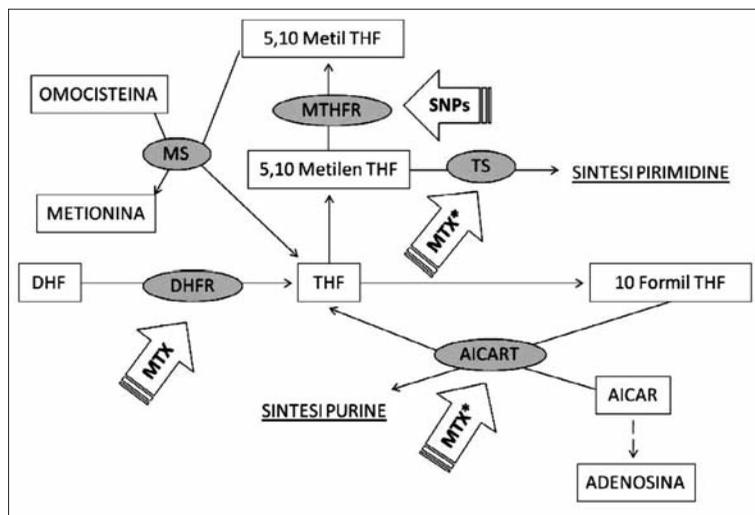


Figura 1 - Metabolismo dei folati: meccanismo d'azione del methotrexate (MTX) e dei suoi derivati poligluttammati (MTX*); effetto dei polimorfismi (SNPs) dell'MTHFR. DHF: diidrofolato, DHFR: diidrofolato reduttasi, THF: tetraidrofolato, AICAR: amino-imidazolo-carbossamide-ribonucleotide, AICART: amino-imidazolo-carbossamide-ribonucleotide trasformilasi, MTHFR: metilentetraidrofolato reduttasi, MS: metionina sintetasi, TS: timidilato sintetasi.

mente comuni e in grado di ridurre l'attività dell'enzima. Questa abilità è più marcata per il primo polimorfismo, che è capace autonomamente di aumentare i livelli plasmatici di omocisteina e di ridurre quelli di folati. Al contrario il secondo polimorfismo riduce in maniera più blanda l'attività dell'MTHFR e riesce a modificare i livelli di omocisteina e folati solo se associato al precedente. A livello biochimico una riduzione di efficacia dell'MTHFR sembrerebbe suggerire un potenziamento del blocco indotto sul metabolismo dei folati dall'MTX tramite inibizione della DHFR. Pertanto a livello teorico è ipotizzabile che in presenza di SNPs a carico dell'MTHFR si possa avere come conseguenza una maggiore efficacia o tossicità del farmaco.

Alla luce delle osservazioni di Van Ede et al. (10) diversi gruppi scientifici hanno cercato di approfondire la questione, ricercando associazioni tra questi due SNPs e la risposta, oltre che la tossicità, all'MTX.

Scopo di questo lavoro è quello di presentare la nostra esperienza e di fornire una rassegna, finora mai eseguita, di tutti i lavori che hanno indagato il ruolo dei polimorfismi C677T e A1298C dell'MTHFR nel predire la risposta all'MTX nei pazienti con AR.

Obiettivo finale è quello di stabilire se vi siano evidenze sufficienti a supportare l'utilizzo nella pratica clinica dello screening genetico dell'MTHFR nella fase di pianificazione del trattamento.

LA NOSTRA ESPERIENZA

Al fine di indagare la correlazione tra un particolare genotipo e l'effetto dell'MTX abbiamo valutato retrospettivamente le cartelle cliniche di 79 pazienti con AR afferenti al nostro centro, tutti originari del Nord Italia, che avessero assunto l'MTX. In tutti i casi la diagnosi è stata posta secondo i criteri del 1987 dell'American College of Rheumatology (13). I pazienti, di cui 64 femmine, con un'età media di 51 anni e una mediana del tempo intercorso tra la diagnosi di malattia e il momento di inizio dell'MTX di 1 mese (0-156 mesi), erano nel 68% dei casi affetti da una forma di AR sieropositiva e presentavano all'inizio della terapia una malattia attiva (media \pm DS: DAS44=3,44 \pm 0,77 e SDAI=32,27 \pm 10,4).

