



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN
"Farmacologia e Oncologia Molecolare"

CICLO XXVII

COORDINATORE Prof. Antonio Cuneo

GENETICA E FARMACOGENETICA DELL'ARTRITE
REUMATOIDE: RICERCA DI VARIANTI ASSOCIATE
ALL'OCCORRENZA DI MALATTIA O ALLA RISPOSTA
FARMACOLOGICA

Settore Scientifico Disciplinare MED/03

Dottorando

Dott. BONOMO ROVERSI ELIA

Tutore

Prof. RUBINI MICHELE

Anni 2012/2014

Sommario

1. Introduzione.....	1
1.1 Inquadramento clinico dell'Artrite Reumatoide	3
1.2 Fisiopatologia dell'Artrite Reumatoide	4
1.3 Eziologia.....	7
1.4 Epidemiologia	9
1.5 Genetica.....	10
1.5.1 Complesso Maggiore di Istocompatibilità (MHC) ed HLA (Human Leucocyte Antigens)	10
1.5.2 Geni non-HLA e Artrite Reumatoide	16
1.6 Sintomatologia ed aspetti clinici.....	18
1.6.1 Sintomi specifici dell'apparato muscolo-scheletrico	18
1.6.2 Sintomi aspecifici ed extra-articolari.....	19
1.7 Diagnosi e classificazione	22
1.7.2 Indagini strumentali per immagini.....	24
1.7.3 DAS (Disease Activity Score).....	25
1.7.4 Classificazione dell'Artrite Reumatoide e diagnosi precoce	26
1.8 Terapia.....	27
1.8.1 Farmaci sintomatici	27
1.8.2 DMARDs (Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs)	28
1.8.3 Meccanismo d'azione del Metotrexato	29
1.8.4 Farmacogenetica del Methotrexate	30
1.8.3 Farmaci biologici (bDMARDs).....	31
2. Scopo della Tesi.....	33
3. Materiali e Metodi.....	37
3.1 Raccolta della casistica.....	39
3.2 Estrazione e preparazione del DNA genomico.....	40
3.2.1 Estrazione da 1,5 ml di sangue periferico.....	40
3.2.2 Estrazione da 400 µl di sangue periferico.....	41
3.2.3 Titolazione ed allestimento delle aliquote di DNA genomico	43
3.3 Genotipizzazione	44
3.3.1 Real-Time PCR	44
3.3.2 Genotipizzazione di ins/del VNTR.....	48
3.3.3 Genotipizzazione di SNPs mediante PCR-RFLP	54
3.4 Analisi statistica.....	60
3.4.1 Test del Chi Quadrato (χ^2)	60
3.4.2 Calcolo dei limiti di confidenza.....	60
3.4.3 Calcolo dell'Odds Ratio (OR)	60
3.4.4 Livello di significatività (p value)	62
3.5 Multifactorial Dimensionality Reduction	63
3.5.1 Interazione genica.....	63
3.5.2 MDR.....	63
4. Risultati.....	65
4.1 HLA-DRB1 e HLA-DQA2	67
4.1.1 Frequenze alleliche e genotipiche.....	69

4.1.2 Associazione tra genotipo ed occorrenza di Artrite Reumatoide.....	70
4.1.3 Associazione tra genotipo ed efficacia al MTX.....	73
4.1.4 Associazione tra genotipo e tossicità al MTX	77
4.1.5 Associazione tra genotipo e risposta ai farmaci biologici.....	79
4.2 HLA-G.....	84
4.2.1 Frequenze alleliche e genotipiche.....	85
4.2.2 Associazione tra genotipo ed occorrenza di Artrite Reumatoide.....	86
4.2.3 Associazione tra genotipo e efficacia al MTX.....	89
4.2.4 Associazione tra genotipo e tossicità al MTX	92
4.1.5 Associazione tra genotipo e risposta ai farmaci biologici.....	95
4.3 Geni del metabolismo dei folati.....	98
4.3.1 Frequenze alleliche	99
4.3.2 Associazione tra genotipo ed occorrenza di Artrite Reumatoide.....	101
4.3.3 Associazione tra genotipo e efficacia al MTX.....	102
4.1.4 Associazione tra genotipo e tossicità al MTX	104
4.1.5 Associazione tra genotipo e risposta ai farmaci biologici.....	106
4.4 Analisi di interazioni epistatiche	108
5. Discussione.....	109
5.1 HLA-DRB1 e HLA-DQA2	112
5.2 HLA-G.....	114
5.3 Geni del metabolismo dei folati e dell'omocisteina	115
5.2 Conclusioni.....	116
6. Bibliografia.....	119

1

Introduzione

1.1 Inquadramento clinico dell'Artrite Reumatoide

Con il termine Artrite Reumatoide (AR) si identifica una patologia infiammatoria sistemica, a carattere autoimmune e dal decorso cronico e progressivo. E' considerata una malattia multifattoriale, in quanto è stata da tempo appurata la presenza di fattori genetici e ambientali che concorrono alla patogenesi dell'AR. La malattia è caratterizzata da un'alterazione dei meccanismi di risposta immunitaria che conduce alla progressiva deformazione e distruzione di ossa e articolazioni, in particolar modo le articolazioni diartrodiali. (Perricone et al., 2011)

L'attivazione dei linfociti T CD4+ conduce a sua volta alla stimolazione di una serie di cellule tra cui linfociti B, mononucleati, fibroblasti sinoviali, condrociti e osteoclasti. Le cellule così attivate rilasciano citochine infiammatorie, specialmente TNF- α e interleuchina 1 (IL-1) e 6 (IL-6), che stimolano la produzione di metalloproteinasi, l'angiogenesi e l'osteoclastogenesi, favorendo la progressiva erosione della cartilagine e dell'osso a livello del tessuto sinoviale infiammato e compromettendo irreversibilmente l'articolazione interessata. (Choy e Panayi, 2001)

Al momento dell'esordio, la malattia risulta caratterizzata da coinvolgimento poli-articolare e simmetrico, localizzato perlopiù a livello delle piccole articolazioni di mani e piedi ma che non esclude la possibile compromissione delle sezioni articolari di spalla, ginocchio o anca. (Grassi et al., 1998)

La cronicità dell'AR, caratterizzata spesso da fasi di riacutizzazione e remissione, determina la progressiva degenerazione del tessuto articolare con relativa deformità e perdita di funzionalità; occasionalmente si osserva interessamento extra-articolare soprattutto a carico del sistema cardiovascolare che, a causa dell'incremento del processo di aterosclerosi, risulta soggetto ad invecchiamento precoce, incentivando il rischio di mortalità nei pazienti affetti. (Catuogno et al., 2005)

L'eziologia di questa malattia autoimmune non è stata ancora definita, ma fattori ambientali tra cui età, genere, posizione geografica, clima, agenti patogeni e stile di vita (dieta, obesità, fumo di sigaretta) ne favoriscono la suscettibilità. (Perricone et al., 2011) (Youinou et al., 2010)

Per quanto riguarda età e genere, è dimostrato che l'AR si manifesta in media tra i 40 e i 60 anni anche se l'intervallo d'esordio può spaziare dai 3 a oltre gli 80 anni, con prevalenza di sviluppo nelle donne (rapporto F:M variabile da 3:1 a 4:1), lasciando spazio all'ipotesi di una possibile influenza ormonale nello sviluppo della patologia. (Alamanos, Drosos, 2005) (de Waure, Ricciardi, 2010)

Il maggior contributo in termini di occorrenza di Artrite Reumatoide, con una stima attorno al 50-60%, rimane tuttora attribuibile alla componente genetica, con particolare interesse per i geni del Complesso Maggiore di Istocompatibilità (*Major Histocompatibility Complex*: MHC).

Per questo motivo risulta evidente l'importanza di focalizzare gli studi sulla ricerca di marcatori genetici che permettano l'identificazione di uno specifico subset clinico della patologia al fine di predirne lo sviluppo e la risposta alla terapia.

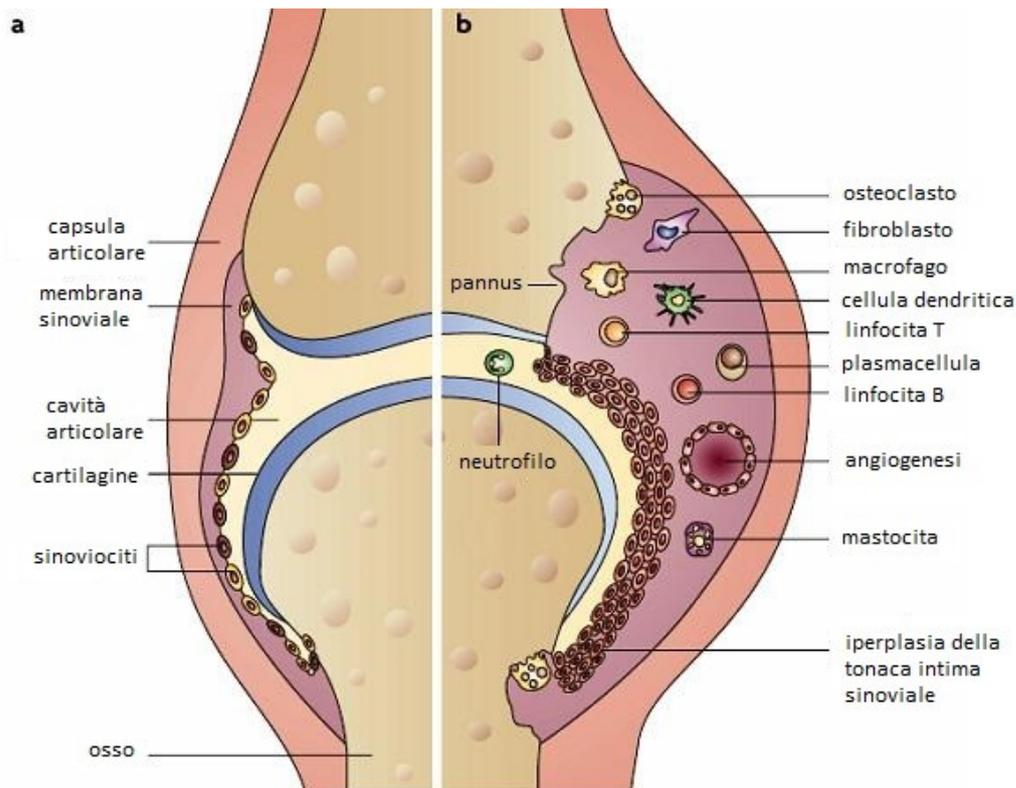


Fig. 1 Articolazione sana (a) e processo di patogenesi nell'articolazione colpita da AR (b).

1.2 Fisiopatologia dell'Artrite Reumatoide

Sono state individuate numerose componenti che interagiscono nel processo alla base della patogenesi reumatoide ma, secondo la maggior parte degli studi, si ritiene che il fattore scatenante sia il contatto con antigeni ambientali in grado d'innescare, in individui geneticamente predisposti, una reazione immunitaria caratterizzata da un'inflammatione acuta di tipo umorale e cellulare soggetta ad auto-mantenimento.

Il primo evento che conduce all'attivazione dell'alterata risposta immunitaria è l'attivazione delle cellule T a livello della membrana sinoviale ad opera delle cellule presentanti l'antigene (Antigen Presenting Cells: APCs), composte da: cellule dendritiche, macrofagi e cellule B attivate. Le APC, appartenenti alla risposta immunitaria innata, sono capaci di legare diversi tipi di molecole di provenienza autologa ed eterologa mediante legame con molecole appartenenti all'MHC (anche conosciuto nell'uomo con il nome di Human Leukocyte Antigen: HLA) di classe II. Le peculiarità genetiche di questo complesso contraddistinguono ciascun individuo e ne diversificano la risposta ad uno stesso antigene. E' noto infatti come pazienti affetti da AR presentino specifiche forme alleliche del complesso HLA, quali gli alleli HLA-DRB1, che codificano per il cosiddetto "epitopo reumatoide", che ha sequenza amminoacidica Q/K/R/A/A. Questi alleli sono caratterizzati dalla presenza di un'omologa sequenza amminoacidica a livello della terza regione ipervariabile della catena β di HLA-DR che consente il legame a specifici peptidi e che influenza il legame tra antigene e recettore delle cellule T (*T-cell receptor*: TCR). In questo modo alleli HLA-DR associati ad AR hanno effetto sulla stimolazione e proliferazione di cellule T autoreattive in sede articolare e linfonodale.

Si innesca così una cascata di eventi che comporta l'automantenimento del processo flogistico.

Le cellule T attivate iniziano a rilasciare IL-2, IL-4, IL-17 e INF- γ che, oltre a stimolare l'espansione clonale delle stesse, attivano, i macrofagi sinoviali che a loro volta liberano le citochine infiammatorie TNF- α , IL-1 e IL-6 favorendo la formazione di un ciclo retroattivo di stimolazione fra le varie popolazioni cellulari.

Le cellule B oltre al ruolo di presentazione degli antigeni, sono dotate di proteine di membrana tra cui il recettore per l'antigene, immunoglobuline e antigeni per la differenziazione in plasmacellule (CD20 e CD22).

Le plasmacellule producono una serie di anticorpi e autoanticorpi come il Fattore Reumatoide (FR), anticorpi diretti contro proteine citrullinate (*Anti-Citrullinated Protein Antibodies*: ACPA), in particolare anti peptidi ciclici citrullinati (*Cyclic Citrullinated Peptides*: CCP) e anticorpi contro l'antigene dell'artrite reumatoide di 33 KDa (RA33). La citrullinazione è un processo post-traduzionale che consiste nella sostituzione dei residui di arginina di una proteina con un amminoacido atipico, la citrullina.

Tutti questi autoanticorpi tendono a formare numerosi immuno-complessi, incrementando la produzione di citochine pro-infiammatorie attraverso l'attivazione del complemento e del recettore Fc.

L'attivazione e la sopravvivenza delle cellule B è legata anche alla co-ctimolazione da parte dei linfociti T_H1 e all'interazione con molecole stimolatrici presenti sulla superficie macrofagi in grado di legare il recettore TAC1 delle cellule B.

All'interno della membrana sinoviale si riscontra un accumulo di macrofagi sinoviali (sinoviociti di tipo A) e sinovioblasti (sinoviociti di tipo B o Fibroblast-Like Synoviocytes: FLS) che provoca l'ispessimento dello strato intinale, definito anche panno sinoviale (*Pannus*), fino all'infiltrazione e all'erosione dell'osso e delle cartilagini adiacenti, con relativa riduzione dello spazio articolare. A livello cartilagineo, il processo degenerativo è dovuto principalmente alla secrezione di diverse tipologie di enzimi proteolitici, quali serin-proteasi, catepsine, prostaglandine e metalloproteinasi della matrice, mentre l'erosione ossea risulta essere maggiormente connessa all'attivazione osteoclastica. (Turkiewicz et al., 2006),

Il processo di osteoclastogenesi origina dal legame tra RANKL, una molecola che stimola la differenziazione degli osteoclasti dai precursori ematopoietici e ne induce l'attivazione dando inizio al processo di riassorbimento osseo, ed il suo recettore RANK, espresso sia dagli osteoclasti maturi che dai precursori della linea monocito-macrofagica, che induce l'attivazione del fattore di trascrizione nucleare NF- κ B.

Le citochine TNF- α , IL-1 e IL-6, oltre a giocare un ruolo di fondamentale importanza nel processo infiammatorio locale, sono causa di importanti conseguenze anche a livello sistemico: stimolano la produzione di proteine della fase acuta, influiscono negativamente sulla regolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (*Hypothalamic-Pituitary-Adrenal*: HPA) causando affaticamento e depressione nei pazienti affetti da AR, promuovono l'instaurarsi di problemi cardiovascolari dovuti allo sviluppo di processi di aterosclerosi.

Il processo patogenetico dell'Artrite Reumatoide può quindi essere diviso in tre distinte fasi:

- fase di **induzione**: durante la quale si ha l'iniziale attivazione del sistema autoimmune che dà origine alla cascata infiammatoria;
- fase di **infiammazione**: l'intensa flogosi si estende e comincia a creare i danni articolari;
- fase di **distruzione**: durante la quale l'osso e la cartilagine vengono erosi a causa dell'attivazione di fibroblasti ed osteoclasti (Burmester et al., 2014).

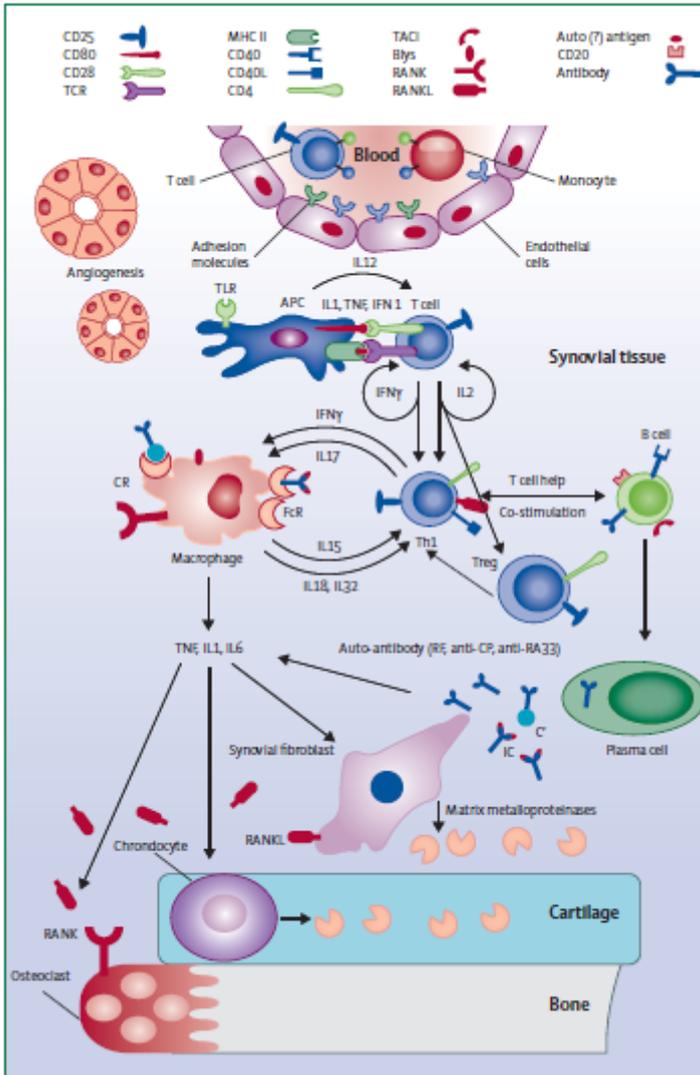


Figura 2: Le frecce evidenziano alcune delle interazioni alla base della patogenesi dell'Artrite Reumatoide. Rappresentazione schematica degli eventi che presumibilmente si verificano a livello della membrana sinoviale, così come nella cartilagine articolare e nell'osso subcondrale, circondati da aggressiva sinovite reumatoide. Blys=B lymphocyte stimulator. C'=complement. CP=citrullinated peptide. CR=complement receptor. FcR=receptor for the Fc portion of IgG. IC= immune complex. IFN=interferon. IFN1=type 1 interferons. IL=interleukin. RF=rheumatoid factor. TACI=transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor. TCR=T-cell receptor. Th1=T-helper 1 cell. TLR=Toll-like receptor. Treg=regulatory T cell

1.3 Eziologia

Come già anticipato, benchè non siano ancora ben noti i fattori scatenanti, la predisposizione genetica di un individuo gioca un ruolo fondamentale nella patogenesi dell'AR, influenzandone la suscettibilità e la severità.

Numerosi geni, e polimorfismi ad essi associati, sono ritenuti responsabili dell'occorrenza della malattia e della gravità con cui questa si presenta, primi fra tutti i geni appartenenti al complesso maggiore di istocompatibilità di classe II (MHC II), nello specifico al locus HLA-DRB1. Varianti a carico di questi possono provocare alterazioni della risposta immunitaria inducendo autoreattività e favorendo il processo flogistico. Accanto a questi troviamo poi altri geni non appartenenti al sistema HLA, ma che in diversi studi risultano implicati nei meccanismi di sviluppo e nel decorso della patologia, tra cui: PTPN22, dotato di attività regolatoria nei confronti di linfociti T e B, PADI4, correlato alla produzione degli anticorpi ACPA, TRAF1-C5 implicato nella risposta infiammatoria e nella regolazione di diversi processi cellulari, STAT4, fondamentale nel pathway di segnalazione dell'IL-12.

Accanto alla componente genetica, esercita un ruolo chiave l'esposizione a fattori di rischio costituzionali e ambientali.

I principali fattori di rischio costituzionali sono:

- **sesso femminile:** individui di sesso femminile sono maggiormente esposti al rischio di sviluppare AR, con un rapporto F/M di circa 2-3/1. Gli estrogeni hanno infatti un effetto stimolatore sul sistema immunitario, contribuendo all'attivazione e al mantenimento dello stato flogistico generale; diversamente il testosterone è dotato di proprietà immunosoppressive. Tali evidenze enfatizzano il possibile ruolo degli ormoni nella suscettibilità alla malattia (de Waure et al., 2010)(Alamanos et al., 2005)
- **obesità:** adiposità ed obesità sono elementi comuni in molti pazienti affetti da AR. Il tessuto adiposo, oltre al fondamentale ruolo d'immagazzinamento dei lipidi, è dotato di funzione endocrina espletata da molecole denominate adipochine. Questa tipologia di ormoni, tra cui l'adiponectina e la leptina, sono in grado di mediare la risposta infiammatoria e immunitaria esercitando un'azione modulatrice su diversi tessuti e cellule implicate nella patologia reumatoide (Wolfe and Michaud, 2012) (Ferraz-Amaro et al., 2013);
- **fattori perinatali:** durante la gravidanza il sistema immunitario del feto e della madre sono strettamente connessi. Lo scambio non ereditario di antigeni HLA materni (*Non Inherited Maternal Antigens*: NIMA) può portare all'instaurarsi di un effetto immunomodulante persistente. In particolare NIMA con sequenza amminoacidica DEERA sembrano avere un effetto protettivo; al contrario, alleli NIMA di tipo SE (*Shared Epitope*) sono associati ad un incremento del rischio di sviluppo dell'AR (van der Horst-Bruinsma et al., 1998) (Iebba et al., 2011);
- **agenti infettivi:** secondo la "Teoria igienica" le migliori condizioni igienico-sociali dei bambini possono influire sul successivo sviluppo di AR (Edwards et al., 2006). L'esposizione ad una particolare infezione può avere un ruolo diverso a seconda dell'età: infezioni contratte nell'infanzia sembrano conferire protezione nei confronti dell'occorrenza della patologia, viceversa infezioni acquisite in età adulta possono favorirne la patogenesi.