I pazienti erano stati trattati con un dosaggio di MTX tra 7,5 e 20 mg a settimana e nella maggior parte dei casi (91%) avevano assunto supplementi

di acido folico a un dosaggio settimanale equivalente a quello di MTX. I pazienti che avevano raggiunto almeno una risposta ACR20 (14) in sei mesi consecutivi di trattamento con MTX e che l'avevano mantenuta nei 6 mesi successivi sono stati definiti responsivi (R); coloro che non avevano risposto all'MTX in sei mesi consecutivi e nei quali a causa dell'inefficacia del farmaco era stato necessario cambiare la terapia di fondo sono stati classificati come non responsivi (NR). I pazienti che avevano ben tollerato il trattamento sono stati inclusi nel gruppo senza tossicità (NT), quelli che avevano sviluppato effetti collaterali attribuibili all'MTX (compatibili con quelli descritti in letteratura, comparsi dopo un tempo adeguato, migliorati o regrediti con la riduzione o la sospensione del farmaco, ricomparsi con la reintroduzione dello stesso) e tali da richiedere una modifica della terapia sono stati inseriti nel gruppo con tossicità (T). Ogni paziente per essere incluso nell'analisi ha dovuto soddisfare i criteri necessari all'inserimento in almeno uno dei quattro gruppi (R, NR, T, NT).

Per questo studio, è stata richiesta ed ottenuta l'approvazione da parte del comitato etico degli Spedali Civili di Brescia; inoltre per l'ingresso nello studio ciascun paziente ha sottoscritto un consenso informato, nel quale particolare attenzione è stata rivolta al trattamento del materiale genetico.

Durante una visita ambulatoriale routinaria, i pazienti sono stati sottoposti a un prelievo di sangue venoso periferico (2,5 ml in EDTA), che è stato conservato a -20°C fino al momento della estrazione del DNA. La genotipizzazione per gli SNPs C677T e l'A1298C è stata eseguita su DNA estratto mediante High pure PCR template preparation Kit (Roche) tramite PCR real time (Light Cycler, Roche).

La distribuzione dei genotipi nei quattro diversi gruppi è stata confrontata mediante test del Chi quadrato. È stato considerato significativo un valore di p inferiore a 0.05.

La distribuzione dei genotipi nell'intero campione è risultata per l'MTHFR 677: CC (wild-type) 20,25%, CT (variante mutata eterozigote) 55,70%, TT (variante mutata omozigote) 24,05%; per l'MTHFR 1298: AA (wild-type) 55,70%, AC (variante mutata eterozigote) 37,97%, CC (variante mutata omozigote) 6,33%.

L'esame della distribuzione dei genotipi tra pazienti R-NR e T-NT non ha mostrato differenze statisticamente significative (Tab. I e II). In conclusione non abbiamo trovato alcuna associazione tra genotipo 677 e 1298 dell'MTHFR e risposta all'MTX.

Tabella I - Correlazione tra genotipi 677 e 1298 dell'MTHFR e risposta all'MTX.

Gruppo	MTHFR 677			MTHFR 1298		
	CC	CT	TT	AA	AC	CC
Responsivi (n=37)	7 (18,9 %)	19 (51,4 %)	11 (29,7%)	21 (56,8 %)	14 (37,8 %)	2 (5,4 %)
Non responsivi (n=32)	6 (18,7 %)	19 (59,4 %)	7 (21,9 %)	16 (50,0 %)	14 (43,7 %)	2 (6,3 %)
P (chi quadrato)	NS	NS	NS	NS	NS	NS

CC/AA = genotipo wild-type, CT/AC = variante mutata eterozigote, TT/CC = variante mutata omozigote, NS = non significativo (p>0,05).

Tabella II - Correlazione tra genotipi 677 e 1298 dell'MTHFR e tossicità dell'MTX.

Gruppo	MTHFR 677			MTHFR 1298		
	CC	CT	TT	AA	AC	CC
Con tossicità (n=21)	6 (28,6%)	10 (47,6%)	5 (23,8%)	14 (66,7%)	5 (23,8%)	2 (9,5%)
Senza tossicità (n=58)	10 (17,2%)	34 (58,6%)	14 (24,2%)	30 (51,7%)	25 (43,1%)	3 (5,2%)
P (chi quadrato)	NS	NS	NS	NS	NS	NS

CC/AA = genotipo wild-type, CT/AC = variante mutata eterozigote, TT/CC = variante mutata omozigote, NS = non significativo (p>0,05).