La presenza di aumentati livelli di anticorpi antimicrobici emersa da alcuni studi e la riduzione dell'incidenza di AR in seguito al miglioramento delle condizioni igieniche e alla diminuzione del tasso d'infezioni, hanno rafforzato l'ipotesi che possa essere l'esposizione ad un particolare agente infettivo l'evento scatenante, nonostante non siano stati ancora identificati patogeni specifici in grado di dare origine all'AR.

Gli agenti infettivi possono così innescare la reazione autoimmune attraverso la produzione di neoantigeni, l'attivazione delle APC o dei linfociti T autoreattivi, la formazione d'immunocomplessi o tramite "mimetismo molecolare", processo secondo cui la somiglianza tra le proteine antigeniche dei microrganismi patogeni e quelle tissutali dell'ospite potrebbe innescare

un'eccessiva risposta immunitaria verso gli antigeni self dell'individuo e dare inizio alla patogenesi della malattia. Tra patogeni più studiati e maggiormente associati allo sviluppo di AR troviamo il Parvovirus B19, il virus della Rosolia, il virus di Epstein-Barr (EBV), il virus dell'epatite B (HBV), varie specie di micoplasmi, il *Mycobacterium tuberculosis*, l'*Escherichia Coli*, il *Proteus* e la *Borrelia burgdorferi* (Iebba et al., 2011; de Waure et al., 2010; Meron et al., 2010). L'ipotesi di un'infezione all'origine dell'AR è stata presa in considerazione poiché, in un'alta percentuale di pazienti, sono state ritrovate sequenze di DNA e peptidoglicani batterici a livello della membrana sinoviale e numerosi anticorpi diretti contro antigeni batterici e virali nel siero (Firestein et al., 2012).

Un'ulteriore possibile causa iniziale può essere attribuita alla presenza di "superantigeni" a livello delle articolazioni in grado di attivare cloni multipli di linfociti T attraverso un processo MHC-indipendente. Appartenenti a questa categoria di molecole ritroviamo le HSP (Heat Shock Proteins), il collagene di tipo II, i proteoglicani, la proteina cartilaginea *gp39* e le immunoglobuline (Albani et al., 1992; van Eden, 1991).

Sembra inoltre essere rilevante il ruolo degli estrogeni come ormoni immunostimolatori: l'estradiolo è in grado di conferire una maggiore resistenza all'apoptosi ai linfociti B secernenti autoanticorpi e di incrementare la produzione di *Interferone γ* (IFN- γ), una citochina coinvolta nei processi infiammatori. Inoltre alcune cellule come i FLS (*Fibroblast-Like Synoviocytes* o sinoviociti di tipo B) esprimono in superficie recettori degli estrogeni, i quali, se stimolati, aumentano la produzione di metalloproteasi nella membrana sinoviale (Lang, 2004; Firestein et al., 2012).

I fattori di rischio ambientali più strettamente associati allo sviluppo di AR sono:

- **fumo di sigaretta:** recenti studi hanno evidenziato una forte associazione tra durata ed intensità dell'abitudine di fumare e insorgenza di AR. Il fumo sembra agire incrementando la produzione di citochine pro-infiammatorie, contribuendo a sviluppo e mantenimento dello stato flogistico, e l'attivazione dei macrofagi alveolari, che comporta un aumento del fenomeno di apoptosi e la citrullinizzazione di proteine polmonari (Klareskog et al., 2006; Linn-Rasker et al., 2006). E' stato inoltre osservato come l'abitudine di fumare sigarette pesanti e il consumo prolungato (più di 20 anni) incrementi il rischio di AR (circa 13 volte). Il fumo di sigaretta è stato inoltre collegato ad un aumento della gravità e dell'attività della malattia (Hutchinson et al., 2001) (Oliver and Silman, 2009);
- **inquinamento e smog:** recentemente è stato dimostrato che la prevalenza di AR risulta molto più elevata in individui residenti in aree urbane e suburbane, altamente trafficate e soggette ad un elevato tasso di smog (Chou et al., 1994). Anche inquinanti quali l'asbesto e il silice mostrano associazione con lo sviluppo di AR. Il meccanismo patogenetico di quest'ultimo si basa sull'attivazione del fattore di trascrizione nucleare NF-kB in grado di provocare la secrezione di mediatori chimici dell'infiammazione (Noonan CW et al., 2006) (Stolt et al., 2010);
- **fattori alimentari:** olio d'oliva, frutta, ortaggi, omega-3, vitamina D e alcol sembrano avere un effetto protettivo nei confronti dello sviluppo della patologia, al contrario un'elevato consumo di caffè risulta correlato ad un'aumentata suscettibilità ad AR, in particolare AR caratterizzata da positività a FR (Tobón et al., 2010; Källberg et al., 2009; Pedersen et al., 2006; Heliovaara et al., 2000).

1.4 Epidemiologia

Più di 20 milioni di persone nel mondo soffrono di AR con una prevalenza media globale della patologia compresa tra 0,5 e 1% della popolazione (Scott et al., 2010).

La prevalenza si stratifica però su base geografica: l'AR risulta più diffusa nel Nord Europa e Nord America (prevalenza 0,5-1,0%) rispetto a Europa meridionale (0,3-0,7%) ed ai paesi in via di sviluppo come l'Africa occidentale (0-0,5%) (de Waure et al., 2010).

L'incidenza varia da 20 a 50 nuovi casi su 100000 adulti nei paesi a Nord, mentre è stata stimata un'incidenza media annua pari a 16,5 nuovi casi ogni 100000 abitanti ed aumenta con l'età (Carbonell et al., 2008; Pedersen et al., 2009). Da notare che il maggior contributo relativo alle stime sul tasso d'incidenza proviene da studi di coorte svolti soprattutto nel Nord Europa (Alamanos et al., 2006).

La malattia colpisce individui di entrambi i sessi e in un intervallo di età molto ampio, ma la maggiore prevalenza complessiva compare in soggetti di sesso femminile e in età compresa tra i 40 ed i 50 anni, con un rapporto F/M di circa 2-3/1 (Alamanos, Drosos, 2005). Negli uomini infatti, in particolare al di sotto dei 45 anni, si ha una bassa incidenza di AR che tende ad aumentare con l'età. Dallo studio di Rodriguez et al., emerge un tasso di incidenza di AR pari a 0,09 e 0,20 per 1000 anni/persona, rispettivamente, per gli uomini e per le donne (Rodríguez et al., 2009). Tuttavia, l'incidenza negli uomini cresce bruscamente con l'età, invece nelle donne aumenta fino ai 45 anni di età, per poi stabilizzarsi fino ai 75, ed infine decrescere.

Per quanto riguarda l'epidemiologia dell'AR nei bambini, i pochi studi esistenti stimano una prevalenza dell'AR giovanile da 1 a 2 per 1000 bambini, mentre l'incidenza varia tra gli 11 e i 14 nuovi casi per 100000 bambini per anno (Gabriel et al., 2009).

Dati ottenuti da studi italiani riportano invece, a livello nazionale, un andamento relativamente costante della prevalenza, che risulta poco variabile nel tempo e compreso in media tra lo 0,33% e lo 0,46%, riscontrabile soprattutto nel genere femminile.

Tra gli studi più recenti effettuati in Italia, Della Rossa et al. hanno evidenziato una prevalenza dello 0,4% su un campione di pazienti arruolati nel biennio 2006-2007; Benucci et al. invece, studiando un campione di popolazione residente a Firenze hanno ottenuto una stima di incidenza della patologia in fase precoce (Early Rheumatoid Arthritis: ERA) pari allo 0,98%, con maggiore frequenza nel genere femminile. Il rapporto d'incidenza nella popolazione italiana affetta da ERA si è rivelato più elevato di quello trovato in altre popolazioni europee, ma inferiore a quello statunitense (Inghilterra e Finlandia), ma inferiore a quello statunitense (Benucci et al., 2008).

Tab.1 In tabella sono riportati gli studi più recenti sulla prevalenza di AR eseguiti in Italia e la suddivisione per genere.

Primo autore, anno di pubblicazione	Luogo	Periodo dello studio	Nr. soggetti	Età media campione (anni)	Prevalenza AR (%)	Dati per genere (%)
<i>Cimmino et al., 1998</i>	Liguria	1991-1992	3294	48,3	0,33	F: 0,51 M: 0,13
<i>Marotto et al., 2005</i>	Sardegna	2002-2003	30264	62	0,46	F: 0,73 M: 0,19
<i>Salaffi et al., 2005</i>	Marche	2004	2155	57,8	0,46	/
<i>Della Rossa et al., 2010</i>	Toscana	2006-2007	26709	66,5	0,40	F: 0,63 M: 0,14

1.5 Genetica

Come precedentemente affermato la componente genetica esercita un ruolo chiave nella patogenesi dell'Artrite Reumatoide, tanto da fornire un contributo stimato attorno al 60%. (Iebba et al., 2011) (Bogdanos et al., 2012) (MacGregor AJ et al., 2000).

L'associazione tra fattori genetici e Artrite Reumatoide è risultata evidente quando sono stati identificati gruppi familiari di suscettibilità ad AR: parenti di primo grado dei pazienti hanno mostrato una prevalenza tra il 2% e il 12%, gemelli monozigoti tra il 12-30% mentre in gemelli dizigoti dello stesso sesso tra il 5-10% (Perricone et al., 2011) (vedi MacGregor AJ).

Negli ultimi anni sono state identificate numerose varianti genetiche associate al rischio di sviluppare AR. E' stato inoltre realizzato inoltre un database denominato *RAvariome*, sviluppato per fornire un elenco di varianti genetiche associate ad AR, suddivise in base alla nazionalità o all'etnicità, e con relativo grado di riproducibilità, basato su una chiara rivalutazione dei risultati ottenuti dagli studi genetici d'associazione. Il database è dotato inoltre di un'applicazione che consente di calcolare il rischio genetico di un individuo conoscendone l'etnia ed il genotipo (Nagai et al., 2013).

Da anni il contributo più grande in termini di fattori di rischio genetico risulta fornito dai geni appartenenti al sistema HLA, nello specifico all'MHC di classe II: tra i più studiati, HLA-DR ed HLA-G mostrano importanti associazioni con l'occorrenza di AR.

1.5.1 Complesso Maggiore di Istocompatibilità (MHC) ed HLA (Human Leucocyte Antigens)

Il Complesso Maggiore di Istocompatibilità (MHC, *Major Histocompatibility Complex*) è un gruppo di geni altamente polimorfici e strettamente associati tra loro, che codifica per una serie di antigeni presenti sulle cellule di tutti i tessuti e coinvolti nella discriminazione tra il self ed il non-self e nel riconoscimento dell'antigene da parte dei linfociti T. Le molecole del sistema MHC infatti sono in grado di scaturire una risposta immunitaria in un soggetto nelle quali esse sono riconosciute come estranee (es. trapianti), poiché ogni individuo di una specie presenta antigeni diversi dagli altri.

Questo sistema è presente in tutte le specie di vertebrati, in ciascuna delle quali assume uno specifico nome; nell'uomo è denominato HLA (*Human Leucocyte Antigens*) ed è localizzato sul braccio corto del cromosoma 6 (fig. 1.3.1), dove occupa una lunghezza di circa 3500 Kilobasi.

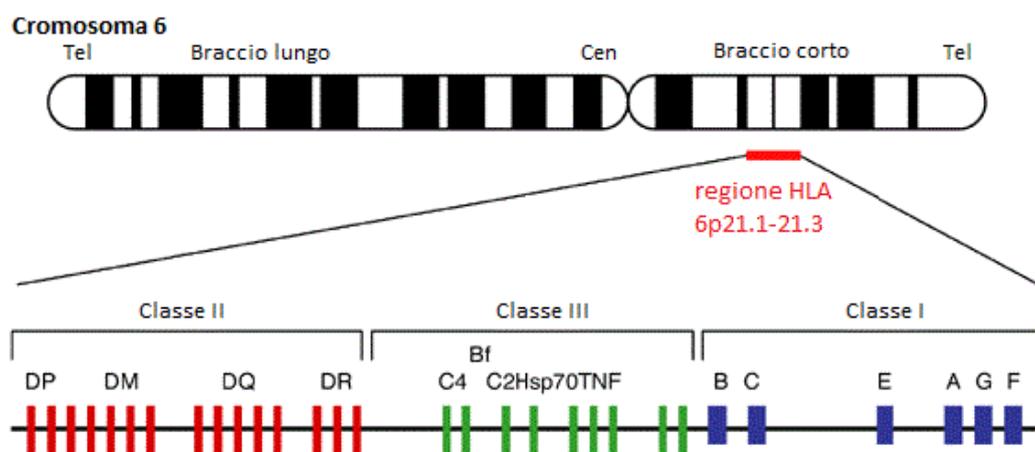


Figura 3 Mappa genetica della regione HLA sul cromosoma 6.

Il sistema HLA è costituito da tre regioni, che, partendo dal centromero, sono disposti nell'ordine classe II, classe III e classe I.

La regione di **classe I**, subregione di 2000 Kb, è suddivisa in loci HLA-I classici e non classici. I loci classici sono ripartiti a loro volta in *A*, *B* e *C*, e codificano per antigeni di classe I con funzione di presentazione dei peptidi endogeni, precedentemente processati dalle cellule, al recettore presente sui linfociti T citotossici CD8+. I loci HLA-I non classici, rispettivamente *E*, *F* e *G*, codificano per proteine minori la cui funzione biologica non è ancora ben nota. L'elevato numero di geni e pseudogeni può esser motivato dall'elevata frequenza di duplicazioni e delezioni di questa regione.

Le molecole di classe I sono espresse su tutte le cellule nucleate e sono costituite da due catene polipeptidiche, una catena pesante α (che presenta tre domini, α_1 , α_2 e α_3) ed una catena leggera chiamata β_2 -microglobulina.

La regione di **classe II** contiene il locus *D*, suddiviso nelle sottoregioni *DP*, *DQ* e *DR*, che codificano per le molecole di classe II, ed un locus minore, *DM*, correlato anch'esso con l'MHC di classe II. In questa regione sono stati identificati anche i geni *LMP2*, *LMP7*, *TAP1* e *TAP2*. I prodotti derivati da *LMP2* e *LMP7* sono coinvolti nei meccanismi di processazione degli antigeni; *TAP1* e *TAP2* codificano invece per specifici trasportatori di antigeni dal citoplasma al reticolo endoplasmatico, dove legano le molecole HLA. Le proteine di classe II hanno la funzione di presentare peptidi esogeni ai linfociti T helper CD4+ e sono costituite da due catene polipeptidiche, α e β (ciascuna presenta due domini, α_1 e α_2 , β_1 e β_2). Le molecole di classe II sono espresse esclusivamente su linfociti B, macrofagi, cellule dendritiche e cellule di Langerhans.

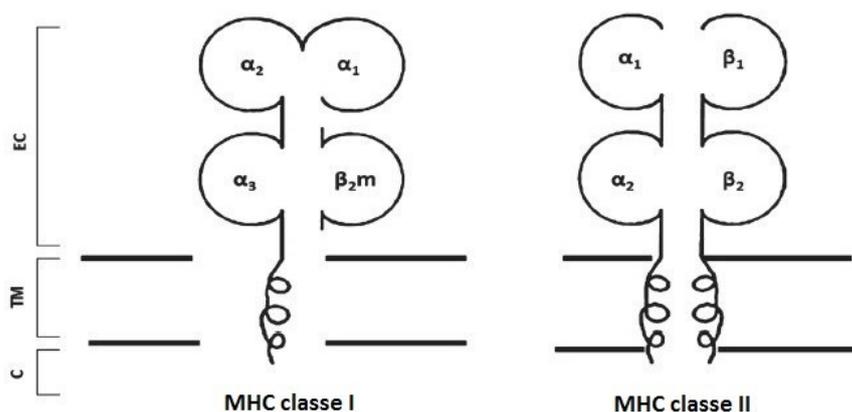


Fig. 4 Schema della struttura delle molecole MHC di classe I e II.

La regione di **classe III**, subregione di 1000 Kb localizzata tra la regione di classe I e II, codifica per molecole immunologiche non correlate con l'HLA denominate *antigeni di classe III*. Tra questo tipo di antigeni troviamo: componenti del sistema del complemento, nello specifico i frammenti C2 e C4, il fattore B (Bf), l'enzima 21-idrossilasi e strutture proteiche implicate nella risposta immunitaria come il TNF α e β (*Tumor Necrosis Factor α e β*).

Le molecole MHC sono soggette ad un accentuato polimorfismo delle porzioni extracellulari leganti l'antigene. Questa particolarità scaturisce dall'elevato multiallelismo dei geni coinvolti: per ogni gene, infatti, esistono numerose forme alleliche diverse che codificano a loro volta per altrettante varianti molecolari di MHC, ed è per questo motivo che, all'interno di una specie, è un evento raro trovare individui con molecole identiche.

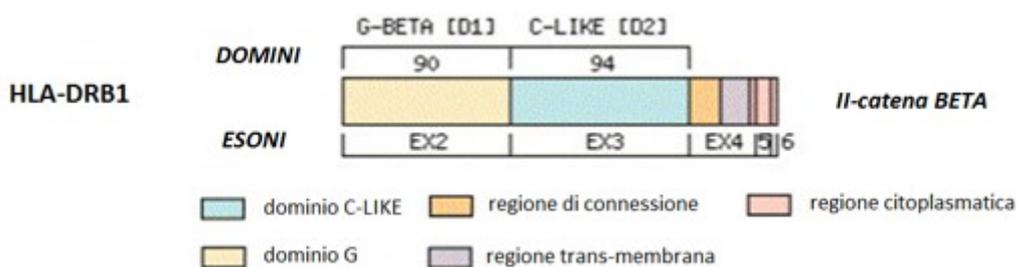
Inoltre, l'espressione degli alleli HLA è codominante, in quanto ogni individuo esprime i prodotti di entrambi gli alleli ereditati ed entrambe le molecole partecipano alla presentazione antigenica; in questo modo, le molecole HLA di classe I e II sono in grado di legare una grande varietà di antigeni.

1.5.1.1 Associazione tra HLA-DR ed Artrite Reumatoide

Dal punto di vista genetico, il fattore di rischio preponderante per lo sviluppo di AR si ritrova nel locus HLA, che rappresenta il 30-50% di tutta la suscettibilità genetica (Bowes et al., 2008). In particolare, il locus HLA-DR ha evidenziato una notevole associazione con il rischio di occorrenza della malattia.

Strutturalmente, la molecola HLA-DR è un eterodimero costituito da una catena α (DRA) ed una catena β (DRB), localizzate entrambe sulla membrana delle cellule presentanti l'antigene (fig. 1.3.3) e che quindi consentono a tale proteina di svolgere la funzione di presentazione dei peptidi antigenici ai linfociti T.

(a)



(b)

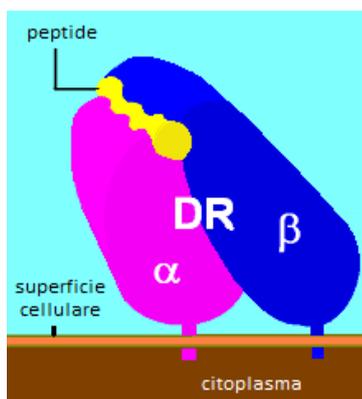


Fig. 5 Struttura genica (a) e molecolare (b) di HLA-DR

La forte associazione esistente tra HLA di classe II e AR, forse la prima ad esser stata descritta, è stata oggetto di diversi studi caso-controllo in diverse popolazioni (Reveille, 1998). La presenza degli alleli HLA-DRB1*01 e HLA-DRB1*04, contenente lo *Shared Epitope* (SE), è stata osservata spesso in pazienti con AR rispetto ai controlli sani, consentendo di attribuire alla presenza di tali alleli l'aumentata suscettibilità alla malattia.

Lo Shared Epitope, o "epitopo condiviso", è una sequenza aminoacidica comune a molti alleli del gene HLA-DRB1 situata in posizione 70-74 della terza regione ipervariabile (HVR3) della catena β delle molecole HLA-DRB1 (Iebba et al., 2011). Risulta generalmente identificata dalle sequenze aminoacidiche:

- QKRAA, principalmente codificati dal suballele *0401;
- QRRAA, principalmente codificati dai suballeli *0101, *0102, *0401, *0404, *0405, *0408 e *1402;
- RRRAA, principalmente codificati dal suballele *1001.
-

Du montcel et al., hanno proposto un nuovo sistema tassonomico per la classificazione del rischio di sviluppare AR. Questo sistema si basa sul fatto che la sequenza RAA, ritenuto il motivo più

legato al rischio di suscettibilità, in posizione 72-74 risulta modulata dagli amminoacidi in posizione 70 e 71.

In posizione 70, la presenza di glutammina (Q) e arginina (R) produce un notevole incremento del rischio di suscettibilità rispetto alla presenza di acido aspartico (D); se in posizione 71 troviamo l'amminoacido lisina (K) si avrà un rischio elevato, con arginina il rischio sarà intermedio mentre con alanina (A) e acido glutammico (E) il rischio sarà notevolmente più basso. Sulla base di questa nuova classificazione di rischio, gli alleli SE sono stati suddivisi in 4 gruppi:

- S₁: presenza di A o E in posizione 71;
- S₂: presenza di K in posizione 71;
- S₃: presenza di R in posizione 71;
- X: tutti gli alleli che non presentano il motivo RAA.