LA LETTERATURA

In questi anni in ambito internazionale sono stati condotti vari studi (4, 8-10, 15-25) sulla farmacogenetica dell'MTHFR nel trattamento con MTX

dei pazienti con AR (Tab. III). I risultati di tali indagini sono eterogenei e mancano forti evidenze di un'associazione univoca tra un genotipo e la risposta al farmaco.

Nelle righe che seguono prendiamo in considera-

Tabella III - Lavori disponibili in letteratura sui polimorfismi 677 e 1298 dell'MTHFR nel trattamento con MTX nell'AR.

Autori	N. pazienti*	Origine	Tipo studio	677 MTHFR			1298 MTHFR		
				CC	CT	TT	AA	AC	CC
Taraborelli et al.	79	italiana (caucasica)	R	N	N	N	N	N	N
Bohanec Grabar et al. (15)	213	slovena (caucasica)	R	N	N	N	+ T	+ T	- T
Ranganathan et al. (16)	218	64 afroamericana, 154 caucasica	R	N	+ Tc §	N	N	N	N
Ghodke et al. (17)	34	indiana (asiatica)	R	N	N	N	N	N	N
Taniguchi et al. (18)	159	giapponese (asiatica)	R	- T	+ T/Te	+ T/Te	- E	+ E	+ E
Kurzwaski et al. (4)	174	polacca (caucasica)	R	- E	+ E	+ E	- E	+ E	+ E
Dervieux et al. (19)	48	statunitense (non specificata)	P	+ E	+ E	- E	- T	+ T	+ T
Wessels et al. (8)	205	eterogenea	P	+ E	- E	- E	+ E/-T	- E/+T	- E/+T
Kim et al. (9)	385	coreana (asiatica)	R	- T	+ T	+ T	0	0	0
Aggarwal et al. (20)	150	indiana (asiatica)	R	N	N	N	0	0	0
Hughes et al. (21)	223	30 afroamericana, 193 caucasica	R	N	N	N	+ T	+ T	- T
Weisman et al. (22)	214	statunitense (non specificata)	R	N	N	+ Tn	0	0	0
Berkun et al. (23)	93	israeliana (caucasica)	R	N	N	N	+ T	- T	- T
Kumagai et al. (24)	115	giapponese (asiatica)	R	N	N	N	N	N	N
Urano et al. (25)	106	giapponese (asiatica)	R	- T	+ T	+ T	- E	+ E	- E
Van Ede et al. (10)	236	olandese (caucasica)	P	- Te	+ Te	+ Te	0	0	0

*Soggetti inclusi nella valutazione della correlazione genotipo-risposta all'MTX; §solo negli afroamericani; R = retrospettivo, P = prospettico, CC/AA = genotipo wild-type, CT/AC = variante mutata eterozigote, TT/CC = variante mutata omozigote, + = maggiore, - = minore, T = tossicità (Te = epatica, Tn = neurologica, Tc = cutanea), E = efficacia, N = nessuna associazione, 0 = non valutato.

zione tutti i lavori disponibili sull'MTHFR nel trattamento con MTX dell'AR e la nostra esperienza. Per quanto riguarda il polimorfismo C667T un'associazione con l'efficacia è stata osservata in 3 studi e negata da 13; un'associazione con la tossicità è sostenuta da 6 studi e non è stata riscontrata nei restanti 10. Per il polimorfismo A1298C solo 4 lavori hanno riconosciuto una correlazione tra genotipo ed efficacia del trattamento, mentre 8 hanno escluso tale possibilità. Infine in 5 studi è stata osservata un'associazione tra genotipo 1298 e tossicità dell'MTX a fronte dei restanti 7 che non hanno trovato alcuna correlazione.