Considerando inoltre l'amminoacido situato in posizione 70 possono essere inserite altre 2 tipologie alleliche aggiuntive:

- S_{3D}: presenza di D in posizione 70;
- S_{3P}: presenza di Q o R in posizione 70.

Alleli S₂ ed S_{3P} appaiono associati ad AR e sono inoltre correlati alla produzione di ACPA, viceversa S₁, S_{3D} e X mostrano un rischio ridotto di suscettibilità alla malattia (du Montcel et al., 2005).

Lo SE è situato a livello di una struttura ad α -elica della molecola, che permette di intervenire nel legame dell'antigene ad HLA-DR. L'epitopo sembra direttamente coinvolto nella patogenesi dell'AR attraverso la presentazione dei peptidi artritogenici e delle proteine citrullinate alle cellule T, stimolando conseguentemente il rilascio di ACPA da parte dei linfociti B (van der Helm-van Mil et al., 2007; Feitsma et al., 2010).

La presenza di alleli SE del gene HLA-DRB1 è apparsa associata ad artrite reumatoide caratterizzata da sieropositività agli ACPA, evidenziando una possibile differenza del profilo di rischio genetico tra AR ACPA-positiva e l'AR ACPA-negativa: AR ACPA-positiva rappresenta un sottogruppo di malattia con andamento più severo (Perricone et al., 2011). Alleli SE risultano correlati anche ad elevata attività di malattia, aumentato rischio di sviluppare sinovite erosiva e maggiore frequenza di manifestazioni sistemiche (Iebba et al., 2011).

Per quanto riguarda la gravità ed il decorso della malattia, la presenza di manifestazioni extra-articolari ed un'artropatia precoce sembrano essere più frequenti nei pazienti portatori degli alleli *0401 e *0404, mentre l'allele *0101 sembra essere correlato ad una malattia lieve (Weyand et al., 1992).

Oltre ad alleli SE, sono stati identificati alleli con sequenza amminoacidica DEERA, in posizione 70-74 della catena 1 di HLA-DRB1. Questa tipologia allelica svolge un'azione protettiva nei confronti dello sviluppo di AR, sia per la forma ACPA sieronegativa che ACPA sieropositiva, e sembra esercitare il suo effetto anche in simultanea presenza di alleli SE; eccezione fatta per pazienti con malattia a carattere erosivo in cui si ipotizza la presenza di fattori patogenetici non correlati al sistema HLA. Sembra che gli alleli DEERA siano in grado d'indurre un meccanismo di tolleranza mediata attraverso l'attivazione delle cellule T regolatorie (Treg) o mediante regolazione negativa di cloni autoreattivi a livello timico. Appartengono a questo gruppo alleli HLA-DRB1: *0103, *0402, *1102, *1103, *1301, *1302 (Carrier et al., 2009).

La positività, invece, per HLA-DR3 sembra predisporre allo sviluppo di AR sieronegativa (Verport et al., 2005)

1.5.1.2 HLA-G ed Artrite Reumatoide

HLA-G è una molecola HLA non classica appartenente all'MHC di classe Ib caratterizzata da limitato polimorfismo, scarsa distribuzione tissutale ed un unico schema di splicing alternativo. Il gene HLA-G è localizzato sul braccio corto del cromosoma 6 in posizione 6p21.3 ed è costituito da 8 esoni: l'esone 1 codifica per il peptide segnale, l'esone 2 per il dominio $\alpha 1$, l'esone 3 per il dominio $\alpha 2$, l'esone 4 per il dominio $\alpha 3$, l'esone 5 per il dominio trans-membrana, gli esoni 6 e 7 per il dominio citoplasmatico e l'esone 8 per il codone di stop 3'UTR.

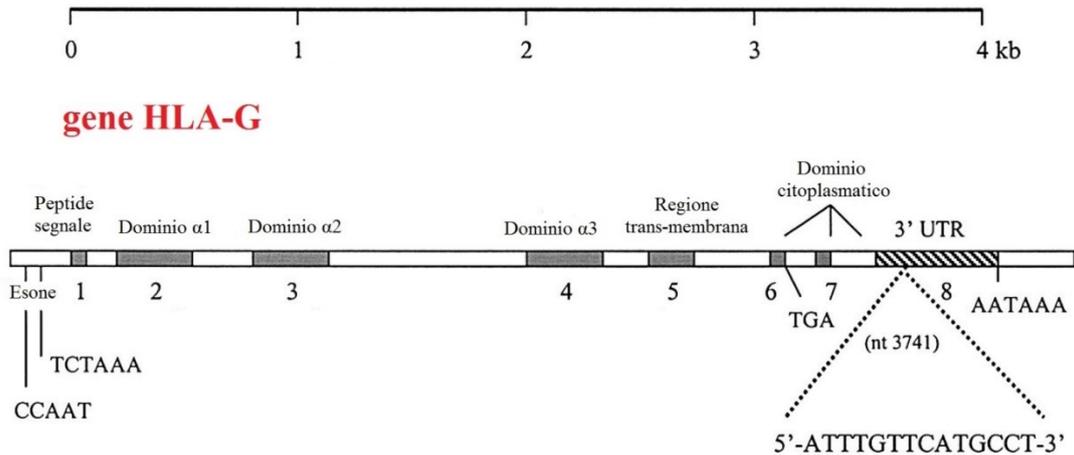


Figura 6. Struttura del gene HLA-G.

Esistono sette diverse isoforme generate mediante splicing alternativo:

- HLA-G1, G2, G3 e G4 sono glicoproteine di membrana;
- HLA-G5, G6 e G7 sono molecole solubili e quindi secrete (sHLA-G).

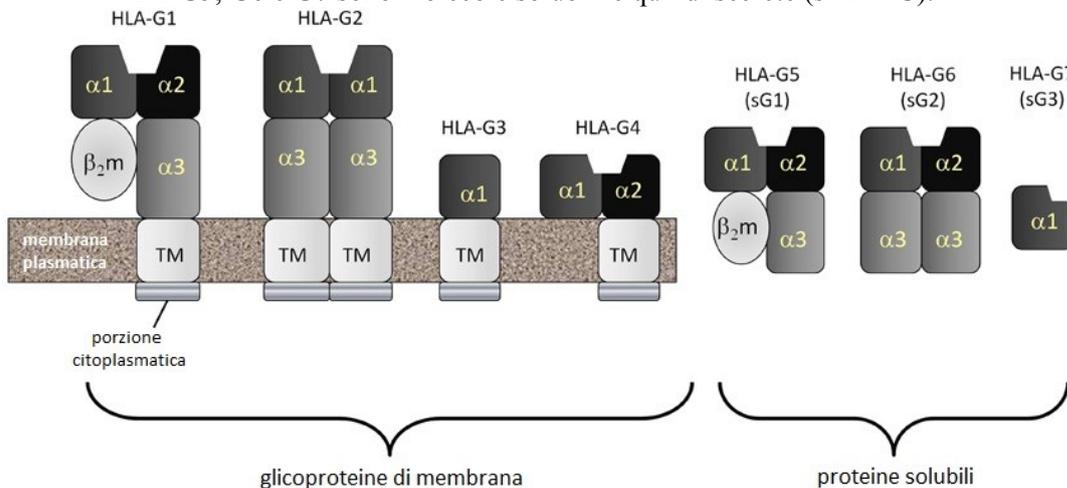


Figura 7 Isoforme delle proteine generate dal gene HLA-G e loro struttura.

Numerosi studi dimostrano che HLA-G interviene nella regolazione dei meccanismi immunosoppressori, esercitando la sua azione sulle cellule del sistema immunitario con conseguente inibizione della risposta immunitaria (Veit et al., 2014). Le principali funzioni di HLA-G consistono nell'inibizione dell'attività e della proliferazione dei linfociti T, inibizione della proliferazione delle cellule NK, inibizione della risposta alloproliferativa delle cellule T CD4+, inibizione della differenziazione e della funzione delle cellule presentanti l'antigene (APCs).

La proteina viene espressa in particolar modo nelle cellule del trofoblasto, a livello dell'interfaccia materno-fetale, inducendo un meccanismo di tolleranza tra il sistema immunitario materno ed il feto. L'espressione di HLA-G durante la gravidanza, esercita quindi un effetto protettivo nei

confronti del feto, riducendo così la possibilità di un evento abortivo causato dall'attività citotossica delle cellule NK materne.

Il ruolo immuno-protettivo di HLA-G è stato evidenziato anche in seguito a trapianti di organi: un'umentata espressione della molecola è risultata associata ad una diminuzione degli episodi di rigetto (Verbruggen et al., 2006).

L'espressione di HLA-G è stata documentata anche in condizioni fisiologiche in alcuni tessuti quali cornea, timo, precursori endoteliali ed eritroidi; al contrario in condizioni non fisiologiche come infezioni virali, trapianti, cancro, malattie infiammatorie ed autoimmuni, è stata evidenziata un'espressione ectopica della molecola.

È stato osservato che HLA-G presenta 2 effetti distinti in condizioni patologiche: può esercitare un ruolo protettivo in presenza di processi infiammatori e autoimmuni, mentre in tumori e malattie infettive può aumentare il rischio (Clements et al., 2007).

L'espressione di HLA-G ha quindi una possibile azione di protezione tissutale contro le reazioni infiammatorie autoimmuni ed infatti una sua diminuzione aumenta la suscettibilità verso molte patologie immuno-mediate, tra cui l'AR. In particolare, la regione 3'UTR ha un ruolo importante nella regolazione post-trascrizionale dell'espressione di HLA-G e l'eventuale presenza di polimorfismi in questa sequenza può comportare un'alterata regolazione che può dare origine alla patogenesi.

La produzione di HLA-G è regolata da diversi polimorfismi sia nel promotore sia nella regione 3'UTR, i quali modificano l'affinità delle sequenze del gene target per fattori trascrizionali o post-trascrizionali.

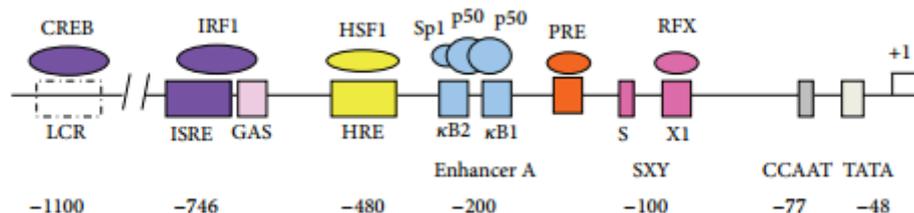


Fig. 8 Regione del promotore di HLA-G: Enhancer A element (KB1, KB2, Sp1): NF-KB; interferon-stimulated regulatory element (ISRE); interferon regulatory factor (IRF); interferon-gamma activated site (GAS); SXY region; progesterone response element (PRE); hypoxia response element (HRE)(Alegre et al., 2014).

Il locus HLA-G mostra un elevato grado di variabilità, presentando diversi siti polimorfici che possono modulare la stabilità, il trasporto, il turnover e il pattern di splicing dell'mRNA.

L'inserzione/delezione (INS/DEL) di 14 bp (rs66554220) localizzata nell'esone 8, forse il più studiato tra questi polimorfismi, sembra possa intervenire sulla stabilità e sull'espressione dell'mRNA: nello specifico, l'allele *wild type* (*wt*), portante la delezione, stabilizza l'mRNA con conseguente aumento dell'espressione di HLA-G; al contrario, individui caratterizzati dalla presenza dell'inserzione di 14 bp mostrano instabilità dell'mRNA e quindi bassa espressione di HLA-G solubile (Veit et al., 2008). Il polimorfismo è coinvolto nell'espressione delle isoforme HLA-G1e HLA-G5, in particolare i campioni con 14bp INS evidenziano una diminuzione della concentrazione di entrambe le isoforme (Hviid et al., 2003). Questo effetto appare legato alla presenza di un adenina in posizione +3187 che modifica un motivo ricco in AU nell'mRNA di HLA-G, diminuendone così la stabilità e favorendone la degradazione.

La concentrazione di HLA-G sierico è significativamente diminuita nei pazienti con AR rispetto ai controlli sani (Verbruggen et al., 2006) e questo comporta l'attivazione cronica delle cellule infiammatorie e lo sviluppo della patologia; a livello della sinovia si ritrovano tuttavia alti livelli di HLA-G, dovuti ad un meccanismo compensatorio che ne provoca il rilascio da parte delle cellule immunitarie per contrastare i processi flogistici in atto.

È stato inoltre osservato che la concentrazione di sHLA-G è un parametro di considerevole importanza per predire il decorso della malattia: pazienti con AR in fase precoce hanno evidenziato un livello di espressione più basso sia di sHLA-G sia dell'HLA-G di membrana, sviluppando una patologia più severa rispetto ad altri e confermando la funzione antinfiammatoria ed immuno-inibitoria degli antigeni HLA-G (Rizzo et al., 2013). Tuttavia il meccanismo con cui il

polimorfismo 14bp ins/del interviene nel modulare la produzione di mRNA di HLA-G, non è stato ancora chiarito. Da alcuni studi, è emerso infatti che una frazione di trascritti presentanti l'inserzione di 14bp può subire un'ulteriore forma di splicing alternativo che consiste nella rimozione di 92bp dall'mRNA maturo di HLA-G, risultante in un trascritto di dimensioni ridotte e quindi più stabile rispetto alla forma completa

La terapia con farmaci come il Methotrexate, una delle più utilizzate, è in grado di modificare la secrezione di sHLA-G e per questo può comportare un miglioramento delle condizioni del paziente: uno studio ha difatti documentato un aumento della produzione in vitro di sHLA-G da parte di monociti di sangue periferico trattati con tale farmaco (Baricordi et al., 2007); lo stesso effetto è stato osservato anche in soggetti affetti da AR con genotipo omozigote per l'allele 14bp INS: il livello di sHLA-G di questi pazienti risultava aumentato e contemporaneamente presentavano una migliore risposta terapeutica al Methotrexate (Donadi et al., 2010).

Tra i polimorfismi a carico della regione 3'UTR di HLA-G, anche lo SNP +3142C>G (*rs1063320*) ha suscitato notevole interesse, in quanto associato alla suscettibilità ad AR. La presenza della guanina in posizione +3142 può influenzare l'espressione del locus di HLA-G attraverso un aumento dell'affinità per i microRNA (*miRNA*) miR-148a, miR-148b e miR-152, diminuendo così la disponibilità di mRNA per la traduzione mediante degradazione dell'mRNA e soppressione della traduzione. In particolare l'allele G è associato ad una maggiore affinità per il microRNA e quindi ad un calo dell'espressione di HLA-G. Diversi studi hanno dimostrato come il genotipo +3142 GG sia correlato al rischio di sviluppare AR e, al contrario, come la presenza dell'aplotipo *delC* abbia un effetto protettivo (Veit et al., 2014).

HLA-G risulta quindi essere un ottimo marker non solo per l'identificazione dei pazienti suscettibili all'AR e per la diagnosi in fase iniziale, ma anche per il follow-up di monitoraggio dopo l'inizio della terapia.

1.5.2 Geni non-HLA e Artrite Reumatoide

Recentemente, grazie a numerosi studi GWAS, diversi geni localizzati al di fuori della regione HLA hanno destato interesse in quanto, oltre a mostrare associazione nei confronti della suscettibilità alla malattia, sono risultati utili nel determinare il fenotipo patologico e nel predire la risposta alla terapia (Toonen et al., 2008).

Tra questi geni, *Protein tyrosine phosphatase non receptor type 22* (PTPN22), *Peptidylarginine deiminases citrullinating enzyme 4* (PADI4), *Tumor necrosis factor receptor-associated factor 1 and complement component 5*(TRAF1-C5), *Signal transducer and activator of transcription 4* (STAT4), *Fcγ receptors* (FCGR) hanno evidenziato il maggior grado di associazione per AR.

1.5.2.1 PTPN22

Il gene, codificante per la tirosina fosfatasi intracellulare LYP, conosciuta come un potente inibitore dell'attivazione delle cellule T, è apparso associato a diabete di tipo 1 e ad altre patologie autoimmuni quali il lupus erythematosus sistemico (SLE), tiroidite autoimmune e malattia di Graves. Solo successivamente, mediante studi GWAS, è stata confermata l'associazione del gene ad AR, associazione osservata prevalentemente nella popolazione caucasica. Una particolarità interessante è la notevole componente di immunità umorale evidenziata nelle malattie associate a questo gene.

La variante maggiormente associata ad aumento del rischio di AR è il polimorfismo 1885 C>T (*rs2476601*), che codifica per la sostituzione dell'amminoacido Arginina (R) con l'amminoacido Triptofano (W) in posizione 620. Il polimorfismo risiede in un largo blocco aplotipico che circonda l'intero gene e nonostante sia stato chiaramente dimostrato che il Triptofano in posizione 620 riduce l'affinità di legame tra PTPN22 e la chinasi intracellulare *Cs*, non è ancora stato ben delineato il meccanismo con cui la variante influenza il rischio di malattia. Individui con un solo allele dotato della variante hanno mostrato un rischio di occorrenza di AR aumentato di 2 volte mentre pazienti con genotipo omozigote per la variante presentano un incremento del rischio di ben 3-4 volte. Tutto questo suggerisce come questa possa rappresentare l'attuale variante causale,

lasciando spazio all'ipotesi che l'allele associato alla patologia possa produrre una proteina in grado di ridurre l'inibizione delle cellule T incrementando il rischio di autoimmunità. Il polimorfismo sembra inoltre non essere associato al fumo di sigaretta.

1.5.2.2 PADI4

Il gene PADI4 codifica per uno dei diversi isoenzimi responsabile della conversione post-traduzionale dei residui di arginina in citrullina e sembra essere correlato con la produzione di ACPA. L'enzima trova il suo più alto livello di espressione nel midollo osseo e nei leucociti presenti nel sangue periferico, ma compare anche in the sublining del tessuto sinoviale. L'mRNA di PADI4 risulta overespresso nel sangue di pazienti affetti da AR e la sua attività è modulata dalla concentrazione di Ca^{++} e pH. Durante il processo apoptotico, rilevato mediante l'individuazione di depositi di fibrina nella sinovia dei pazienti, i livelli cellulari di Ca^{++} aumentano fino a stimolare l'attivazione di PADI4.

Inizialmente il locus di PADI4 è stato associato a suscettibilità ad AR nelle popolazioni di Europa e Giappone, successivamente studi condotti in Francia, Inghilterra e Spagna hanno dato risultati discordanti riguardo al ruolo del gene nella patogenesi dell'AR nella popolazione europea. Inoltre, differenze nei fattori ambientali di queste popolazioni possono spiegare questa dicotomia nel comportamento della patologia.

1.5.2.3 TRAF1-C5

Diversi studi GWAS hanno identificato come geni associati ad occorrenza di AR, TRAF1 e C5. TRAF1 è un membro della famiglia di fattori associati al recettore per TNF, proteine che attraverso una serie di segnali sono in grado di regolare la proliferazione e la differenziazione cellulare, l'apoptosi, il rimodellamento osseo e l'attivazione o inibizione delle citochine. Il gene interagisce inoltre con i segnali di CD40, ulteriore molecola ritenuta associata al rischio di AR, ed è dotato di attività anti-proliferativa.

C5 codifica invece per il componente 5 del complemento che sembra contribuire allo sviluppo di AR attraverso la mobilizzazione delle cellule infiammatorie e sinoviali e la distruzione tissutale.

Gli SNPs maggiormente associati sono rs3761847 e rs10818488, ed il più forte segnale genetico risulta provenire dalla regione compresa tra TRAF1 e C5, spesso soggetta ad alterazioni dell'attività regolatoria di TRAF1.

1.5.2.4 STAT4

Trattasi di un fattore di trascrizione deputato all'attivazione dei segnali intracellulari tramite citochine quali IL-12, IL-23 e IL-27, conducendo alla produzione di $IFN\gamma$ e alla differenziazione delle cellule T CD4. La trascrizione di STAT4 può essere indotta dall'attivazione e maturazione dei monociti o delle cellule dendritiche immature. STAT è inoltre overespresso nella sinovia dei pazienti affetti, ed è stato osservato che dopo trattamento con DMARDs l'espressione del gene nelle cellule dendritiche sinoviali risultava notevolmente ridotta, individuando STAT4 come possibile target terapeutico. Il polimorfismo rs7574865 è associato ad AR nelle popolazioni di Europa, Asia e America latina, mentre la variante intronica rs11893432 sembra predisporre allo sviluppo di AR.

1.5.2.5 FCGR

Il gene FCGR è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 1 in posizione q21-q23. Uno dei polimorfismi a carico di questo gene, FCGR3A 559 T>G (rs396991), che consiste nella sostituzione di una fenilalanina con una valina in posizione 158 a livello del dominio di legame dell'immunoglobulina, sembra aver conseguenze funzionali. In particolare la variante allelica è associata ad una elevata affinità di legame cellule NK IgG rispetto allele wild type, con effetto dose

dipendente. La valina sembra agire stimolando la cattura di patogeni IgG opsonizzati e complessi immunitari IgG, indirizzandoli direttamente verso il pathway di presentazione antigenica. In presenza della fenilalanina si verifica l'effetto contrario con conseguente riduzione della risposta infiammatoria. Questo polimorfismo ha evidenziato associazione allo sviluppo di AR nella popolazione europea.

1.6 Sintomatologia ed aspetti clinici

L'AR può esordire in due diverse modalità: può coinvolgere da subito le piccole articolazioni di mani e piedi in modo bilaterale e simmetrico, oppure colpire inizialmente una sola articolazione per poi estendersi ad altre nel tempo. L'esordio può essere acuto, con manifestazioni sistemiche, oppure subdolo, con sintomi prevalentemente localizzati alle articolazioni. Talvolta la patologia può essere preceduta o da un reumatismo palindromico (un attacco infiammatorio acuto di una o più articolazioni), o da una tenosinovite della guaina dei flessori del carpo (sindrome del tunnel carpale), oppure da una tenosinovite degli estensori (Franceschi et al., 2008).