In definitiva solo una minoranza degli studi finora condotti sosterrrebbe l'esistenza di un'influenza del genotipo dell'MTHFR sulla risposta al trattamento. Se inoltre si considerano solamente gli studi nei quali questa è stata osservata, notiamo che i genotipi che sarebbero dotati di capacità predittiva non sono gli stessi. Neppure considerando i due lavori dotati di impostazione prospettica e di una buona numerosità campionaria (8, 10) si osserva una tendenza comune. Vari elementi possono essere responsabili dell'eterogeneità di conclusioni cui sono giunti i diversi autori.

Un primo dato che emerge dal confronto dei lavori è una disomogeneità nella frequenza dei diversi genotipi all'interno dei campioni indagati. Tale discrepanza è facilmente giustificabile se si considera che gli SNPs presentano frequenze diverse all'interno delle diverse popolazioni e che i pazienti considerati dai vari lavori sono in alcuni casi caucasici, in altri afroamericani, in altri ancora asiatici. In alcuni casi non è possibile valutare la rilevanza epidemiologica dei polimorfismi indagati, poiché i pazienti appartengono a popolazioni etnicamente non definite (per esempio statunitensi) o comunque a popolazioni miste. Tuttavia è di estrema importanza avere una popolazione bersaglio omogenea dal punto di vista etnico al fine di identificare la frequenza e dunque l'utilità di un polimorfismo nella pratica clinica.

Un seconda questione degna di interesse è rappresentata dalla grande diversità di trattamento dei vari pazienti sia all'interno di un singolo studio sia tra studi diversi (Tab. IV).

In primo luogo i dosaggi settimanali di MTX sono alquanto eterogenei e non sempre la valutazione della risposta al farmaco è stata condotta a partire dalla prima somministrazione (in alcuni casi sono

Tabella IV - Trattamento dei pazienti nei vari studi disponibili in letteratura.

<i>Autori</i>	<i>Pregressa MTX assunzione</i>	<i>MTX/ settimana</i>	<i>Altri DMARDS</i>	<i>Corticosteroidi</i>	<i>Pazienti in acido folico</i>	<i>Acido folico/ settimana</i>
Taraborelli et al.	NO	7,5-20 mg	C (a dose stabile)	C (a dose stabile)	91%	7,5-20 mg
Bohanec Grabar et al. (15)	SI	10-12,5 mg	C	C	62%	5 o 10 mg
Ranganathan et al. (16)	NO	7,5-20 mg	C	C	100%	7-21 mg
Ghodke et al. (17)	?	7,5-17,5 mg	?	?	?	?
Taniguchi et al. (18)	NO	2-15 mg	C	C	?	?
Kurzawski et al. (4)	NO	7,5-15 mg	NC	C	100%	5 mg
Dervieux et al. (19)	NO	7,5-20 mg	C	C (a basse dosi)	95,8%	7 mg
Wessels et al. (8)	NO	7,5-25 mg	NC	C	100%	7 mg
Kim et al. (9)	NO	5-20 mg	C	C	100%	7 mg
Aggarwal et al. (20)	NO	9-14 mg	?	C (a dose stabile)	100%	10 mg
Hughes et al. (21)	?	9,1 mg o 19 mg in media	?	?	?	7-27,5 mg
Weisman et al. (22)	?	10-17,5 mg	C	C (a basse dosi)	81%	?
Berkun et al. (23)	NO	11,9 mg in media	C	C	58,8%	5 mg
Kumagai et al. (24)	SI	2-12 mg	C (a dose stabile)	C (a dose stabile)	27%	?
Urano et al. (25)	NO	2,5-12,5 mg	C	C	1%	7,5 mg
Van Ede et al. (10)	NO	7,5-25 mg	NC	C (a dose stabile)	66%	7 mg (o 2,5 mg di acido folinico)

NC = non concesso, C = concesso, ? = non noto.

Tabella V - Criteri di risposta al trattamento con MTX adottati dai vari studi in letteratura.

Autori	Criterio efficacia	Criterio non efficacia
Taraborelli et al.	risposta ACR20 in 6 mesi mantenuta entro 6 mesi successivi	mancanza risposta a MTX entro 6 mesi tale da richiedere sospensione e passaggio ad altro farmaco di fondo
Bohanec Grabar et al. (15)	risposta EULAR buona o moderata in 2 visite consecutive in 3 mesi	risposta EULAR scarsa in 2 visite consecutive in 3 mesi
Ranganathan et al. (16)	0	0
Ghodke et al. (17)	risposta ACR 20 dopo 6 mesi	mancanza risposta ACR20 dopo 6 mesi
Taniguchi et al. (18)	dose MTX dopo 1 anno ≤ 6 mg/week	dose MTX dopo 1 anno > 6 mg/week
Kurzawski et al. (4)	risposta ACR20 dopo 1 anno	mancanza risposta ACR20 dopo 1 anno
Dervieux et al. (19)	risposta EULAR buona o moderata dopo 6 mesi	risposta EULAR scarsa dopo 6 mesi
Wessels et al. (8)	DAS44 ≤ 2.4 dopo 6 mesi	DAS44 > 2.4 dopo 6 mesi
Kim et al. (9)	0	0
Aggarwal et al. (20)	risposta EULAR dopo tempo non definito	mancanza risposta EULAR dopo tempo non definito
Hughes et al. (21)	risposta ACR 20-50-70 e EULAR dopo 12 mesi	mancanza risposta ACR 20-50-70 e EULAR dopo 12 mesi
Weisman et al. (22)	0	0
Berkun et al. (23)	0	0
Kumagai et al. (24)	riduzione PCR $\geq 50\%$ dopo almeno 2 mesi o dose MTX < 6 mg/settimana	riduzione PCR $< 50\%$ dopo almeno 2 mesi o dose MTX ≥ 6 mg/settimana
Urano et al. (25)	buon miglioramento articolazioni dolenti/tumefatte, VES, PCR dopo 3 mesi	scarso miglioramento articolazioni dolenti/tumefatte, VES, PCR dopo 3 mesi
Van Ede et al. (10)	buon miglioramento articolazioni dolenti/tumefatte, VES, VAS dolore, GH, DAS dopo 48 settimane	scarso miglioramento articolazioni dolenti/tumefatte, VES, VAS dolore, GH, DAS dopo 48 settimane

0 = non considerato (lavori che hanno indagato solo correlazione con la tossicità), EULAR = European League against Rheumatism, DAS = Disease Activity Score, ACR = American College of Rheumatology, VES = velocità di eritrosedimentazione, PCR = proteina C reattiva, VAS = scala analogica visiva, GH = stato di salute complessivo.

stati valutati anche pazienti che stavano assumendo MTX da tempo).

Va inoltre considerato che nella maggior parte dei lavori, seppur con le dovute cautele e i necessari aggiustamenti statistici, è stato concesso l'utilizzo concomitante di altri DMARDs e di cortisonici, che ovviamente possono aver partecipato al miglioramento del quadro clinico.

Infine esiste una grossa variabilità nella supplementazione di folati sia in termini di dosaggio che di percentuale di pazienti sottoposti ad integrazione. Questa diversità gioca un ruolo molto delicato, se si considera che l'acido folico, oltre a svolgere una nota protezione nei confronti della tossicità da MTX, potrebbe controbilanciare l'effetto negativo degli SNPs dell'MTHFR come suggerito dagli autori di uno dei lavori (20).

In effetti questa interazione è già stata dimostrata per il polimorfismo C677T sull'enzima di *Escherichia coli* (26).

L'ultimo elemento che può aver influenzato i ri-

sultati delle diverse indagini è certamente la disomogeneità dei criteri sviluppati per definire la risposta o meno al trattamento e i diversi effetti collaterali.

I criteri di efficacia utilizzati (Tab. V), salvo alcune eccezioni, sono quelli condivisi a livello reumatologico internazionale, come la risposta EULAR (27) o ACR20-50-70 (14).

Tuttavia i tempi di osservazione stabiliti sono estremamente variabili tra un lavoro e l'altro (dai 3 ai 12 mesi).

Ancora più complesso è il confronto dei criteri di tossicità: in tabella VI sono riportati quelli relativi alla tossicità epatica, ematologica e polmonare che presentano la maggiore variabilità di definizione. Può essere particolarmente fuorviante ai fini di un'indagine farmacogenetica non definire un criterio oggettivo capace di attribuire la responsabilità dell'evento all'MTX o utilizzare un criterio che possa essere soddisfatto da altre condizioni patologiche o da altri trattamenti farmacologici. Il ri-

Tabella VI - Criteri di tossicità epatica, ematologica e polmonare da MTX adottati dai vari studi in letteratura.