In ogni caso, l'andamento è progressivo e degenerativo, poiché le manifestazioni cliniche aumentano e peggiorano lentamente nel corso dei mesi e degli anni.

A malattia conclamata, il quadro tipico è quello di una poliartrite simmetrica che interessa le articolazioni metacarpofalangee ed interfalangee prossimali di mani e polsi, le metatarsofalangee ed interfalangee prossimali di piedi e caviglie.

1.6.1 Sintomi specifici dell'apparato muscolo-scheletrico

I più rilevanti sintomi specifici dell'artrite reumatoide sono:

- infiammazione dolorosa delle articolazioni coinvolte, che spesso si verifica simmetricamente e colpisce soprattutto mani, piedi, polsi, gomiti e ginocchia;
- tumefazione e disfunzione articolare;
- edema localizzato per accumulo di liquido sinoviale;
- rigidità mattutina delle articolazioni con dolore anche a riposo;
- sindrome simil-polimialgica (artralgia e mialgia);
- anchilosi (in fase avanzata);
- atrofia dei muscoli interossei delle mani;
- deformità delle dita, soprattutto della mano;
- tenosinoviti e rotture tendinee;
- sindrome del tunnel carpale;
- atrofia muscolare da disuso.

Le deformazioni più comuni a livello delle piccole articolazioni sono l'iperflessione o l'iperestensione delle articolazioni delle dita che causano caratteristiche deformità, la sublussazione volare, la deviazione ulnare e l'alluce valgo. Queste alterazioni articolari si riscontrano nella maggior parte dei pazienti affetti da oltre dieci anni.

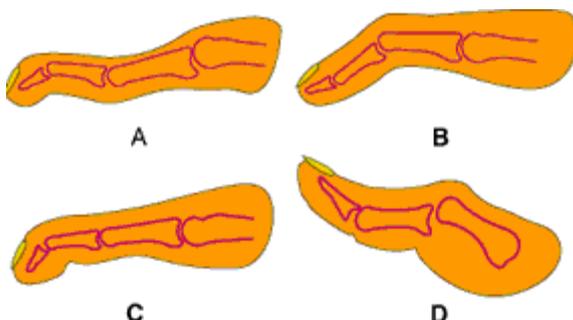


Fig. 9 Tipiche deformità delle dita nell'AR: a "collo di cigno" (A), ad "occhiello" o "en boutonnière" (B), a "martello" (C), pollice a Z (D).

1.6.2 Sintomi aspecifici ed extra-articolari

A causa dell'intenso processo flogistico che fa scaturire, l'AR può dare manifestazioni sistemiche e colpire altri sistemi ed apparati corporei. I più comuni sintomi aspecifici e generali sono:

- malessere generale e spossatezza;
- astenia;
- febbre;
- perdita di peso ed anoressia.

1.6.2.1 Manifestazioni cutanee

Le più comuni manifestazioni cutanee (30% dei pazienti) sono i *noduli reumatoidi*: questi compaiono tardi nel corso della malattia, possono essere singoli o multipli e solitamente si formano all'interno di tendini e legamenti, causando la loro rottura e la conseguente disfunzione articolare. Tali noduli di solito si formano profondamente nel tessuto sottocutaneo ed aderiscono alle strutture sottostanti (es. periostio, tendini, ecc.), ma ve ne possono essere altri più superficiali e mobili. La loro consistenza è dura e generalmente sono asintomatici. Si localizzano di solito in zone sottoposte a lievi ma ripetitive irritazioni e/o pressioni.

Raramente, i noduli reumatoidi possono anche crescere a livello degli organi viscerali.

È stato riscontrato inoltre che la terapia con Methotrexate può contribuire all'incremento del numero e delle dimensioni dei noduli (Kerstens et al., 1992).



Fig. 10 Localizzazioni tipiche dei noduli reumatoidi (superficie estensoria dell'avambraccio ed articolazioni della mano). Frequenti sono anche i noduli reumatoidi a livello del tendine d'Achille

Circa il 10-15% dei pazienti con AR sviluppa la *Sindrome di Sjögren*, caratterizzata dalla distruzione di ghiandole esocrine come le ghiandole salivari, lacrimali e parotidiche, con conseguente deficit di secrezione di saliva e lacrime, secchezza delle fauci (xerostomia) e degli occhi (cheratoconjuntivite secca e xeroftalmia).

1.6.2.2 Manifestazioni oculari



Figura 11: manifestazioni oculari

L'episclerite e la sclerite si riscontrano in circa il 5% dei soggetti affetti e possono comportare la perforazione dell'occhio e la perdita della vista.

1.6.2.3 Manifestazioni polmonari



Figura 12: pleurite

La pleurite, con o senza versamento, è piuttosto comune e colpisce circa il 70% dei pazienti.

La malattia interstiziale polmonare è una grave conseguenza dell'AR conclamata ed è più frequente nel sesso maschile e nei soggetti fumatori.

La prolungata terapia con Metotrexato è invece associata a fibrosi polmonare.

1.6.2.4 Manifestazioni cardiovascolari

L'aterosclerosi è la manifestazione cardiovascolare prevalente ed è anche la prima causa di morte per AR, poiché può provocare ischemia ed infarto miocardico o cerebrale.

Circa il 30% dei pazienti presenta versamento pericardico all'ecocardiografia, ma spesso risulta asintomatico.

Frequente è la vasculite, che può colpire piccoli, medi o grandi vasi sanguigni, probabilmente dovuta all'adesione di immunocomplessi lungo le pareti vasali; può portare ad ischemia ed infarto tissutale con formazione di ulcere e gangrena. Se colpisce i *vasa nervorum* può manifestarsi mononeurite multipla (Akil et al., 1995).

Fenomeni di miocardite e formazione di noduli cardiaci sono piuttosto rari e comunque associati ad infiltrazioni amiloidi.

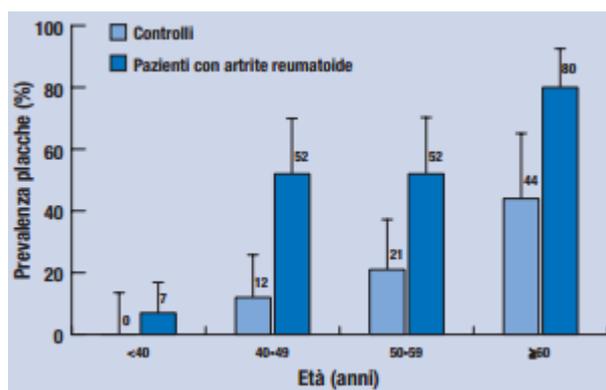


Figura 13: Prevalenza di placca aterosclerotica nei controlli e in pazienti con artrite reumatoide, suddivisi per età. La figura evidenzia che nei pazienti con artrite reumatoide la frequenza di placche arteriosclerotiche carotidee è significativamente più alta per ogni classe di età rispetto ai controlli non affetti (da Roman et al. 2006)

Numerosi studi hanno osservato un'associazione tra l'AR e la sindrome metabolica: questa è definita come una situazione clinica ad alto rischio cardiovascolare che comprende fattori di rischio come obesità centrale, ipertensione, livelli alti di trigliceridi e livelli bassi di colesterolo HDL. Lo sviluppo precoce di aterosclerosi nei pazienti con artrite reumatoide ed il conseguente aumento del rischio cardiovascolare potrebbero essere influenzati dall'occorrenza di sindrome metabolica. Infatti l'obesità centrale si ritrova frequentemente nei soggetti affetti da AR, per l'aumento della massa grassa e la perdita di massa magra; tale condizione è chiamata "cachessia reumatoide" e contribuisce all'incremento della morbosità e della mortalità per AR (Ferraz-Amaro et al., 2013).

1.6.2.5 Manifestazioni renali

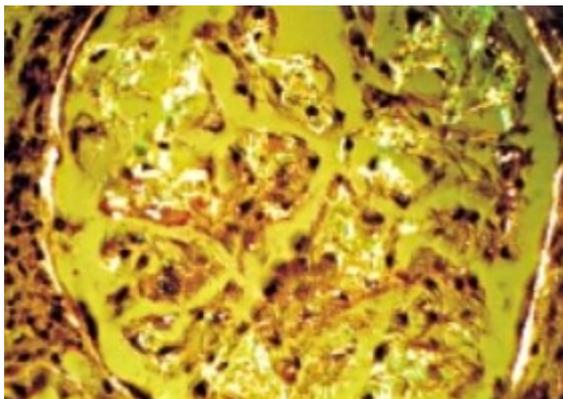


Figura 14 - Massiva invasione amiloidotica glomerulare in soggetto con AR. Riduzione della componente cellulare e mantenimento del volume del flocculo (Rosso Congo. 100 x).

Il coinvolgimento renale è solitamente raro ed associato ad amiloidosi secondaria, vasculite o tossicità da farmaci e comporta generalmente glomerulonefrite ed alterazioni tubulari. La vasculite renale necrotizzante con ematuria microscopica ed insufficienza renale è una condizione rara, ma che può manifestarsi in pazienti con grave AR sieropositiva (con presenza nel siero di fattore reumatoide) ed erosiva (Horak et al., 2013).

1.6.2.6 Manifestazioni neurologiche

I danni al sistema nervoso sono principalmente indotti dalla compressione cronica dei nervi periferici, con sintomi quali la sindrome del tunnel carpale, la mononeurite multipla e la neuropatia periferica.

La compressione nervosa può anche coinvolgere la regione cervicale della colonna spinale.

1.6.2.7 Manifestazioni ematopoietiche

Le alterazioni più comuni del sistema ematopoietico sono:

- anemia normocromica – normocitica;
- trombocitosi;
- leucopenia;
- crioglobulinemia;
- iperviscosità;
- splenomegalia.

Un'altra possibile conseguenza della malattia è la possibilità di manifestare la *Sindrome di Felty*, che comprende neutropenia, splenomegalia e deformità dovute all'AR.

1.7 Diagnosi e classificazione

In quanto patologia cronica e progressiva, l'Artrite Reumatoide è caratterizzata da un lento decorso e la sua diagnosi non è mai immediata, poiché molti segni e sintomi sono comuni anche ad altre patologie infiammatorie e/o autoimmuni e dunque aspecifici. La diagnosi differenziale di AR viene quindi effettuata dopo attente osservazioni nel tempo di manifestazioni cliniche, alterazioni di dati laboratoristici e modificazioni radiografiche.

1.7.1 Test di laboratorio

Non esistono test di laboratorio strettamente specifici per l'AR e talvolta i risultati di certe analisi possono rientrare nei range di normalità nonostante l'individuo sia affetto, oppure essere alterati anche in altre patologie. In ogni caso, vi sono dei test che vengono effettuati sui pazienti sospetti che possono guidare il medico nella diagnosi e predire l'andamento e la gravità dell'AR.

1.7.1.1 Autoanticorpi

- **Fattore Reumatoide (FR):** il Fattore Reumatoide è un autoanticorpo, tipicamente IgM, ma anche IgG o altre immunoglobuline, che lega il frammento Fc delle IgG e comporta quindi una reazione autoimmune che instaura il processo patologico per la precipitazione degli immunocomplessi formati. Si ritrova nel siero del 70-80% dei soggetti affetti da AR (*sieropositivi*), ma può non essere rilevabile nella fase iniziale della patologia (Turkiewicz et al., 2006). I pazienti che non presentano FR sierico sono detti *sieronegativi*. Questo tipo di autoanticorpo è però aspecifico, poiché talvolta è presente anche in pazienti affetti da patologie autoimmuni diverse dall'AR, come la Sindrome di Sjögren, il Lupus Eritematoso Sistemico (LES) ed altre (Koopman et al., 1985). La specificità del FR è circa all'82%, mentre la sensibilità è al 70% (Di Giacinto, 2014);
- **anticorpi anti-peptide ciclico citrullinato (anti-CCP):** gli anticorpi anti-CCP sono considerati dei markers più specifici rispetto al FR e permettono di distinguere l'AR da altre patologie autoimmuni. La specificità del test (ELISA) va oltre il 95%, mentre la sensibilità va dal 68 all'80% (Jansen et al., 2003). Questi anticorpi possono essere rilevabili parecchi anni prima della manifestazione clinica della malattia e sono utili per la diagnosi nei pazienti FR-negativi;
- **anticorpi anti-nucleo (ANA):** gli ANA sono autoanticorpi diretti contro componenti intracellulari, in particolare nucleari; i più comuni sono anti-dsDNA, anti-ssDNA ed anti-RNA. Sono generalmente presenti ed aumentati nel 20-40% dei soggetti con AR, soprattutto in quelli con manifestazioni extra-articolari e FR-positivi (Turkiewicz et al., 2006). Non sono markers specifici poiché si ritrovano anche nel 10% dei soggetti sani (Franceschi et al., 2008).

1.7.1.2 Indici di flogosi

Nonostante non sia specifica per la diagnosi di AR, l'alterazione degli indici di flogosi riflette la gravità del livello di infiammazione sistemica e può quindi essere di guida per l'impostazione della terapia ed il follow-up. I più comunemente valutati sono:

- **velocità di eritro-sedimentazione (VES):** aumenta abbastanza lentamente come risposta a stimoli infiammatori, in quanto è una conseguenza dell'aumento delle proteine della fase acuta positive;
- **proteina C-reattiva (PCR) ed altre proteine della fase acuta positive:** aumentano rapidamente durante i fenomeni flogistici. I valori di PCR, inoltre, correlano con la progressione radiografica dell'AR (Corrao et al., 2009).

1.7.1.3 Esame emocromocitometrico

All'esordio i valori dell'emocromo risultano nella norma, ma la cronicizzazione dei fenomeni infiammatori può talora dare quadri di anemia normocitica normocromica o ipocromica e leucocitosi (de Waure et al., 2010).

1.7.1.4 Esame del liquido sinoviale

L'artrocentesi può rivelarsi utile, soprattutto in presenza di versamento, per valutare il grado di infiammazione ed escludere la presenza di infezioni o artropatia da cristalli nei pazienti che manifestano dolore e gonfiore di un'articolazione.

Il liquido sinoviale viene testato per la presenza di cellule, sangue (emartrosi), pus, cristalli (gotta), proteine e glucosio e può essere posto in coltura per indagine microbiologica atta a verificare la presenza di agenti infettivi (artrite settica).

Vengono inoltre valutate le caratteristiche fisiche del campione, come volume, colore, viscosità, torbidità ed altre.

1.7.1.5 Elettroforesi delle sieroproteine (protidogramma)

L'elettroforesi proteica risulta utile, oltre che per la determinazione delle proteine totali sieriche, per verificare l'alterazione di alcuni tipi di proteine come conseguenza dell'infiammazione sistemica: in caso di flogosi attiva infatti si osserva una diminuzione dell'albumina ed un aumento delle α_1 e α_2 globuline.

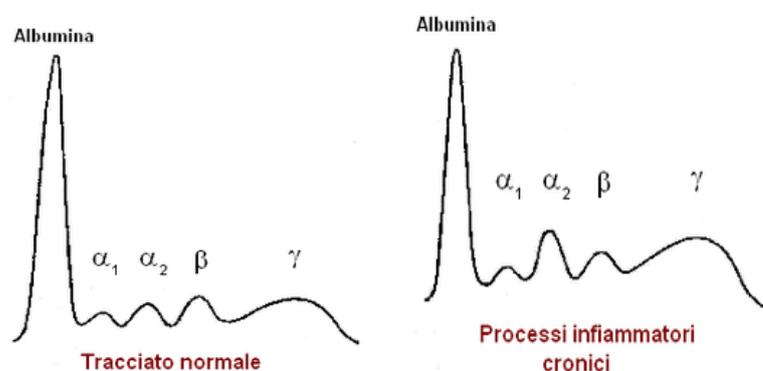


Fig. 15 Confronto tra protidogramma normale ed in presenza di flogosi cronica.

1.7.1.6 Altri markers in fase di studio

Markers sierici dell'attivazione dei linfociti B, come i livelli di IgG, IgA, catene leggere libere (FLC, dall'inglese *Free Light Chains*) delle immunoglobuline e β_2 -microglobulina, risultano essere aumentati nella fase precoce dell'AR. Questa condizione è probabilmente dovuta all'incremento dei livelli di citochine circolanti, tra le quali le due che risultano essere più strettamente associate all'aumentata produzione di autoanticorpi e di markers di attivazione linfocitaria sono IL-6 e IL-21. Inoltre, i livelli aumentati delle due citochine sono anche predittivi di una rapida progressione radiografica ad un anno indipendentemente dall'infiammazione clinica (Gottenberg et al., 2009; Gottenberg et al., 2012).

Un altro marker analizzato è CXCL13 (*C-X-C motif chemokine*, anche denominato *B-Lymphocyte Chemoattractant*, BLC): si tratta di una proteina chemiotattica per i linfociti B e dunque coinvolta in molte patologie autoimmuni. In particolare, nell'AR CXCL13 stimola la chemiotassi delle cellule B a livello articolare e ne induce la loro attivazione mediata dal BCR (*B Cell Receptor*). Nel siero e nella sinovia di individui con AR, in fase precoce, i livelli di CXCL13 sono aumentati rispetto ai controlli sani, soprattutto nei pazienti che mostrano una più rapida evoluzione della patologia e con i più gravi ed avanzati danni articolari. Tale proteina appare quindi come un marker di gravità dell'AR (Meeuwisse et al., 2011).

1.7.2 Indagini strumentali per immagini

La *radiologia* convenzionale è il gold standard per la valutazione del danno articolare e il suo monitoraggio nel tempo, tuttavia non è una tecnica molto sensibile poiché non è in grado di evidenziare le tipiche alterazioni delle fasi precoci dell'AR, ma solo quelle delle fasi più avanzate. In circa il 90% dei pazienti, le tipiche lesioni che causa la patologia si sviluppano nell'arco di tre anni dall'esordio (Akil et al., 1995) e, soprattutto a livello della mano, spesso si osservano edema dei tessuti molli, perdita di spazio articolare ed osteoporosi periarticolare.



Fig. 16 Tipiche alterazioni articolari della mano di un paziente con AR visibili tramite radiografia.

Una tecnica invece più adatta per le prime fasi della malattia è l'*ecografia articolare*, che può identificare precocemente la presenza di erosioni articolari non visibili radiologicamente; inoltre, se integrata con la metodica *power-doppler*, fornisce importanti informazioni sulla vascolarizzazione della membrana sinoviale e sull'attività flogistica in atto ed è una guida per l'eventuale biopsia sinoviale eseguibile per la quantificazione e la caratterizzazione dell'infiltrato infiammatorio. Anche la *risonanza magnetica (RMN)* è utile per ricercare lesioni articolari precoci e per confermare la presenza di alterazioni pre-erosive quali gli edemi ossei.

In ordine di comparsa, le modificazioni radiografiche osservate più frequentemente sono:

- tumefazione dei tessuti molli articolari;
- osteopenia iuxta-articolare;
- riduzione dello spazio articolare;
- microcisti subcondrali;
- erosioni ossee periarticolari;
- sublussazione e deviazione ulnare delle falangi;
- deformazione ed anchilosi ossea.

1.7.3 DAS (Disease Activity Score)

Un indice di valutazione dell'attività dell'AR, largamente impiegato, è il *Disease Activity Score* (DAS) che è stato introdotto nel 1983, prendendo in considerazione 44 articolazioni (DAS44), con lo scopo di uniformare e standardizzare l'interpretazione dei dati clinici relativi alla malattia. Il DAS applica una formula matematica basata sui seguenti parametri:

- conta del numero di articolazioni dolenti;
- conta del numero di articolazioni tumefatte;
- misurazione della VES o della PCR;
- giudizio del paziente sul proprio complessivo stato di salute espresso mediante scala visuo-analogica (GH).

La risposta alla terapia viene definita in base all'attività di malattia rilevata, rispetto alla precedente valutazione clinica, distinguendo tra bassa, moderata oppure elevata attività di malattia.

I parametri di danno articolare e di esito di malattia sono importanti per la valutazione a lungo termine (anni-decenni) e comprendono il danno articolare valutato radiologicamente, la presenza di deformità articolari, la disabilità al lavoro, il ripristino chirurgico dell'articolari, la comparsa di manifestazioni extra-articolari e la mortalità prematura.

Il DAS è calcolato secondo la formula:

$$\text{DAS} = 0.54 \cdot \sqrt{\text{RAI}} + 0.065 \cdot \sqrt{\text{sw}} + 0.33 \cdot \text{Ln}(\text{ESR}) + 0.0072 \cdot \text{GH}$$

dove:

RAI = Indice di Ritchie, secondo il quale la risposta del paziente, stimolata esercitando una digito-pressione sulle rime di articolazioni "signal" o mobilizzando passivamente i distretti la cui pressione manuale non è applicabile, viene quantificata mediante una scala ordinale: 0 = non dolente; 1 = dolente; 2 = dolente e reattivo alla palpazione; 3 = dolente, reattivo e ritratto alla palpazione. Il punteggio complessivo (compreso fra 0 e 78) è ricavato dalla somma dei punteggi relativi. (American College of Rheumatology, 2002).

SW = Numero di articolazioni tumefatte

Ln(ESR) = Logaritmo naturale della VES (mm/ora)

GH = Stato di salute complessivo (scala visuo-analogica).

Il DAS è applicabile a:

- valutazione della attività di malattia in un determinato momento:
 - elevata attività di malattia: $\text{DAS} > 3,7$;
 - bassa attività di malattia: $\text{DAS} < 2,4$;
 - remissione: $\text{DAS} < 1,6$;
- valutazione della modificazione nel tempo della attività di malattia.

Inoltre è stata validata una versione facilitata del DAS ristretta a 28 articolazioni per la valutazione sia del dolore sia della tumefazione, denominata DAS28 (American College of Rheumatology, 2002). Questo indice di valutazione può essere calcolato a partire dal DAS44 secondo la seguente formula:

$$\text{DAS28} = (1,072 \times \text{DAS44}) + 0,938$$

(van Riel et al., 3rd edition)

1.7.4 Classificazione dell'Artrite Reumatoide e diagnosi precoce

La diagnosi di certezza viene effettuata sulla base dei criteri stabiliti dall'*American College of Rheumatology (ACR)* nel 1987 (Arnett et al., 1988), creati con finalità classificative per identificare soggetti con diagnosi certa e per distinguere l'AR da altri tipi di artropatie:

1. rigidità mattutina di almeno 1 ora in regione periarticolare e articolare;
2. interessamento artritico di almeno 3 articolazioni, che abbiano manifestato edema dei tessuti molli e/o idrarto;
3. interessamento artritico delle articolazioni della mano, con almeno una zona presentante edema;
4. artrite simmetrica, con simultaneo coinvolgimento delle stesse aree articolari su entrambi i lati del corpo;
5. noduli reumatoidi sottocutanei, sopra le prominenze ossee, a carico delle superfici estensorie o in una zona intra-articolare;
6. Fattore Reumatoide nel siero in quota anomala;
7. modificazioni radiografiche, tipicamente a livello della mano e del polso, che includano erosioni e/o osteoporosi nella zona articolare interessata o in aree limitrofe.

Dal momento che i suddetti criteri sono caratterizzati da bassa sensibilità e specificità, ne sono stati formulati di nuovi nel 2010 da una collaborazione tra l'ACR e l'EULAR (*European League Against Rheumatism*), basati sul coinvolgimento articolare, stato autoanticorpale, risposta infiammatoria e durata dei sintomi.

Questi criteri tuttavia non hanno un gran valore diagnostico nelle prime fasi di malattia, per cui non possono essere utilizzati per la diagnosi all'esordio.

Una diagnosi precoce è la base essenziale per poter impostare una terapia farmacologica tempestiva capace di contrastare la progressione della malattia. Occorre quindi sfruttare la cosiddetta *window of opportunity*, ovvero la finestra temporale in cui il trattamento può potenzialmente arrestare il processo flogistico alla base dell'AR, prima che il danno diventi irreversibile.

A tal proposito, negli ultimi anni si è diffuso il concetto di *Early Rheumatoid Arthritis (ERA)*, che definisce forme di artrite molto precoce nelle quali va valutata la potenziale evoluzione verso l'AR conclamata (Di Giacinto, 2014). È quindi emersa la necessità di individuare indicatori delle fasi precoci di malattia, mediante i quali identificare soggetti a rischio con segni e sintomi di allarme, detti *red flags*, premonitori di un'evoluzione sfavorevole dell'artropatia (Emery et al., 2002). Essi sono:

- tumefazione a carico di tre o più articolazioni di durata superiore a 6 settimane;
- coinvolgimento delle articolazioni metacarpofalangee o metatarsofalangee;
- rigidità mattutina per oltre 30 minuti.

Per quanto riguarda lo stato funzionale dei pazienti, l'AR può essere classificata in quattro gruppi secondo i criteri dell'ACR del 1991 (Hochberg et al., 1992):

- CLASSE I: paziente in grado di svolgere le comuni attività quotidiane (della cura personale, professionali e sociali/ludiche);
- CLASSE II: paziente in grado di svolgere le attività professionali e associate alla cura personale ma limitato nelle attività sociali/ludiche;
- CLASSE III: paziente in grado di svolgere le attività associate alla cura personale, ma limitato nelle altre;
- CLASSE IV: paziente limitato nello svolgimento di tutte le attività (sia legate alla cura personale, sia professionali, sia sociali/ludiche).

1.8 Terapia

L'obiettivo della terapia è quello di raggiungere la completa remissione dell'AR, mantenendo la normale funzionalità fisica e psicologica oltre che la capacità lavorativa e sociale dei soggetti affetti.

Vengono quindi impostati trattamenti farmacologici aspecifici che mirano ad attenuare o inibire il processo infiammatorio articolare e ad alleviare la sintomatologia dolorosa (i cosiddetti farmaci sintomatici) ed altri trattamenti più specifici volti a rallentare la progressione della patologia, cercando di correggere le deformità createsi e recuperare così la funzione articolare. Spesso i diversi tipi di farmaci (sintomatici, specifici e biologici) vengono usati in combinazione tra loro per ottenere il massimo dell'efficacia, qualora un paziente risulti più sensibile ad alcuni farmaci rispetto ad altri a cui risulti refrattario.

Per osservare dei miglioramenti importanti in tempi abbastanza rapidi, occorre iniziare la terapia precocemente, possibilmente entro i 3 mesi dall'esordio dell'AR (Franceschi et al., 2008); per questo è essenziale una diagnosi tempestiva e occorre sfruttare la *window of opportunity*, durante la quale si può agire sul processo patologico prima che i danni diventino irreversibili.

1.8.1 Farmaci sintomatici

Sono farmaci che permettono di controllare le manifestazioni cliniche ed i sintomi della malattia, ma non in grado di contrastarne o arrestarne l'evoluzione.

1.8.1.1 FANS (Farmaci Anti-infiammatori Non Steroidei)

I FANS sono efficaci nel ridurre i sintomi all'esordio di AR, attraverso il loro meccanismo d'azione che agisce sul dolore e sulla flogosi.

Essi intervengono sul metabolismo dell'acido arachidonico, precursore di molecole coinvolte nel processo infiammatorio (prostaglandine), bloccando la *ciclossigenasi*, un enzima che esiste in due forme, *cox-1* e *cox-2*; la forma che viene secreta durante l'infiammazione è *cox-2*, mentre la produzione di *cox-1* è costitutiva ed ubiquitaria. I FANS, non essendo selettivi, agiscono su entrambe le forme, quindi l'inibizione della *cox-1* provoca diversi effetti collaterali, tra i quali la gastrolesività.

Esistono tuttavia dei farmaci inibitori selettivi per la *cox-2*, detti COXIB, che hanno dimostrato un numero minore di effetti avversi.

1.8.1.2 Analgesici

Farmaci analgesici come il *paracetamolo* o il *tramadolo* vengono utilizzati qualora i FANS siano controindicati. Entrambi presentano effetti collaterali, ma in particolare il *paracetamolo* va dosato con cautela in quanto epatotossico.

1.8.1.3 Corticosteroidi

L'uso di steroidi andrebbe evitato finché non si giunge a diagnosi certa, poiché, essendo farmaci immunosoppressori, potrebbero attenuare il quadro clinico della malattia.

Una volta appurata la diagnosi, l'uso di farmaci steroidei riduce a breve termine i processi flogistici, poiché riduce l'accumulo leucocitario nella sede dell'infiammazione, ed a lungo termine diminuisce il danno articolare, il dolore e l'edema, seppur con il rischio di diversi effetti avversi quali infezioni ed osteoporosi (Scott et al., 2010).

I corticosteroidi possono anche essere intra-articolari, iniettabili direttamente in loco per il trattamento localizzato dell'articolazione interessata.

1.8.2 DMARDs (Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs)

I DMARDs sono i farmaci per eccellenza nel trattamento dell'AR. Sono in grado di contrastare l'evoluzione della patologia e migliorarne la prognosi, poiché riducono gonfiore e dolore, fanno decrescere il livello dei markers sierici di fase acuta, limitano il progressivo danno articolare e migliorano le condizioni funzionali.

Diversi studi hanno rivelato che la terapia con DMARDs rallenta maggiormente la progressione della malattia se avviata nello stadio precoce, rispetto ad un suo uso in fase avanzata (Egsmose et al., 1995).

I DMARDs convenzionali (cDMARDs) sono il Metotrexato, la Sulfasalazina, il Leflunomide, gli antimalarici (Idrossiclorochina), la Ciclosporina ed i Sali d'oro.

1.8.2.1 Metotrexato (MTX)

Il Metotrexato è considerato da sempre il farmaco di prima linea nel trattamento dell'artrite reumatoide. Oltre la metà dei pazienti risulta in cura con MTX e, fin da quando ne è stata dimostrata per la prima volta l'efficacia a basse dosi, numerosi studi ne hanno stabilito l'importanza nella cura della patologia sia in regime monoterapico che in combinazione con altri DMARDs. Il suo costo relativamente basso e la riconosciuta esperienza nell'utilizzo, ne hanno ampiamente favorito la diffusione anche nella cura di altre patologie.

Si tratta di una molecola antagonista della sintesi di acido folico, il quale è necessario per la sintesi delle basi puriniche e della timidina; di conseguenza, il MTX inibisce la sintesi degli acidi nucleici e di molte proteine ed è perciò un farmaco citotossico, in grado di influenzare anche la risposta immunitaria dell'individuo. Per la terapia dell'Artrite Reumatoide, viene sfruttata l'inibizione del metabolismo delle basi puriniche, che provoca accumulo di adenosina, inibizione dell'attivazione dei linfociti T e soppressione dell'espressione della loro molecola di adesione intercellulare.

Purtroppo una discreta percentuale di pazienti non risponde in modo soddisfacente alla terapia e il 15-30% manifesta eventi avversi al farmaco. La risposta clinica al MTX è dose-dipendente, con un range di dosaggio piuttosto che va da 7,5 a 25 mg a settimana; a basse dosi ha un'azione prevalentemente immunomodulatoria ed antinfiammatoria, mentre ad alte dosi aumenta la sua citotossicità, per questo viene anche usato come chemioterapico nel trattamento di molte neoplasie. Gli effetti collaterali riscontrati con maggior frequenza sono mucosite, soppressione dell'attività del midollo osseo ed epatotossicità.

I pazienti in cura con MTX devono essere sottoposti, sia prima sia durante la terapia, al controllo di determinati parametri quali la completa conta cellulare ematica, la creatininemia e la funzionalità epatica.

Queste evidenze hanno condotto, negli ultimi anni, i ricercatori all'identificazione di variabili demografiche, cliniche e immunologiche in grado di influenzare l'esito del trattamento con MTX.

Grazie agli studi realizzati in campo farmacogenetico si è cercato di incrementare l'efficacia del farmaco e di ridurre i possibili effetti collaterali mediante la ricerca di marcatori predittivi della risposta al farmaco nei singoli pazienti.

1.8.2.2 Sulfasalazina

La Sulfasalazina, o Salazosulfapiridina, è una molecola derivata dalla combinazione di salicilato e sulfapiridina (una solfonammide). Oltre all'attività antinfiammatoria dovuta alla presenza di salicilato, la Sulfasalazina ha effetti immunomodulatori simili a quelli del MTX, poiché è anch'essa una molecola inibitoria della sintesi di tetraidrofolato.

È frequentemente usata in associazione ad altri DMARDs ed il suo dosaggio varia da 0,5-1 a 2-3 g/die.

Un importante test da eseguire prima di iniziare il trattamento è il dosaggio della *glucosio-6-fosfato deidrogenasi* (G6PDH), per limitare il rischio di emolisi.

Le più frequenti reazioni avverse comprendono anemia aplastica o emolitica ed agranulocitosi.

1.8.2.3 Leflunomide

Il Leflunomide è una carbossiammide aromatica (aramide) con proprietà antinfiammatorie ed immunosoppressive, in quanto inibisce un enzima coinvolto nella sintesi delle pirimidine, con conseguenti effetti sulla proliferazione linfocitaria.

Il dosaggio va da un massimo di 100 mg/die ad un minimo di mantenimento di 10-20 mg/die.

È opportuno tenere monitorati la conta cellulare ematica e la funzionalità epatica.

I più comuni effetti collaterali sono alopecia, rash cutaneo, stomatite, diarrea ed aumento degli enzimi epatici. Può inoltre avere effetti teratogeni se somministrato in gravidanza.

1.8.2.4 Idrossiclorochina

L'Idrossiclorochina è un farmaco anti-malarico, ma viene utilizzato anche nel trattamento delle patologie autoimmuni poiché ha un'importante azione immunosoppressiva.

Tuttavia, non ci sono dati che provano l'efficacia di questo farmaco nel ridurre o prevenire i danni radiografici causati dall'AR.

La dose utilizzata è di 200-400 mg/die.

Può dare tossicità oculare.

1.8.2.5 Ciclosporina

La ciclosporina è un peptide ciclico sintetizzato dal fungo *Tricoderma polysporum*, dotato di potente azione immunosoppressiva e quindi impiegato nel trattamento anti-rigetto dei trapianti d'organi, oltre che nel trattamento di malattie autoimmuni.

1.8.2.6 Sali d'oro

Grazie alla loro efficacia nella soppressione delle sinoviti, i Sali d'oro sono stati i farmaci anti-artritici più utilizzati tra gli anni 1970 e 1980. Le preparazioni correntemente in uso sono l'*aurotioglucosio*, somministrato per via parenterale, e l'*auranofin*, utilizzato tramite via orale, ma meno efficace. L'esatto meccanismo d'azione non è tuttora stato stabilito.

I più comuni effetti avversi sono reazioni muco-cutanee come stomatite, prurito e dermatite.

Al giorno d'oggi vengono utilizzati meno di frequente, per via della loro tossicità e per la presenza di numerose alternative (Turkiewicz et al., 2006).

1.8.3 Meccanismo d'azione del Metotrexato

E' stato dimostrato che numerosi enzimi interagiscono con questo farmaco regolando il suo effetto anti-proliferativo e immunosoppressivo. In quanto analogo dei folati, MTX è un inibitore competitivo dell'enzima *diidrofolato reduttasi* (DHFR). Il farmaco entra nella cellula attraverso l'enzima di trasporto dei folati (*Reduced folate carrier*, RFC1), coinvolto nel trasporto del 5-metiltetraidrofolato (5-MeTHF) e codificato dal gene SLC19A1. La sua uscita è invece facilitata dai membri della famiglia di trasportatori ABC (*ATP-binding cassette*), costituita da 48 proteine suddivise in 7 distinte sottofamiglie (ABCA-G). Di queste proteine, sembra che ABCC1-5 e ABCG2 siano quelle principalmente coinvolte nel trasporto di MTX fuori dalla cellula (CHEN et al., 2002). Una volta all'interno della cellula il farmaco è convertito in forma poligluttammata dall'enzima *folil-poligluttammato-sintetasi* (FPGS), effetto che può essere invertito dall'enzima γ -glutammina idrolasi (GGH) che catalizza la rimozione dei poligluttammati legati in γ . Rispetto alle forme monogluttammate, i folati poligluttammati hanno maggiore affinità per gli enzimi folato dipendenti. La forma poligluttammata di MTX può avere fino a 7 molecole di acido glutammico (MTXPG₂₋₇) con diverse funzioni: mantiene MTX all'interno della cellula, inibisce direttamente l'enzima diidrofolato reduttasi (DHFR), che riduce il diidrofolato (DHF) a tetraidrofolato (THF), fondamentale per la produzione di cofattori dei folati biologicamente attivi come il 5-metil-THF,

richiesto per la produzione di metionina dall'omocisteina e per la sintesi delle poliammine. Un altro enzima direttamente inibito da MTX è TYMS (Timidilato Sintasi), che converte il deossiridilato in deossitimidilato durante la biosintesi delle pirimidine. Per quanto riguarda l'enzima 5,10 Metilene -Tetraidrolato Reduttasi (MTHFR), esso non viene direttamente inibito da MTX, ma a causa degli effetti di quest'ultimo sul pool di folati intracellulare, ne rimane influenzato. La forma poligluttammata di MTX è inoltre in grado di inibire direttamente enzimi, come Glicinamide Ribonucleotide Transformilase (GAR T'ase) e 5-Aminoimidazolo-4-Carbossamide Ribonucleotide Transformilase (AICAR T'ase), che gioca un ruolo nella biosintesi delle purine. Questa inibizione causa un accumulo intracellulare di AICAR e dei suoi metaboliti, che a loro volta possono successivamente inibire due enzimi coinvolti nel metabolismo dell'adenosina, l'adenosina deaminasi (ADA) e AMP deaminasi (AMPD₁), comportando un incremento delle concentrazioni intracellulari di adenosina e adenina. La successiva defosforilazione di questi nucleotidi porta ad un aumento del rilascio di adenosina, considerata un potenziale agente antinfiammatorio, nello spazio extracellulare. Per questo si ritiene che alcuni degli effetti antiproliferativi di MTX siano mediati da questo meccanismo (Cronstein, 2005) (Chan e Cronstein, 2002).

1.8.4 Farmacogenetica del Methotrexate

Con il progresso della tecnologia è stato possibile identificare i fattori genetici in grado di modulare la risposta ai vari farmaci, tra cui il Metotrexato. Individuare una predisposizione genetica ad una reazione tossica o, in particolar modo, ad un miglioramento della risposta terapeutica non è stato così semplice. Infatti, risulta difficile definire una chiara risposta al trattamento con MTX in una malattia come L'AR: in questo caso la risposta al farmaco è una misura costituita da diversi parametri quali esami fisici (conta delle articolazioni dolenti e tumefatte), risultati di laboratorio (PCR o VES) e risposta soggettiva del paziente (HAQ). Inoltre la risposta alla terapia sarà tanto più elevata quanto più tempestivo sarà l'intervento farmacologico nella fase precoce della patologia (Baumgartner et al., 2004). Proprio per questo risulta complesso stabilire con chiarezza i fattori genetici che predispongono ad una migliore risposta al farmaco, senza contare che il contributo genetico può differire in base al periodo d'inizio del trattamento rispetto allo stadio della malattia. A causa di queste problematiche, si riscontra un quantitativo maggiore di dati disponibili relativi alla tossicità del farmaco; inoltre i risultati riguardanti l'associazione di polimorfismi a geni appartenenti a pathways coinvolti nel meccanismo d'azione del Metotrexato sono spesso controversi.

Per quanto riguarda gli enzimi di trasporto, studi d'associazione relativi all'esito della terapia con MTX correlata ai polimorfismi dei geni ABCB₁, RFC1 e ABCC₂ hanno dimostrato l'associazione dei primi due con l'efficacia e la tossicità al farmaco. Drozdik et al., hanno riportato l'associazione del genotipo TT per ABCB₁ 3435 C>T con l'efficacia al farmaco (Drozdik et al., 2007); al contrario Takatori et al., hanno individuato l'associazione del genotipo TT dello stesso SNP all'inefficacia (Takatori et al., 2006). Un ulteriore studio ha rilevato l'associazione del genotipo TT alla tossicità (Bohanec et al., 2008).

Ad oggi gran parte dell'attenzione sulla farmacogenetica di MTX nell'AR è stata focalizzata sui polimorfismi del gene MTHFR, che codifica per un enzima folato-dipendente che catalizza la conversione dell'omocisteina in metionina. I più importanti SNPs a carico di questo gene e che appaiono associati ad una diminuzione dell'attività enzimatica di MTHFR, in grado di condurre a omocisteinemia, sono: MTHFR 677 C>T e MTHFR 1298 A>C (Ranganathan et al., 2008) (Wessels et al., 2006) (Weisman et al., 2006). È stato dimostrato infatti che una diminuzione dell'attività dell'enzima può portare ad omocisteinemia con conseguente effetto tossico, come nel caso di reazioni avverse a livello gastrointestinale (GI) riscontrate in pazienti in terapia con MTX.

Tra i diversi studi di associazione tra MTHFR 677 C>T e tossicità indotta da MTX sono stati osservati:

- Effetti di tossicità GI legati al genotipo CT (Haagsma et al., 1999);
- Sospensione del trattamento per aumento dei livelli di enzimi epatici nei portatori dell'allele T (van Ede et al., 2001);
- Alopecia nella popolazione Afro-Americana (Ranganathan et al., 2008);
- Tossicità generale (van Ede et al., 2001) (Taniguchi et al., 2007) (Urano et al., 2002).

Nel caso del polimorfismo MTHFR 1298 A>C sono stati riportati in due studi effetti collaterali associati alla presenza dell'allele A nei pazienti (Berkun et al., 2004) (Hughes et al., 2006), mentre altri due gruppi di studio non hanno trovato alcun tipo di associazione. In due studi è stata riscontrata associazione tra individui portatori dell'allele C e tossicità generale e gastrointestinale (Wessels et al., 2006) (Dervieux et al., 2006).

In riferimento agli studi di associazione relativi all'efficacia ad MTX, è emerso da tre studi che pazienti con genotipo CC per lo SNP MTHFR 677 C>T sono propensi ad ottenere una buona risposta in seguito alla cura, risposta intesa come diminuzione dello score d'attività della malattia.

1.8.3 Farmaci biologici (bDMARDs)

I farmaci biologici, o bDMARDs, sono farmaci di nuova generazione, creati attraverso le nuove biotecnologie a partire da proteine dell'organismo modificate in laboratorio; essi sono in grado di agire solamente su un'unica molecola target, riducendo gli effetti indesiderati che essa provoca.

Per i pazienti affetti da AR refrattari alle terapie con i cDMARDs, sono stati messi in commercio degli agenti biologici in grado di arrestare a diversi livelli la cascata di eventi patogenetici alla base della malattia. Tali farmaci possono avere un'azione anti-citochinica, cioè mirata a modulare l'effetto delle principali citochine che guidano la flogosi reumatoide, oppure anti-cellulare, cioè rivolta contro l'azione dei linfociti B e T.

Tra i più utilizzati si ritrovano gli inibitori del TNF- α (Etanercept, Infliximab e Adalimumab), Tocilizumab, Abatacept, Rituximab e Anakinra.

1.8.3.1 Inibitori del TNF- α

Il TNF- α (*Tumor Necrosis Factor α*) gioca un ruolo cruciale nella patogenesi dell'AR. Si tratta di una citochina pro-infiammatoria che dà inizio ad una serie di eventi che conducono alla sinovite ed al danno articolare e contemporaneamente stimola il rilascio di altre citochine e la produzione di determinati enzimi degradativi coinvolti nella distruzione tissutale.

Prima di impostare la terapia, occorre eseguire un esame fisico completo ed un'attenta valutazione del possibile rischio di infezioni, inclusa la tubercolosi.