<i>Autori</i>	<i>Tossicità epatica</i>	<i>Tossicità ematologica</i>	<i>Tossicità polmonare</i>
Taraborelli et-al.	ALT>3 ULN in assenza di farmaci epatotossici, HBV-HCV positività, abuso alcol, rialzi precedenti	leucopenia, piastrinopenia o anemia megaloblastica in assenza di altra terapia mielosoppressiva	dispnea (con/senza tosse secca, febbre, malessere, eosinofilia periferica) e nuova interstiziopatia in assenza di eziologia infettiva
Bohanec Grabar et al. (15)	AST o ALT> ULN o riduzione albumina in 2 visite consecutive	pancitopenia, leucopenia, piastrinopenia, anemia megaloblastica o aumento isolato MCV	dispnea, tosse, polmonite
Ranganathan et al. (16)	AST o ALT> ULN	L <3500/mm ³	dispnea, tosse, infiltrati polmonari
Ghodke et al. (17)	rialzo enzimi epatici>2 ULN	?	?
Taniguchi et-al. (18)	ALT> ULN in assenza di patologia epatica preesistente	?	?
Kurzawski et al. (4)	0	0	0
Dervieux et al. (19)	AST>ULN	L <3500/mm ³ , Hb <80 mg/l, MCV >120 fl	dispnea, tosse, infiltrati polmonari in assenza di sintomi a carico delle vie aeree superiori
Wessels et al. (8)	ALT o ALP> ULN (in assenza di abuso di alcol o farmaci) tale da richiedere modifica della terapia	L <3500/mm ³ o piastrine <150000/mm ³ in assenza di ipoplasia midollo osseo	polmonite
Kim et al. (9)	rialzo enzimi epatici > ULN in 2 determinazioni successive in assenza di positività per HBV o HCV o anomalie ecografiche	L <3500/mm ³ in 2 determinazioni successive	nuovi infiltrati polmonari confermati tramite TAC in assenza di infezione polmonare
Aggarwal et al. (20)	?	?	?
Hughes et al. (21)	AST>1.5 ULN o ALP>2 ULN	L <3900/mm ³ , piastrine <75000/mm ³ , riduzione Hb di almeno 1.4 g/dl	dispnea, tosse, polmonite, pleurite, riduzione funzione polmonare
Weisman et al. (22)	AST> ULN	L <3500/mm ³ o Hb <80 mg/l	dispnea, tosse, infiltrati polmonari
Berkun et al. (23)	ALT>2ULN	L<3500/mm ³	0
Kumagai et al. (24)	ALT> ULN dopo inizio o aumento di trattamento con MTX	L <3500/mm ³	0
Urano et al. (25)	rialzo transaminasi	0	0
Van Ede et al. (10)	ALT> ULN (in assenza di abuso di alcol) in almeno 2 valutazioni su 4 consecutive	0	0

? = non noto, 0 = non considerato, AST = aspartato amino transferasi, ALT = alanina amino transferasi, ALP = fosfatasi alcalina, ULN = limite normale superiore, HBV = virus epatite B, HCV = virus epatite C, MCV = volume corpuscolare medio, L = leucociti, Hb = emoglobina.

schio è quello di non riconoscere realmente la tossicità indotta dall'MTX e pertanto di attribuire erroneamente ad un altro evento la correlazione con un particolare genotipo.

CONCLUSIONI

Secondo un'analisi condotta da Kim et al. (9) uno studio di farmacogenetica è utile se:

- il polimorfismo è frequente nella popolazione;
- la tecnica disponibile per lo screening genetico è sensibile e specifica;
- la malattia d'interesse è frequente;
- i costi della malattia sono elevati;
- i costi della terapia sono elevati.

Nonostante nel nostro caso queste condizioni risultino soddisfatte, affinché lo screening di un polimorfismo genetico possa essere utilizzato nella pratica clinica è necessario che numerosi studi av-

valorino la correlazione tra un genotipo e un fenotipo clinico (risposta-non risposta, tossicità-non tossicità).