Sono stati sviluppati tre farmaci in grado di neutralizzare il TNF- α :

- **Etanercept**: si tratta di una molecola costituita da due recettori umani solubili del TNF- α legati alla porzione Fc di una IgG umana. Grazie a diversi studi condotti è stato dimostrato che Etanercept produce importanti miglioramenti a tutti gli stadi della malattia, tra cui un rallentamento nella progressione del danno articolare (Moreland et al., 1999; Bathon et al., 2000);
- **Infliximab**: è anticorpo monoclonale chimerico (in parte umano ed in parte di topo) diretto contro il TNF- α ; riduce l'attività infiammatoria e migliora la qualità di vita del paziente (van der Heide et al., 1996), oltre che inibire, in combinazione col Methotrexate, la progressione radiografica nel 50% dei casi (Lipsky et al., 2000);
- **Adalimumab**: è un anticorpo IgG monoclonale umano anti-TNF α ; nei pazienti trattati con Adalimumab in associazione al Methotrexate o ai corticosteroidi è stata riscontrata una diminuita evoluzione radiografica dell'AR nonostante una riduzione dei dosaggi di Methotrexate e corticosteroidi (Weinblatt et al., 2006).

La farmacogenetica degli inibitori del TNF- α è ultimamente un importante oggetto di studio: è infatti stato scoperto che la risposta al trattamento dell'AR con questa tipologia di farmaci è influenzata dalla presenza di polimorfismi in alcuni geni, tra cui HLA-DRB1. In particolare, da una ricerca eseguita su pazienti in cura con Etanercept è emerso che coloro che possiedono due copie dello SE hanno risposto positivamente alla dose standard del farmaco, rispetto a coloro che hanno ereditato una sola o addirittura nessuna copia dell'epitopo (Criswell et al., 2004).

1.8.3.2 Tocilizumab

Tocilizumab è un anticorpo monoclonale diretto contro il recettore dell'IL-6 (IL-6R). L'anticorpo è in grado di inattivare sia la forma legata alla membrana cellulare sia la forma solubile del recettore, bloccando gli effetti pro-infiammatori della citochina IL-6 (Curtis et al., 2014).

1.8.3.3 Abatacept

Abatacept è una proteina di fusione ricombinante costituita dal frammento Fc di una IgG1 legato al dominio extracellulare della molecola CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4*), anche conosciuta come CD152 (*Cluster of Differentiation 152*), che si trova sulla superficie dei linfociti T. Si tratta di un modulatore selettivo della costimolazione in quanto inibisce la costimolazione e quindi l'attivazione delle cellule T interrompendo il pathway CD28:CD80/86.

L'efficacia di Abatacept è stata testata in diversi trial clinici che hanno mostrato miglioramenti di segni e sintomi, rallentamento della progressione radiografica e diminuzione del dolore con aumento della funzionalità articolare (Kremer et al., 2005).

1.8.3.4 Rituximab

Rituximab è un anticorpo monoclonale chimerico diretto contro uno specifico marker presente sui linfociti B maturi (CD20). L'inibizione delle cellule B comporta miglioramenti nei soggetti affetti da AR poiché tali cellule giocano un ruolo fondamentale nella reazione infiammatoria e dunque nella patogenesi della malattia.

Gli effetti benefici del farmaco sono stati testati in diversi studi che hanno dimostrato come la deplezione di cellule B abbia favorito l'attenuazione dei sintomi (Edwards et al., 2004).

1.8.3.5 Anakinra

Anakinra è un antagonista ricombinante del recettore dell'IL-1 (IL-1ra), simile alla medesima molecola naturale rilasciata dalle cellule mononucleate nei siti di flogosi con azione antinfiammatoria.

L'IL-1 è una citochina pro-infiammatoria che svolge un ruolo chiave durante i processi flogistici; in particolare, nei pazienti affetti da AR provoca gravi danni ai tessuti ossei e cartilaginei e compromette la funzionalità articolare durante l'evoluzione della malattia.

Gli effetti benefici di Anakinra, che quindi inibisce l'attività di IL-1, sono stati rivelati durante un trial clinico che ha mostrato come molti pazienti con AR trattati con Anakinra in combinazione con Methotrexate avessero raggiunto importanti miglioramenti (46%) rispetto ai pazienti trattati con un placebo (19%) (Cohen et al., 2002).

2

Scopo della Tesi

L'Artrite Reumatoide è una patologia infiammatoria sistemica autoimmune, prevalentemente caratterizzata da coinvolgimento articolare e da andamento generalmente cronico-progressivo. L'eziologia è sconosciuta, ma numerosi studi evidenziano la concomitante partecipazione di fattori di rischio genetici ed ambientali allo sviluppo della patologia, definendola come malattia multifattoriale. La natura della componente genetica non è ancora ben definita, ma il maggior contributo in termini di rischio risulta fornito dal locus HLA, che rappresenta il 50-60% di tutta la suscettibilità genetica (nello specifico, HLA-DRB1).

A causa dell'aspetto fortemente invalidante della patologia, associato spesso a una prognosi sfavorevole, le terapie utilizzate, al fine di attenuare i sintomi e rallentare il decorso, risultano spesso aggressive.

Recenti studi di associazione "*Genome-wide*" hanno permesso d'identificare numerose varianti genetiche associate a suscettibilità di sviluppare AR ed alla risposta alle principali terapie impiegate nel trattamento della patologia, ma nel contempo hanno evidenziato importanti differenze tra popolazioni.

L'identificazione di marcatori genetici per l'AR potrebbe fornire importanti indicazioni per sviluppare forme di medicina personalizzata definite sulla base del profilo genetico del paziente. In particolare, la possibilità di effettuare una previsione, su base genotipica, dell'efficacia o della tossicità alle terapie farmacologiche utilizzate, potrebbe consentire di indirizzare i pazienti che non rispondono al trattamento, o che presentano effetti collaterali, verso cure alternative, arrestando la progressione della malattia durante il periodo di cura.

L'obiettivo di questa ricerca sperimentale è l'identificazione di varianti polimorfiche associate a rischio di occorrenza di AR nella popolazione Italiana, nonché di varianti predittive della risposta ai trattamenti farmacologici convenzionali e di ultima generazione utilizzati nella cura dell'AR.

3

Materiali e metodi

3.1 Raccolta della casistica

La casistica si compone di 322 soggetti (il 98% dei pazienti di origine Italiana) affetti da Artrite Reumatoide ed in cura presso l'Unità Operativa di Reumatologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Sant'Anna di Ferrara dal Luglio 2002 al periodo attuale, e di 438 controlli sani .

Ogni campione biologico ottenuto dai soggetti partecipanti allo studio è stato trattato in forma anonima ed identificato con un codice.

Da ogni soggetto incluso nello studio sono stati raccolti dati clinici e prelevati 2-5 ml di sangue periferico. Dopo aver assegnato il codice identificativo, i dati anagrafici sono stati disgiunti dal campione biologico e questo è stato trasferito al laboratorio di Genetica Molecolare della Sezione di Genetica Medica del Dipartimento di Scienze Biomediche e Chirurgico Specialistiche dell'Università di Ferrara. Analogamente, anche i dati clinici sono stati resi disgiunti da quelli anagrafici e la loro elaborazione è stata condotta in forma assolutamente anonima.

Sulla base dei risultati genotipici non è pertanto possibile risalire all'identificazione dei soggetti partecipanti allo studio.

3.2 Estrazione e preparazione del DNA genomico

3.2.1 Estrazione da 1,5 ml di sangue periferico

Il DNA genomico è stato estratto da sangue periferico. Il campione di sangue prelevato è stato conservato a 4°C per 1-2 ore durante il trasporto al laboratorio.

Il sangue è stato poi trasferito in un tubo conico in polipropilene da 15 ml e l'estrazione del DNA genomico è stata eseguita impiegando il sistema *Nucleon BACCI* (Amersham Biosciences), seguendo una semplificazione del protocollo indicato dal produttore.

La lisi cellulare si è ottenuta aggiungendo al sangue 4,5 ml di Reagente A ed incubando a temperatura ambiente in rotazione costante per 5 minuti.

Reagente A	
10 mM	Tris-HCl
320 mM	Saccarosio
5 mM	MgCl ₂
1%	Triton-X 100
- Aggiustare il pH a 8.0 con NaOH 10N	
- Autoclavare e conservare a temperatura ambiente	

Il tubo è stato poi centrifugato a 3000 rpm per 5 minuti a temperatura ambiente e quindi è stato scartato il surnatante, facendo attenzione a non rimuovere il pellet depositato in fondo al tubo. Questo è stato risospeso in 340 µl di Reagente B, agitando moderatamente su vortex fino a completa dissoluzione.

Reagente B	
400 mM	Tris-HCl pH 8.0 con 4% di NaOH
60 mM	EDTA
150 mM	NaCl
- Autoclavare ed aggiungere 1% di SDS filtrato	
- Conservare a temperatura ambiente	

La soluzione ottenuta è stata trasferita in un tubo in polipropilene da 1,5 ml e sono stati aggiunti 100 µl di perclorato di sodio 5M; il tutto è stato incubato agitando in rotazione a temperatura ambiente per 5 minuti.

Perclorato di sodio 5M	
7,023 g	NaClO ₄
10 ml	H ₂ O sterile
Conservare a temperatura ambiente	

Il tubo è stato quindi trasferito in bagnomaria termostato a 65°C per 5 minuti.

Per ottenere l'estrazione del DNA sono stati aggiunti 580 µl di cloroformio freddo (-20°C) ed il tutto è stato incubato in rotazione a temperatura ambiente per 15 minuti.

Al termine, l'emulsione è stata condotta a stratificazione mediante centrifugazione a 3000 rpm per 1 minuto.

A questo punto è stata raccolta la fase superiore facendo attenzione a non toccare l'interfaccia. La soluzione acquosa (circa 250 µl) è stata trasferita in un tubo da 1,5 ml e sono stati aggiunti 880 µl di etanolo assoluto freddo (-20°C), così da ottenere la precipitazione del DNA. Dopo 1 minuto in blanda agitazione il tubo è stato centrifugato a 13000 rpm per 3 minuti. Scartato il surnatante, il pellet è stato sottoposto a due lavaggi in etanolo freddo (-20°C) e ad una centrifugazione a 13000 rpm per 3 minuti.

Con una pipetta Pasteur collegata ad una pompa a vuoto è stata aspirata la fase liquida, avendo cura di rimuovere completamente il liquido di lavaggio rimasto sulla parete della provetta per eliminare ogni residuo di etanolo, il pellet è così stato liofilizzato. Infine il DNA è stato risospeso in 300 µl di acqua bidistillata.

3.2.2 Estrazione da 400 µl di sangue periferico

È stato utilizzato un kit di estrazione di DNA genomico che permette la purificazione dell'acido nucleico da piccoli volumi di sangue intero periferico (*QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit*, QIAGEN).

Questo metodo prevede l'impiego di specifiche colonne contenenti una membrana di gel di silice a scambio ionico che trattiene il DNA, evitando così sia l'uso di reagenti come il fenolo ed il cloroformio, sia l'estrazione tramite precipitazione alcolica. Si tratta di una metodica rapida e di facile applicazione che permette di ottenere una quantità media di circa 6 µg di DNA totale.

I reagenti contenuti nel kit sono conservati a temperatura ambiente, fatta eccezione per la Proteinasi K, conservata a 2-8°C.

Un volume di 400 µl di sangue è stato trasferito in una provetta da 1,5 ml contenente 40 µl di Proteinasi K (20 mg/ml) e quindi sono stati aggiunti 400 µl di tampone AL fornito dal kit. Si è provveduto immediatamente a mescolare mediante vortex per almeno 15 secondi allo scopo di assicurare una sospensione omogenea del campione ed una lisi efficiente.

La soluzione è stata trasferita in bagnomaria, incubata a 56°C per 10 minuti e centrifugata brevemente in microcentrifuga allo scopo di rimuovere le gocce adese alle pareti interne della provetta e dal tappo.

Sono stati aggiunti 400 µl di etanolo 100%, conservato a -20°C, ed il tutto è stato nuovamente mescolato con vortex per 15 secondi. Dopo una breve centrifugazione, i primi 700 µl del campione sono stati trasferiti nella rispettiva colonna (*QIAamp[®] spin column*), collocata nell'apposito tubo di raccolta da 2 ml; il tutto è stato centrifugato a 8000 rpm per 1 minuto. Dopo aver scartato il filtrato raccolto, si è ripetuta la procedura per il restante volume di campione.

Sono stati poi effettuati due lavaggi con 500 µl rispettivamente di tampone AW1 e AW2, forniti dal kit, mediante centrifugazione a 8000 rpm per 1 minuto ciascuno.

Ad ogni passaggio il filtrato è stato eliminato e, allo scopo di togliere l'eccesso di tampone, le colonne sono state ulteriormente centrifugate a 13000 rpm per 3 minuti.

A questo punto ogni colonna è stata trasferita in una nuova provetta da 1,5 ml ed il DNA trattenuto dalla membrana è stato eluito con 200 µl di acqua distillata dopo una breve incubazione di 5 minuti a temperatura ambiente ed una centrifugazione a 8000 rpm per 1 minuto. Quest'ultimo passaggio è stato ripetuto per ottenere una seconda aliquota di DNA.

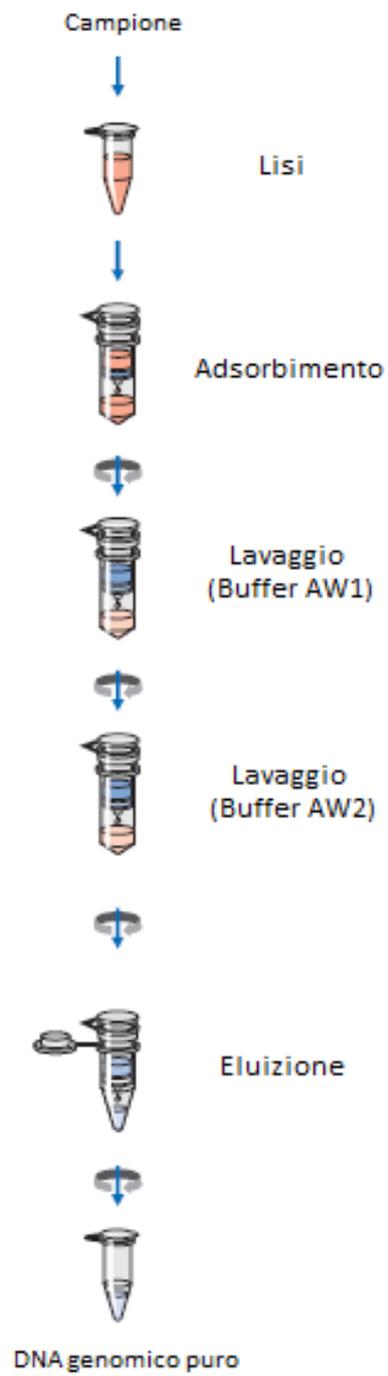


Figura 17: Schema della metodica di estrazione con QIAamp® DNA Blood Mini Kit

3.2.3 Titolazione ed allestimento delle aliquote di DNA genomico

Il DNA genomico estratto è stato ottenuto in soluzione acquosa. Per conoscerne la concentrazione è stato utilizzato lo strumento *Qubit® 2.0 Fluorometer* della Invitrogen (fig. 3.2.2), in grado di quantificare gli acidi nucleici mediante fluorimetria, una tecnica più sensibile ed accurata rispetto alla spettrofotometria.

Prima è stata preparata la Working Solution (WS) costituita da fluoroforo e buffer forniti dal kit dello strumento; il rapporto deve essere di 1:200, quindi per ogni μl di fluoroforo devono essere aggiunti 199 μl di buffer. Tali quantità vanno moltiplicate per il numero di campioni da titolare.



Figura 18: *Qubit® 2.0 Fluorometer*.

Per ogni campione, sono stati trasferiti 198 μl di WS in un apposito tubo da 500 μl fornito dal kit e vi sono stati aggiunti 2 μl della soluzione acquosa contenente il DNA. Si è proceduto mescolando bene con vortex e lasciando riposare al riparo dalla luce per circa 2 minuti prima di procedere alla lettura con *Qubit®*.

Lo strumento, prima dell'uso, è stato tarato tramite la lettura di due soluzioni standard fornite dal kit; grazie ai due valori estremi ottenuti, il fluorimetro costruisce automaticamente una retta di taratura grazie alla quale verranno quantificati i campioni di interesse.

È possibile impostare lo strumento in modo che fornisca valori di concentrazione espressi nell'unità di misura voluta e che calcoli automaticamente la concentrazione di DNA dello stock madre conoscendo il volume totale.

Il DNA estratto è stato conservato in vials da 1,5 ml a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Le vials sono state organizzate all'interno di scatole da DNA Bank e nominate con una sigla alfa-numerica (ad es. R001).

Le vials sono state poi etichettate e su ognuna di esse sono stati riportati:

- una sigla alfa-numerica composta dalla lettera R e seguita da un numero progressivo;
- il tipo di estrazione: L (Large) = estrazione da 1,2,3 ml di sangue; M (Medium) = estrazione da 200 o 400 μl di sangue;
- data di estrazione;
- concentrazione espressa in $\text{ng}/\mu\text{l}$ preceduta dalla lettera A (prima aliquota) o B (seconda aliquota).

3.3 Genotipizzazione

3.3.1 Real-Time PCR

La PCR Real-Time è la tecnologia per PCR più sviluppata negli ultimi anni che permette la visione e la quantizzazione del prodotto generato durante ogni ciclo del processo di PCR. Questa tecnica è possibile grazie alla presenza di colorazioni fluorescenti che intercalano il DNA a doppio filamento o di oligonucleotidi-sonda coniugati con fluorocromi disegnati per ibridarsi alla sequenza target di interesse. In questo secondo caso il distaccamento della sonda durante la reazione di amplificazione, a causa dell'attività 5'-nucleasica della DNA polimerasi, fa sì che essa dia luminescenza. La fluorescenza è direttamente proporzionale alla quantità di prodotto di PCR presente in provetta, per questo essa viene misurata ad ogni ciclo di reazione. Più alto è il numero iniziale della copia dell'acido nucleico target, più rapidamente si osserva un aumento significativo nella fluorescenza sopra il valore basale. Il calcolo della quantità di DNA dei campioni incogniti viene effettuata determinando il ciclo della PCR (ciclo soglia, Ct) in cui viene raggiunto il valore soglia di fluorescenza del *reporter* e dove cioè i segnali di amplificazione specifici sono separabili da quelli del rumore di fondo del sistema.

La Real-Time PCR con sonda *TaqMan*[®] è uno dei primi metodi introdotti ed è largamente applicato sia per la quantificazione del DNA, sia per l'analisi di varianti. Il protocollo prevede che l'attività 5'-endonucleasica della DNA Taq Polimerasi distacchi un oligonucleotide-sonda durante la PCR. Le sonde *TaqMan*[®] sono oligonucleotidi di circa 20-30 bp, con un valore di T_m (temperatura di melting) aumentato di circa 10°C, che contengono solitamente un fluorocromo fluorescente con funzione di *reporter* sulla base in 5' (FAM, VIC) ed un fluorocromo con funzione di *quencher* (solitamente TAMRA) in 3'.

Questi oligonucleotidi non sono estendibili in quanto modificati chimicamente all'estremità 3'. Una volta irradiato, il fluorocromo eccitato trasferisce l'energia alla molecola *quencher* vicina. La vicinanza del *quencher* al *reporter* impedisce l'emissione di tutta la fluorescenza mentre la sonda è intatta. Quando la sonda viene distaccata dalla sequenza target ad opera della DNA polimerasi, fluoroforo e *quencher* vengono separati, il *quencher* non riesce più ad attuare la sua azione inibitoria ed il fluoroforo è libero di dare fluorescenza. Un requisito specifico delle sonde fluorogeniche è che non ci sia una guanina all'estremità 5'. La presenza di una G adiacente al fluorocromo estingue, infatti, la fluorescenza. La fluorescenza è direttamente proporzionale al numero di sonde attaccate alla sequenza target e, quindi, alla quantità di ampliconi all'interno della provetta di reazione. Man mano che la reazione procede ed il numero di ampliconi aumenta, aumenta anche la fluorescenza, fino al raggiungimento della fase di *plateau*.

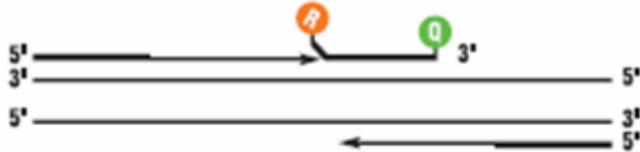
Gli strumenti per Real-Time PCR, oltre a fungere da termociclatori, eccitano, con un laser a ioni Argon o con lampade al Tungsteno, i fluorocromi legati all'oligonucleotide e convogliano quindi la fluorescenza emessa in risposta, lungo fibre ottiche fino ad uno spettrografo che provvede a separare le componenti del *reporter* e del *quencher*. Appositi software acquisiscono lo spettro di emissione di ogni singolo campione per tutta la durata della PCR e convertono la variazione di fluorescenza del *reporter* in una rappresentazione in tempo reale della cinetica di amplificazione. Il vantaggio, in termini di precisione e di intervallo di quantificazione rispetto alle PCR tradizionali, è dovuto alla possibilità di quantificare il DNA al ciclo soglia, che è sempre calcolato nella fase esponenziale della reazione di PCR, fase in cui i reagenti sono ancora lontani dall'esaurimento e gli elementi di variabilità sono così ridotti al minimo.

Gli strumenti per Real-Time PCR sono collegati ad un computer dal quale è possibile selezionare i programmi e regolare i parametri di analisi desiderati; la visualizzazione dei risultati durante l'esperimento e l'output finale sono di conseguenza disponibili in file generati dall'apposito software di dialogo.

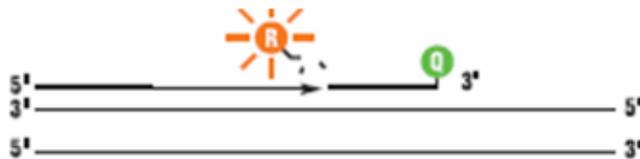
Il reporter (R) fluorescente ed il quencher (Q) sono legati rispettivamente alle estremità 5' e 3' della una sonda TaqMan.



Quando la sonda è intatta, la fluorescenza del reporter viene inibita dal quencher.



Durante ogni ciclo di estensione, la DNA polimerasi provoca il distacco del reporter dalla sonda.



Una volta separato dal quencher, il reporter emette la caratteristica fluorescenza.



Figura 19: Schema delle fasi di una tipica reazione di PCR Real-Time con sonda TaqMan®.

rs6910071 chr6:32282854 (GRCh37/hg19) SNV A>G

Variante intronica interna al gene **C6orf10**, localizzata 263 Kb a monte di HLA-DRB1

```
CTGGATTAAGTGAGATGCTTTGACAACCTCTAGATGTGAATTCTTGCATGA
AGAGGTTGGCTGGAGCTGGGCAGCAGCTACCTTCTTCAGACTATGCGTGT
CCTCCCAGTTTAAACACAGTTCCCAGGAGACTCACCTCAACTCGCTCATT
ACTGACCTGCCCTGGGCTCTTTTGGCATCTGCGTTTTTAACCCTTGACAGGA
ACTTTGGGTTTTAATATTAATGTGATTTAATTTTCAGGATGAGGAATCTCA
GCTGATATTGGGTTTGCTTAAATCATTGTAACTGAGATATGAGAACCAG
ATTTGCATTTTGGAAAACCTAGGACACAGTGTGAAAGGTGCTTTCACGAAT
TCTATATTAAATATCATCATGGTCAACGCTTGATCTGGTTTAAAAAATGA
GTCACTGTTGGTATGTGTTACCTTGGAAAGTTGGGTTTAGAACTAAAATAA
TGGGGCTGGGCGTGGTGGTTCACACCTGTAAACCCAGCACCTTTGGGAGGC
```

Sequenza nucleotidica di 500 bp (chr6:32282605-32283104) comprendente lo SNV rs6910071 nella regione cromosomica 6p21.32. In azzurro è evidenziato il sito di SNV di interesse, in rosso sono evidenziati altri siti di SNV con frequenza $\geq 1\%$, in giallo le sequenze ripetute.

Frequenze alleliche di rs6910071: A = 88.546% G = 11.454%

rs660895 chr6:32577380 (GRCh37/hg19) SNV A>G

Variante intergenica localizzata 30,8 Kb a valle di HLA-DRB1

```
ATGAACCTTAAAAATTAAAGATTGGAGCTATGTGTATGAGATAGTAACAC
TCATTA AAAAGGGCAAGTTTGGTTAATTAAGACAGTAGGAGGCGTAGAG
AAAATATAATGAAACGATATGTAAGGGAAAACGAAGGATGAAAGATGCAGG
CAGGGAGAGGAGTACTGTCTGATGGGAGTGAAGATTCTTCTTCAGGAAT
GGAAGGGGATGCACAGAGTGAAGCCACCCACAAAACAAAGACTTGTATA
GCTATAGATGGAAGGGAATCAACCAGGAAATTATTTTGAAATCCCAGT
GTAGTTACAAGTCTAGGAAGTAATAGTTAGAATGAAAGAGTTTGTATTTAC
TGAGCACTAATATTCTCATAATCATGCTAGGAAATATCACTTGATAAAGA
TAGAAAGATGAGTCGTTTAAAGAAGGAATACATGTCTCTTTTCAGAGGCAG
TACCCGCAGGCAGTCTCAAACCCAGAATCTGCCTCATCAGTCTCAGTTC
```

Sequenza nucleotidica di 500 bp (chr6:32577131-32577630) comprendente lo SNV rs660895 nella regione cromosomica 6p21.32. In azzurro è evidenziato il sito di SNV di interesse, in rosso sono evidenziati altri siti di SNV con frequenza $\geq 1\%$.

Frequenze alleliche di rs660895: A: 80.046% G: 19.954%

Lo studio di discriminazione allelica è stato effettuato mediante l'impiego di due diverse sonde (VIC e FAM) di tipo MGB (*Minor Groove Binder*) *TaqMan*[®] in Real-Time PCR (*Applied Biosystems*[®]).

Le sonde specifiche per i due SNVs sono state disegnate ed ordinate presso la ditta *Life Technologies*.

La procedura di Real-Time PCR prevede l'impiego di una Master Mix (MMx), contenente la DNA Taq Polimerasi, il buffer ed i dNTPs, alla quale viene aggiunta la *TaqMan*[®] probe, contenente i primers di amplificazione e le sonde *TaqMan*[®] allele-specifiche. Il DNA genomico oggetto di indagine è stato utilizzato alla concentrazione di 10 ng/ μ l.

Protocollo per Real-Time PCR		
Master Mix 2X	4 µl	Reazione totale da 8 µl
TaqMan Probe 40X	0,1 µl	
DNA (10 ng/µl)	3,9 µl	

Dopo aver preparato la mix sono stati dispensati 4,1 µl di mix e 3.9 µl di DNA in ogni pozzetto e, una volta completata la piastra, questa è stata sigillata con film ottico e centrifugata per 30 secondi a 1000 rpm, allo scopo di eliminare eventuali bolle che potrebbero alterare la lettura.

La piastra è stata quindi inserita in un termociclatore *GeneAmp PCR System 2700* (Applied Biosystems®).

Il programma *Real-Time 01* (fig. 3.3.3) prevede 2 minuti a 50°C e 10 minuti a 95°C, seguiti da 55 cicli di amplificazione (1 ciclo = 92°C per 15 secondi + 60°C per 1 minuto) ed un passaggio di 30 minuti a 22,2°C.

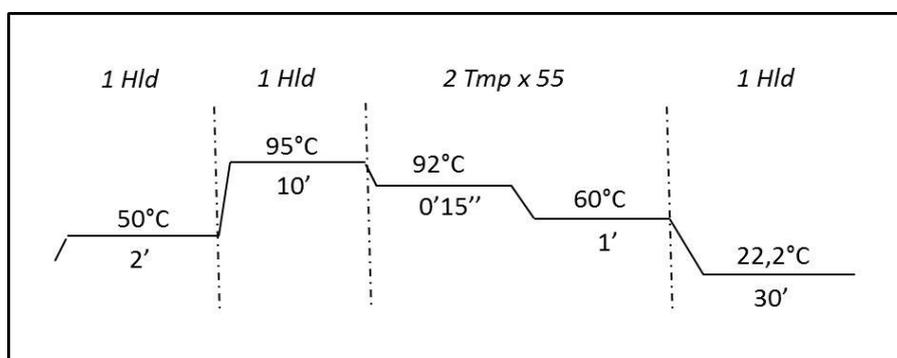


Figura 20 Eteroterma del programma Real-Time 01.

Una volta terminata la reazione, i risultati di discriminazione allelica sono stati ottenuti mediante lettura ottica con strumento *Applied Biosystems® 7300 fast*.

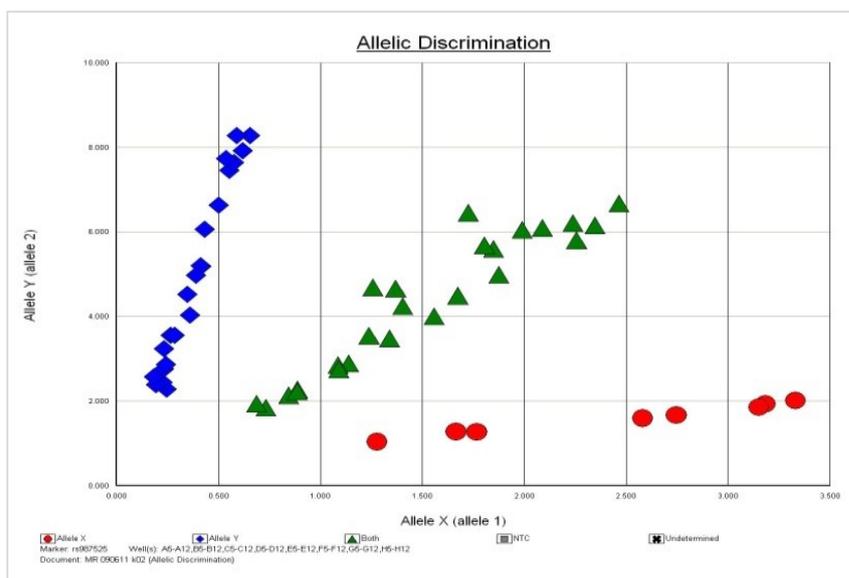


Figura 21: Esempio di lettura ottica dei risultati dopo una reazione di Real-Time PCR. Ogni simbolo del grafico rappresenta un campione di DNA; i campioni in rosso evidenziano elevata fluorescenza per una sonda (FAM) invece che per l'altra, sono quindi da considerarsi omozigoti per l'allele specifico di quella sonda; viceversa i campioni in blu (VIC); i campioni in verde hanno pari emissioni di fluorescenza per i due fluorofori e sono quindi da considerarsi eterozigoti.

3.3.2 Genotipizzazione di ins/del VNTR

3.3.2.1 PCR (Polymerase Chain Reaction)

La PCR è una tecnica di biologia molecolare che consente l'amplificazione di frammenti di acidi nucleici di cui si conoscono le sequenze nucleotidiche iniziali e terminali. La tecnica consente, quindi, di ottenere una grande quantità di materiale genetico per le successive applicazioni. Per poter ottenere l'amplificazione delle sequenze di DNA d'interesse è necessario utilizzare dei primer, posizionati alle estremità della sequenza che deve essere amplificata. I primers sono necessari per l'attività dell'enzima DNA polimerasi che crea una neo-elica di DNA aggiungendo un nucleotide alla volta, secondo la complementarietà all'elica stampo, a partire da un'estremità 3'-OH libera.

La reazione si compone principalmente di 3 fasi:

- Denaturazione: separazione delle due eliche stampo mediante alte temperature (94-99°C);
- Annealing: legame dei primers alle due eliche stampo ad una temperatura più bassa rispetto alla denaturazione (30-65°C). Viene detta temperatura di melting (T_m);
- Estensione: sintesi delle neo-eliche ad opera della polimerasi alla temperatura ottimale d'azione dell'enzima (65-72°C)

Queste 3 fasi compongono un ciclo di reazione e la PCR prevede un susseguirsi di cicli a catena in modo tale da amplificare esponenzialmente la sequenza d'interesse.

L'analisi della variante genica CBS: c.844_845ins68 è stata eseguita mediante amplificazione per PCR, impiegando i primer 844R e 844F e diretta risoluzione degli ampliconi su gel di poliacrilammide.

La genotipizzazione della variante DHFRc.86+59_77delACCTGGGCGGGACGCGCCA, che in seguito verrà indicata con DHFR del19bp, è stata condotta mediante PCR con i primers DHFR A e DHFR B. Per l'amplificazione di TYMS del1494_1499TTCTGC, che in seguito verrà indicata con TYMS del6bp, sono stati utilizzati i primer C/D, mentre per TYMS c.1-41_14(2_4), che in seguito verrà indicata con TYMS 28bp repeat, i primer TYMS E/F. Infine per l'amplificazione di HLA-G 14bp ins, sono stati utilizzati i primers HLA-G A/B

Tabella 2: Primer impiegati nella reazione di PCR per CBS, TYMS e DHFR. In tabella sono indicate la lunghezza in nucleotidi (lung.), la temperatura di fusione (T_m) e le dimensioni in bp del segmento amplificato generato (ampliconi).

Primer	Lunghezza	T_m	ampliconi
CBS 844R	17	74	184/252
CBS 844F	18	72	
TYMS C	20	67	148/142
TYMS D	20	61	
TYMS E	30	103	243/215
TYMS F	20	81	
DHFR A	20	71	223/204
DHFR B	20	71	
HLA-G A	23	72	210/224
HLA-G B	22	72	

3.3.2.2 Reazione di PCR

La reazione di PCR è stata allestita in piastre da 96 wells. I vari campioni di DNA (10ng/μl) sono stati scaldati a 65°C per 10 minuti prima di essere impiegati per la reazione che è avvenuta in 15 μl (10μl Mix di PCR + 5μ DNA).

Sono state preparate due differenti mix di PCR a seconda della variante genica da analizzare.

Mix di PCR per CBS: c.844_845ins68, TYMS del6bp e HLA-G14bp	
ddH ₂ O	7,20μl
Buffer 10x	1,50μl
MgCl ₂ 50mM	0,45μl
MgCl ₂ 50mM	0,25μl
primer 5' (100 ng/μl)	0,25μl
primer 3' (100 ng/μl)	0,25μl
Taq Polimerasi (Invitrogen)	0,10μl
Tot.10μl	

Mix di PCR per DHFR del19bp, TYMS 28 bp repeat	
ddH ₂ O	5,70μl
DMSO	1,50μl
Buffer 10x	1,50μl
MgCl ₂ 50mM	0,45μl
dNTPs 2.5mM	0,25μl
primer 5' (100 ng/μl)	0,25μl
primer 3'(100 ng/μl)	0,25μl
Taq Polimerasi (Invitrogen)	0,10μl
Tot.10μl	

Ad ogni wells della piastra sono stati aggiunti con pipetta multipla 10µl di Mix di PCR e, successivamente, sono stati distribuiti 5µl di DNA specifico per ogni campione. Le reazioni di amplificazione sono state effettuate utilizzando il termociclatore GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems). Sono stati eseguiti programmi di PCR specifici per i vari marcatori, seguendo diverse eteroterme.

● **PCR01 (94/64-63-62x1-10-25) per TYMS del6bp, DHFR del19bp e HLA-G ins14bp**

3 Tmp x 1			3 Tmp x 10			3 Tmp x 25			2 Holds	
94.0°	64.0°	72.0°	94.0°	63.0°	72.0°	94.0°	62.0°	72.0°	72.0°	4.0°
2:10	0:30	0:30	0:15	0:30	0:30	0:15	0:50	0:30	2:00	∞

● **PCR02 (94/62-60-58x1-10-25) per CBS: c.844_845ins68**

3 Tmp x 1			3 Tmp x 10			3 Tmp x 25			2 Holds	
94.0°	64.0°	72.0°	94.0°	63.0°	72.0°	94.0°	62.0°	72.0°	72.0°	4.0°
2:10	0:30	0:30	0:15	0:30	0:30	0:15	0:50	0:30	2:00	∞

● **PCR05B (98/62-61-60x1-10-30) per TYMS 28bp repeat**

3 Tmp x 1			3 Tmp x 10			3 Tmp x 25			2 Holds	
94.0°	64.0°	72.0°	94.0°	63.0°	72.0°	94.0°	62.0°	72.0°	72.0°	4.0°
2:10	0:30	0:30	0:15	0:30	0:30	0:15	0:50	0:30	2:00	∞

3.3.2.3 Elettroforesi su gel di poliacrilammide

Al fine di ottenere una migliore risoluzione delle bande elettroforetiche anche in condizioni di scarsa concentrazione dei prodotti di amplificazione, gli amplificati di TYMS del6bp, TYMS 28bp repeat e di DHFR del19bp sono stati risolti mediante corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide ("PolyAcrylamide Gel Electrophoresis", PAGE).

Il PAGE è stato eseguito impiegando il sistema Mini Protean III (Bio-Rad). Dopo aver lavato accuratamente i vetrini e dopo averli assemblati, sono stati posti su un supporto di sostegno. Quindi è stata preparata una soluzione di 10ml di bis-acrilammide in tampone 0,6xTBE.

I reagenti ammonio persolfato (APS) e N,N,N',N'-Tetra-Metilene-Diammina (N,N,N',N'-tetra-methylene-diammine, TEMED), rispettivamente iniziatore ed acceleratore della reazione di polimerizzazione, sono stati aggiunti per ultimi, andando così a modificare di soli 62,5µl il volume finale della soluzione del gel (10ml). La reazione di polimerizzazione è avvenuta in circa 30 minuti. Dopo rimozione del pettine, il gel è stato immerso nel tampone di corsa TBE 0,6X.

Gel di poliacrilammide 8% (10ml)	
ddH ₂ O	5,35ml
TBE 5X	2,00ml
acrilammide-bisacrilammide 30%	2,65ml
ammonio persolfato 10%	50,00µl
TEMED	12,50µl

TBE 5X (1000ml)	
tris base (500mM)	54,0g
acido borico (415mM)	27,5g
EDTA pH 8.01 (5mM)	20,0ml

Prima del caricamento nei pozzetti del gel, 3µl di ogni campione di DNA in esame sono stati miscelati 1:1 con il tampone di caricamento (DNA Loading Buffer 6X).

In ogni primo pozzetto del gel è stato caricato 1µl di marcatore di peso molecolare (marcatore VIII). Per tutti gli amplificati la risoluzione è avvenuta su gel di poliacrilammide all'8%. La corsa elettroforetica è stata condotta in verticale applicando una corrente di 160 Volt (V) per 90 minuti.

DNA LB 6X (10ml)	
glicerolo 30% in TBE 1X	10ml
Xilene Cianolo (0.25%)	25mg

3.3.2.4 Colorazione argentica

I gel sono stati colorati seguendo il protocollo della colorazione argentica, che prevede l'utilizzo delle seguenti soluzioni:

Soluzione A	
Etanolo	10%
Acido acetico	0.5%
Per 1 litro di soluzione	

Soluzione B	
AgNO ₃	0.1%
Per 1 litro di soluzione	

Soluzione C	
NaOH	1.5%
Formamide 37%	0.15%
NaBH ₄	0.01%
Per 300ml di soluzione	

Soluzione D	
Na ₂ CO ₃	7.5%
Soluzione 10X da diluire 1X all'uso	

La colorazione è stata eseguita con il seguente protocollo per ogni gel:

- Incubazione di 3 minuti per 2 volte in soluzione A
- Incubazione di 11 minuti in soluzione B in lieve agitazione orizzontale
- 2 lavaggi in acqua
- Incubazione in soluzione C, fino alla comparsa delle bande sul gel
- Blocco della colorazione mediante incubazione del gel in soluzione D

3.3.3 Genotipizzazione di SNPs mediante PCR-RFLP

L'analisi delle varianti geniche MTHFR: c.677C>T, MTHFR: c.1298A>C, MTR: c.2756A>G, MTRR: c.66A>G, MTHFD1: c.1958G>A, MTHFS: c.604A>G, SLC19A1: c.80G>A, TCN2: c.776C>G è stata eseguita applicando la tecnica PCR-RFLP seguita da risoluzione su PAGE e colorazione argentica.

3.3.3.1 Amplificazione con PCR

La reazione di PCR è stata condotta utilizzando le coppie di primer illustrate in *Tab.3*, specifiche per i vari marcatori da analizzare.

Tabella 3: Primer impiegati nella reazione di PCR per le varianti sopra indicate. In tabella sono indicate la lunghezza in nucleotidi (lung.), la temperatura di fusione (Tm) e le dimensioni in bp del segmento amplificato generato (ampliconi).

Primer	Lunghezza	Tm	Amplicone
MTHFR 677A	24	76	257/218
MTHFR 677B	22	75	
MTHFR 1298F	25	75	538
MTHFR 1298E	22	75	
MTR 2756F	26	67	189/159
MTR 2756R	24	63	
MTRR E	23	80	144/120
MTRR G	25	79	
MTHFD1 C	24	74	204/179
MTHFD1 Y	25	85	
MTHFS MDA	21	74	240/214
MTHFS MXA	26	73	
RFC1 F	20	76	231
RFC R	18	69	
TCN 2 F	21	70	261/167
TCN2 B	19	70	

La reazione di PCR è stata allestita in piastre da 96 wells. I vari campioni di DNA (10ng/μl) sono stati scaldati a 65°C per 10 minuti prima di essere impiegati per la reazione che è avvenuta in 15 μl (10μl di PCR-mix + 5μl di DNA).

Sono state preparate differenti mix di PCR a seconda della variante genica da analizzare.

Mix di PCR per MTHFR: c.677C>T, MTR: c.2756A>G, MTRR: c.66A>G, MTHFD1: c.1958G>A, MTHFS: c.604A>G, TCN2: c.776C>G, SLC19A1: c.80G>A	
ddH ₂ O	7,20µl
Buffer 10X	1,50µl
MgCl ₂ 50mM	0,45µl
dNTPs 2.5mM	0,25µl
primer 5' (100 ng/µl)	0,25µl
primer 3' (100 ng/µl)	0,25µl
Taq Polimerasi (Invitrogen)	0,10µl
Tot. 10µl	

Mix di PCR per MTHFR: c.1298A>C	
ddH ₂ O	5,70µl
DMSO	1,50µl
Buffer 10X	1,50µl
MgCl 50mM	0,45µl
dNTPs 2.5mM	0,25µl
primer 5' (100 ng/µl)	0,25µl
primer 3'(100 ng/µl)	0,25µl
Taq Polimerasi (Invitrogen)	0,10µl
Tot. 10µl	

Ad ogni wells della piastra sono stati aggiunti 10µl di PCR-mix con pipetta multipla e, successivamente, sono stati distribuiti 5µl di DNA specifico per ogni campione.

Le reazioni di amplificazione sono state effettuate utilizzando il termociclatore GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems), seguendo diverse eteroterme.