Nonostante le basi teoriche lasciassero sperare in un possibile ruolo del gene dell'MTHFR nella risposta all'MTX, attualmente non esistono evidenze sufficienti a supporto dell'utilità dello screening genetico pre-trattamento nella pratica clinica.

È auspicabile che ulteriori indagini, possibilmente prospettiche, in popolazioni etnicamente omogenee, basate su criteri ben disegnati, in pazienti possibilmente trattati con solo MTX e, data la riconosciuta importanza dell'acido folico, tutti sottoposti a tale supplementazione, chiariscano la questione.

Cruciale sarà inoltre approfondire, sia in vitro che in vivo, l'effetto dell'acido folico sull'attività enzimatica dell'MTHFR. Qualora venisse confermata la sua capacità di annullare l'effetto degli SNPs, sarebbe infatti importante spostare l'attenzione su altre varianti geniche che in questi anni hanno già cominciato ad essere indagate.

RINGRAZIAMENTI

Gli autori ringraziano Flavio Allegri per l'utile confronto, Roberto Gorla per la collaborazione nel disegno dello studio, Cheren Saleri per il supporto tecnico e tutti i pazienti per l'adesione entusiasta allo studio.

RIASSUNTO

Il methotrexate è ancora oggi un pilastro nella terapia dell'artrite reumatoide. Tuttavia esiste una grande variabilità nella risposta al farmaco. È stato suggerito che i polimorfismi C677T e A1298C dell'MTHFR (un enzima coinvolto nel metabolismo dei folati) possano essere correlati alla sua efficacia e tossicità. Questo lascia sperare nella possibilità di prevedere l'esito del trattamento nel singolo paziente con un semplice test genetico pre-trattamento. Tuttavia la nostra esperienza su 79 pazienti non ha sottolineato alcuna associazione significativa tra genotipo e risposta e l'analisi della letteratura disponibile non fornisce evidenze sufficienti a supporto dell'utilità dello screening genetico dell'MTHFR nella pratica clinica.

Parole chiave - Methotrexate, artrite reumatoide, polimorfismi genetici, metilentetraidrofoloreduttasi, acido folico.
Key words - *Methotrexate, rheumatoid arthritis, genetic polymorphisms, methylenetetrahydrofolate reductase, folic acid.*

BIBLIOGRAFIA

1. Jeurissen ME, Boerbooms AM, van de Putte LB, Doeburg WH, Lemmens AM. Influence of methotrexate and azathioprine on radiologic progression in rheumatoid arthritis. A randomized, double-blind study. *Ann Intern Med* 1991; 114: 999-1004.
2. Cronstein BN. The mechanism of action of methotrexate. *Rheum Dis Clin North Am* 1997; 23: 739-55.
3. Pincus T, Marcum SB, Callahan LF, Adams RF, Barber J, Barth WF et al. Longterm drug therapy for rheumatoid arthritis in seven rheumatology private practices: I. Nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J Rheumatol* 1992; 19: 1874-84.
4. Kurzawski M, Pawlik A, Safranow K, Herczynska M, Drozdziak M. 677C>T and 1298A>C MTHFR polymorphisms affect methotrexate treatment outcome in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics* 2007; 8: 1551-9.
5. Lipsky PE, van der Heijde DM, St Clair EW, Furst DE, Breedveld FC, Kalden JR, et al. Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group. *N Engl J Med* 2000; 343: 1594-602.
6. Maini RN, Breedveld FC, Kalden JR, Smolen JS, Furst D, Weisman MH, et al. Sustained improvement over two years in physical function, structural damage, and signs and symptoms among patients with rheumatoid arthritis treated with infliximab and methotrexate. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 1051-65.
7. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis: 2002 Update. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 328-46.
8. Wessels JAM, de Vries-Bouwstra JK, Heijmans BT, Slagboom PE, Goekoop-Ruiterman YPM, Allaart CF, et al. Efficacy and toxicity of methotrexate in early rheumatoid arthritis are associated with single-nucleotide polymorphisms in genes coding for folate pathway enzymes. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 1087-95.
9. Kim S, Jun J, El-Sohemy A, Bae S. Cost-effectiveness analysis of MTHFR polymorphism screening by polymerase chain reaction in Korean patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate. *J Rheumatol* 2006; 33: 1266-74.
10. Van Ede AE, Laan RF, Blom HJ, Huizinga TW, Hagsma CJ, Giesendorf BA, et al. The C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: a genetic risk factor for methotrexate-related elevation of liver enzymes in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 2525-30.

11. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10: 111-3.
12. Viel A, Dall'Agnese L, Simone F, Canzonieri V, Capozzi E, Visentin MC, et al. Loss of heterozygosity at the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase locus in human ovarian carcinomas. *Br J Cancer* 1997; 75: 1105-10.
13. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 315-24.
14. Felson DT, Anderson JJ, Boers M, Bombardier C, Furst D, Goldsmith C, et al. American College of Rheumatology. Preliminary definition of improvement in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 727-35.
15. Bohanec Grabar P, Logar D, Lestan B, Dolžan V. Genetic determinants of methotrexate toxicity in rheumatoid arthritis patients: a study of polymorphisms affecting methotrexate transport and folate metabolism. *Eur J Clin Pharmacol* 2008; 64: 1057-68.
16. Ranganathan P, Culverhouse R, Marsh S, Mody A, Scott-Horton TJ, Brasington R, et al. Methotrexate (MTX) pathway gene polymorphisms and their effects on MTX toxicity in Caucasian and African American patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2008; 35: 572-9.
17. Ghodke Y, Chopra A, Joshi K, Patwardhan B. Are Thymidylate synthase and Methylene tetrahydrofolate reductase genes linked with methotrexate response (efficacy, toxicity) in Indian (Asian) rheumatoid arthritis patients? *Clin Rheumatol* 2008; 27: 787-9.
18. Taniguchi A, Urano W, Tanaka E, Furihata S, Kamitsuji S, Inoue E, et al. Validation of the associations between single nucleotide polymorphisms or haplotypes and responses to disease-modifying antirheumatic drugs in patients with rheumatoid arthritis: a proposal for prospective pharmacogenomic study in clinical practice. *Pharmacogenet Genomics* 2007; 17: 383-90.
19. Dervieux T, Greenstein N, Kremer J. Pharmacogenomic and metabolic biomarkers in the folate pathway and their association with methotrexate effects during dosage escalation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 3095-103.
20. Aggarwal P, Naik S, Mishra KP, Aggarwal A, Misra R. Correlation between methotrexate efficacy and toxicity with C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate gene in rheumatoid arthritis patients on folate supplementation. *Indian J Med Res* 2006; 124: 521-6.
21. Hughes LB, Beasley TM, Patel H, Tiwari HK, Morgan SL, Baggott JE, et al. Racial or ethnic differences in allele frequencies of single-nucleotide polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and their influence on response to methotrexate in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 1213-8.
22. Weisman MH, Furst DE, Park GS, Kremer JM, Smith KM, Wallace DJ, et al. Risk genotypes in folate-dependent enzymes and their association with methotrexate-related side effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 607-12.
23. Berkun Y, Levartovsky D, Rubinow A, Orbach H, Aamar S, Grenader T, et al. Methotrexate related adverse effects in patients with rheumatoid arthritis are associated with the A1298C polymorphism of the MTHFR gene. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 1227-31.
24. Kumagai K, Hiyama K, Oyama T, Maeda H, Kohno N. Polymorphisms in the thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase genes and sensitivity to the low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Mol Med* 2003; 11: 593-600.
25. Urano W, Taniguchi A, Yamanaka H, Tanaka E, Nakajima H, Matsuda Y, et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene were associated with both the efficacy and the toxicity of methotrexate used for the treatment of rheumatoid arthritis, as evidenced by single locus and haplotype analyses. *Pharmacogenetics* 2002; 12: 183-90.
26. Guenther BD, Sheppard CA, Tran P, Rozen R, Matthews RG, Ludwig ML. The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli* suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia. *Nat Struct Mol Biol* 1999; 6: 359-365.
27. Van Gestel AM, Prevoo ML, van 't Hof MA, van Rijswijk MH, van de Putte LB, van Riel PL. Development and validation of the European League Against Rheumatism response criteria for rheumatoid arthritis. Comparison with the preliminary American College of Rheumatology and the World Health Organization/International League Against Rheumatism Criteria. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 34-40.