- **PCR01** (94/64-63-62x1-10-25) per **MTHFR: c.677C>T**, **MTHFR: c.1298A>C**, **MTR: c.2756A>G**, **SLC19A1: c.80G>A**, **TCN2: c.776C>G**

3 Tmp x 1			3 Tmp x 10			3 Tmp x 25			2 Holds	
94.0°	64.0°	72.0°	94.0°	63.0°	72.0°	94.0°	62.0°	72.0°	72.0°	4.0°
2:10	0:30	0:30	0:15	0:30	0:30	0:15	0:50	0:30	2:00	∞

- **PCR02** (94/62-60-58x1-10-25) per **MTRR: c.66A>G**, **MTHFS: c.604A>G**

3 Tmp x 1			3 Tmp x 10			3 Tmp x 25			2 Holds	
94.0°	64.0°	72.0°	94.0°	63.0°	72.0°	94.0°	62.0°	72.0°	72.0°	4.0°
2:10	0:30	0:30	0:15	0:30	0:30	0:15	0:50	0:30	2:00	∞

- **PCR05B** (98/62-61-60x1-10-30) per **MTHFD1: c.1958G>A**

3 Tmp x 1			3 Tmp x 10			3 Tmp x 25			2 Holds	
94.0°	64.0°	72.0°	94.0°	63.0°	72.0°	94.0°	62.0°	72.0°	72.0°	4.0°
2:10	0:30	0:30	0:15	0:30	0:30	0:15	0:50	0:30	2:00	∞

3.3.3.2 PCR-RFLP

Al fine di analizzare il genotipo relativo ai polimorfismi dei geni per i folati MTHFR, MTR, MTRR, MTHFD1, MTHFS, SLC19A1 e TCN2 è stata applicata la tecnica PCR-RFLP. Essa permette di analizzare polimorfismi grazie alla creazione e all'analisi di frammenti di diversa lunghezza, dopo la digestione del campione di DNA in questione, con uno specifico enzima di restrizione endonucleasico.

Gli enzimi di restrizione, o endonucleasi, sono enzimi che tagliano il DNA in punti specifici all'interno di determinate sequenze palindromiche di DNA.

Una variante puntiforme (o SNP) che cade nel sito di taglio di uno specifico enzima di restrizione può portare ad un mancato taglio in quella posizione; ne consegue che, invece di ottenere due frammenti di DNA, resterà un solo frammento unito.

La reazione deve avvenire ad una temperatura ottimale, specifica per il tipo di enzima utilizzato, per questo essa viene eseguita in bagnetto termostato. In genere gli enzimi di restrizione più comuni agiscono a 37°C.

Anche i tempi di attuazione della digestione variano a seconda dell'enzima utilizzato: possono essere di 2, 4, ma anche 8 ore.

3.3.3.3 Digestione enzimatica

I due diversi prodotti di PCR per il gene MTHFR sono stati digeriti con specifiche endonucleasi di restrizione.

Il segmento genomico di 257bp amplificato con i primer MTHFR 677A e MTHFR677B è stato digerito con l'enzima di restrizione *HinfI* che riconosce un sito di restrizione generato dalla mutazione 677C>T, producendo due frammenti rispettivamente di 218bp e di 39bp.

L'amplificato MTHFR 1298F/E di 538bp è stato digerito, invece, con l'endonucleasi di restrizione *MboII*, che riconosce quattro siti di restrizione, uno dei quali soppresso dalla mutazione 1298A>C. La digestione del segmento corrispondente all'allele 1298A genera 5 frammenti di 431bp, 30bp, 31bp, 28bp e 18bp. Nell'allele 1298C vengono prodotti 4 frammenti di lunghezza 459bp, 31bp, 30bp e 28bp.

L'amplificato MTR 2756F/R è stato digerito con l'enzima di restrizione *HaeIII* che riconosce il sito di restrizione generato dalla mutazione 2756A>G. Il segmento amplificato sull'allele 2756G viene digerito da *HaeII* in due frammenti di 159bp e 30bp.

Dal momento che la variante MTRR 66A>G non modifica il profilo di restrizione della sequenza genomica di MTRR, per l'analisi di questo polimorfismo è stata applicata la tecnica di *RG-PCR*, che prevede l'uso di un primer opportunamente mutagenizzato nella sua parte in 3' e corrispondente ad una sequenza prossima al sito di mutazione. Il segmento amplificato sull'allele G viene digerito dall'enzima *NdeI* in due frammenti di 24bp e 120bp rispettivamente.

L'amplificato MTHFD1 C/Y è stato digerito con enzima *BamHI* che riconosce il sito di restrizione generato dalla mutazione 1958 G>A. Il segmento amplificato sull'allele 1958 A viene digerito da *BamHI* in due frammenti di 179bp e 25bp.

La digestione per l'amplificato MTHFS MDA/MXA è avvenuta con l'enzima *PvuII* producendo due frammenti di 214bp e 26bp se ottenuta su stampo dell'allele 604G, mentre l'amplificato prodotto dall'allele wild-type 604A non viene digerito.

L'amplificato TCN2 F/B è stato digerito con enzima *BstNI* che riconosce il sito di restrizione generato dalla variante 776 C>G. Il segmento amplificato sull'allele 776G viene digerito da *BstNI* in due frammenti di 94 bp e 167 bp.

L'amplificato SLC19A1 F/R è stato digerito con l'endonucleasi *HhaI* che riconosce il sito di restrizione generato dalla variante RFC1 80G>A. L'amplificato corrispondente all'allele A viene digerito in due frammenti di 125 bp e di 106 bp.

Le reazioni di digestione sono state allestite in piastre da 96 wells in un volume finale di 15 μ l (13 μ l di Mix+2 μ l di DNA amplificato) seguendo i protocolli sotto riportati:

Mix per amplificato MTR 2756 F/R	
ddH ₂ O	10,9 μ l
NEB2	1,8 μ l
HaeIII (10U/ml)	0,3 μ l
Tot. 13 μ l	

Mix per amplificati MTHFR 677A/B e MTHFR 1298F/E	
ddH ₂ O	10,9 μ l
NEB2	1,8 μ l
Hinf I / MobII (10U/ml)	0,3 μ l
Tot. 13 μ l	

Mix per amplificato MTRR E/G	
acqua bidistillata	10,9 μ l
NEB 4	1,8 μ l
NdeI (10U/ml)	0,3 μ l
Tot. 13 μ l	

Mix per amplificato MTHFD1 C/Y	
ddH ₂ O	10,7 μ l
NEB BamHI	1,8 μ l
BSA 100X	0,2 μ l
BamHI (20U/ml)	0,3 μ l
Tot. 13 μ l	

Mix per amplificato MTHFS MDA/MXA	
ddH ₂ O	10,7µl
NEB 2	1,8µl
PvuII (10U/ml)	0,5µl
Tot. 13µl	

Mix per amplificato SLC19A1 F/R	
ddH ₂ O	10,7µl
NEB 2	1,8µl
HhaI (10U/ml)	0,5µl
Tot. 13µl	

Mix per amplificato TCN2 F/B	
ddH ₂ O	10,7µl
NEB 2	1,8µl
BstNI(10U/ml)	0,5µl
Tot. 13µl	

Le reazioni di digestione sono state allestite in piastre da 96 wells. Con pipetta multipla si sono distribuiti nei vari pozzetti i 13µl di mix specifica per ogni amplificato. Successivamente è stato aliquotato il DNA amplificato (PCR-Product) in un volume di 2µl, per un totale del volume di reazione pari a 15µl. Le digestioni enzimatiche sono state condotte a 37° C per circa un'ora, fatta eccezione per MTR, la cui reazione è stata incubata per 4 ore, e per MTRR, la cui reazione ha richiesto 16 ore circa. Al termine della digestione, le endonucleasi sono state inattivate incubando i campioni in un bagnetto termostato a 65°C per 10 minuti.

3.3.3.4 Corsa elettroforetica

I frammenti di restrizione delle varianti MTHFR: c.677C>T, MTHFR: c.1298A>C, MTR: c.2756A>G, MTRR: c.66A>G, MTHFD1: c.1958G>A, MTHFS: c.604A>G, SLC19A1: c.80G>A, TCN2: c.776C>G sono stati risolti mediante PAGE.

Per la risoluzione di tutte le suddette varianti si è utilizzata corsa su gel in poliacrilammide all'8%, fatta eccezione per gli amplificati MTHFR 1298A>C e TCN2 776C>G che sono stati risolti su gel di poliacrilammide al 6%. La corsa elettroforetica è avvenuta applicando un voltaggio pari a 160 V per 60 minuti. Per gli amplificati TCN2 è stata sufficiente una corsa di 45 minuti.

I gel sono stati colorati con la metodica della colorazione argentica.

3.4 Analisi statistica

3.4.1 Test del Chi Quadrato (χ^2)

Il test del Chi Quadrato (χ^2) è impiegato per confrontare due serie di dati e verificare l'ipotesi nulla di indipendenza tra le variabili.

Il calcolo del χ^2 viene fatto sulla base della seguente formula:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^N \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

Dove O sono le frequenze osservate ed E sono le frequenze attese.

Un p value $<0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

3.4.2 Calcolo dei limiti di confidenza

I limiti di confidenza al 95% delle frequenze alleliche e genotipiche sono stati calcolati impiegando la seguente formula:

$$95\% \text{ C.I.} = p \pm 1,96 \times \sqrt{\frac{p \times (1 - p)}{N} - \frac{1}{2N}}$$

dove p è la frequenza allelica o genotipica e N è il numero di osservazioni eseguite.

3.4.3 Calcolo dell'Odds Ratio (OR)

Negli studi volti a verificare l'esistenza di un'associazione statistica tra la presenza di un determinato polimorfismo e la risposta ad una terapia, si possono formulare due diverse ipotesi:

- che vi sia associazione tra un determinato genotipo con l'occorrenza di patologia o con la risposta al farmaco;
- che non vi sia associazione tra le due variabili.
-

Le misure per quantificare l'entità di tale associazione sono numerose e la più utilizzata è il *rapporto incrociato* o *Odds ratio* (OR).

Con il termine *odds* in statistica s'intende il rapporto tra la probabilità p di un evento e la probabilità $(1-p)$ dell'evento complementare:

$$Odds = \frac{p}{(1 - p)}$$

Il rapporto tra due *odds* è detto *Odds ratio*:

$$\frac{\frac{p}{(1 - p)}}{\frac{q}{(1 - q)}} = \frac{p \times (1 - q)}{q \times (1 - p)}$$

Nel nostro caso l'Odds ratio può essere calcolato utilizzando la seguente formula:

$$\frac{\frac{a}{b}}{\frac{c}{d}} = \frac{a \times d}{c \times b} \text{ dove } \rightarrow$$

	AFFETTO o RISPOSTA (Y)	NON AFFETTO o ASSENZA RISPOSTA (N)
Presenza polimorfismo	a	b
Assenza polimorfismo	c	d

Fig.3.4. Interpretazione dei valori assunti dall'OR.



L'Odds Ratio può assumere valori tra zero e infinito (fig. 3.4):

OR < 1 → associazione negativa, pertanto l'allele è "protettivo" nei confronti della patologia e causa una mancata risposta al farmaco;

OR = 1 → assenza di associazione, quindi l'occorrenza e la risposta al farmaco sono indipendenti dal genotipo del soggetto;

OR > 1 → associazione positiva, pertanto la presenza dell'allele aumenta il rischio di sviluppare malattia, ma favorisce la risposta al farmaco. L'associazione è tanto più elevata quanto più il valore dell'OR è grande.

Per verificare se i risultati dell'OR sono significativi si può calcolare l'intervallo di confidenza (IC) al 95%.

Infatti se all'interno di questo intervallo è presente il valore 1, il risultato dell'OR non è significativo in quanto l'OR potrebbe assumere anche il valore 1 che significa assenza di associazione.

Per calcolare l'intervallo di confidenza bisogna prima procedere al calcolo dell'errore standard (s):

$$s = \sqrt{\frac{1}{a} + \frac{1}{b} + \frac{1}{c} + \frac{1}{d}}$$

Poi si calcola il logaritmo naturale dell'OR e si utilizza la costante pari a 1,96 per un $\alpha = 0,05$ che corrisponde ad un IC al 95%:

$$IC_{95\%} = \ln OR \pm (1,96 \times s)$$

In questo modo si ottengono due valori che rappresentano il limite superiore e quello inferiore dell'intervallo al 95% del logaritmo naturale dell'OR. Per ottenere i limiti dell'intervallo al 95% dell'OR si deve elevare la costante e a ciascuno dei due valori ottenuti precedentemente. Così facendo si ottiene il limite superiore e quello inferiore dell'intervallo di confidenza al 95% dell'OR. A questo punto basta verificare la presenza del valore 1 all'interno dell'intervallo, se l'1 è presente il valore di OR non è significativo, in caso contrario è significativo.

3.4.4 Livello di significatività (p value)

È un test di verifica che viene effettuato per valutare la significatività dell'ipotesi zero (H_0), ovvero per stabilire se la differenza del parametro analizzato tra i gruppi considerati risulta significativa o dovuta al caso.

Il *p value* è un valore che stabilisce il minimo livello di significatività per il quale l'ipotesi nulla viene rifiutata: tale ipotesi viene rifiutata se il test fornisce un valore p superiore al livello di significatività, mentre viene accettata in caso contrario.

La differenza è considerata significativa quando $p < 0,05$ (livello di significatività del 5%), in altri termini significa che i risultati ottenuti hanno una probabilità del 5% di essere casuali, mentre hanno una probabilità del 95% di essere dovuti alla differenza tra i gruppi esaminati.

Se risulta $p > 0,05$, la differenza non è considerata statisticamente significativa.

Il valore p è dato dalla seguente formula:

$$p = P(|X - E| \geq |x - E|)$$

dove

P = probabilità

X, x = risultati osservati

E = risultato atteso

3.5 Multifactorial Dimensionality Reduction

3.5.1 Interazione genica

Col termine *epistasi* classicamente si definisce quel fenomeno per il quale il valore fenotipico di un gene viene influenzato dal valore fenotipico di un altro gene. Quando si pensa a un effetto poligenico, la cosa più intuitiva cui si pensa è un effetto additivo. Si è portati a credere che ogni gene aggiunga un qualcosa al determinismo di quel carattere senza entrare in relazione con gli altri geni. Questo scenario, per quanto realistico e dimostrato scientificamente in molti casi, non è tuttavia il più probabile. Tutte le conoscenze accumulate negli ultimi anni sul funzionamento dei geni hanno dimostrato, infatti, un elevato grado di interazione gene-gene. Questa interazione può avvenire sia nei complessi macromolecolari di cui si ha sempre maggiore conoscenza sia nella partecipazione a vie metaboliche comuni. Ci sono, quindi, sempre maggiori dimostrazioni che i geni interagiscono epistaticamente l'uno con l'altro e che, quindi, una variante allelica di un gene potrebbe avere influenza nella suscettibilità a una malattia solo se presenti altre varianti di altri geni. È ovvio che l'esistenza di epistasi complica grandemente l'analisi, anche perché la natura e gli effetti di queste interazioni sono ancora lontani dall'essere completamente definiti e, per larga misura, rimangono non prevedibili. In ogni caso nasce la necessità non più di associare a una malattia una forma allelica ma la presenza contemporanea di più forme alleliche. (Mayeux R., 2005).

3.5.2 MDR

Il “*Multifactorial Dimensionality Reduction*” (MDR) è stato proposto come metodo in grado di affrontare il problema della dimensionalità. L'MDR è stato pensato, quindi, per essere in grado di svelare le interazioni gene-gene e gene-ambiente ed è stato adoperato con successo in alcuni studi (A.A Motsinger et al.,2007) e molta attenzione è riservata alle possibili applicazioni future.

Il programma *Multifactor Dimensionality Reduction v1.0.0* richiede l'inserimento dei dati in forma ben precisa. Per lo studio, si è creato un datafile contenente la lista dei 246 campioni componenti la casistica. Ad ogni campione è stata attribuita una stringa, da compilare con i tre possibili genotipi che può assumere ogni singolo campione per i 14 polimorfismi studiati. Il genotipo deve essere indicato utilizzando il valore 0 per il genotipo omozigote wild-type, il valore 1 per l'eterozigote e il valore 2 per l'omozigote mutato. Per ogni campione deve essere specificata la classe a cui appartiene (valore 0 o valore 1). Nello studio, per l'analisi MDR sull'efficacia del MTX il valore 0 è stato attribuito ai responder e il valore 1 ai non-responder, mentre per l'analisi della tossicità è stato assegnato il valore 1 ai pazienti che manifestavano tossicità al farmaco e 0 agli altri.

La procedura è stata eseguita secondo le norme illustrate in “*MDR Software Overview Guide Release1.0.0*”.

I risultati di un'analisi di questo tipo possono essere visualizzati attraverso tre diverse rappresentazioni: grafico lineare (line chart), istogramma, dendogramma. Il dendogramma è una rappresentazione grafica delle interazioni e della modalità di interazione tra i vari attributi (geni, nella fattispecie) che mette in evidenza la natura delle interazioni (ridondante, additiva, sinergica) (Jakulin et al.,2003). Nel dendogramma ogni interazione è contraddistinta da un colore, in una scala di intensità che va dal rosso al blu.

Quando l'interazione è di tipo SINERGICO, viene rappresentata col colore rosso ad indicare che l'interazione tra gli attributi considerati è tale per cui è necessaria la presenza di ognuno degli attributi oggetto di interazione per arrivare ad ottenere il risultato finale (interazione in serie tra i due attributi A e B, legati dall'operatore logico “AND”).

Quando l'interazione è di tipo RIDONDANTE, viene indicata in blu e indica che è necessaria e sufficiente la presenza di un solo attributo oggetto di interazione per ottenere l'effetto finale (interazione in parallelo tra i due attributi A e B, legati dall'operatore logico “OR”). La natura

additiva delle interazioni viene indicata col colore verde o ocra a seconda dell'intensità dell'effetto additivo.

Il programma fornisce per ogni attributo e per ogni coppia di attributi che compone un'interazione, un valore definito "Information Gain" (IG), che è il parametro indicativo dell'entità dell'interazione. Più l'IG è elevato in valore assoluto, maggiori sono l'importanza e la rilevanza dell'interazione.

4

Risultati

4.1 HLA-DRB1 e HLA-DQA2

Da più di trent'anni è stata stabilita l'importanza del locus HLA-DRB1, in particolare degli alleli codificanti per la sequenza dello *shared epitope*, nello sviluppo e nell'*outcome* dell'Artrite Reumatoide. Come sempre, le numerose evidenze riscontrate nei diversi studi indicano che, da solo, questo locus non è in grado di spiegare il contributo complessivo di MHC all'instaurarsi della malattia.

L'identificazione di ulteriori loci di suscettibilità all'interno di questa regione è stata impegnativa a causa dell'estensione di *Linkage Disequilibrium* (LD) che caratterizza questa regione. Recenti studi, impiegando diversi approcci analitici quali metodi di stratificazione, hanno ridefinito i dati di associazione genetica di questa regione. Lee et al., impiegando un metodo di accoppiamento basato sui genotipi di HLA-DRB1 nel tentativo d'identificare effetti d'associazione indipendenti, ha rilevato la presenza di un aplotipo conservato (A1-B8-DR3), il locus ZNF311e la regione contenente i geni DOB1, TAP2, DPB1, and COL11A2. Vignal et al., utilizzando un metodo di regressione logistica al fine d'individuare effetti d'associazione addizionali, ha considerato nel suo lavoro le varianti ai loci VARS2L, HLA-B, and DQA2.

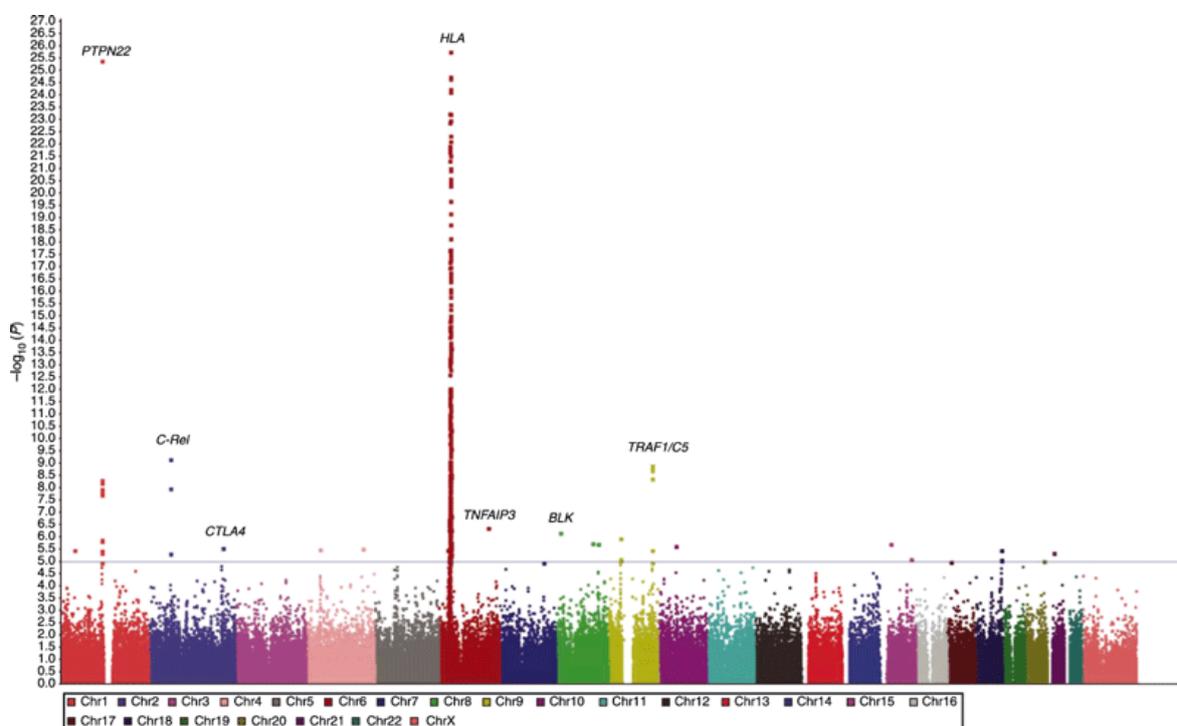


Figura 22 Manhattan Plot, in cui l'area di ciascun cromosoma è posizionata, in ascissa, a partire dall'estremità del braccio corto, p, fino all'estremità opposta del braccio lungo, q. In figura sono mostrati in sequenza i cromosomi umani e per ciascuno i puntini indicano regioni di possibile associazione, a seconda dell'altezza del picco di punti il valore di significatività di associazione aumenta. La soglia di significatività è indicata dalla linea blu, solo una regione all'interno del cromosoma 8 risulta fortemente associata (Criswell et al., 2010).

Nel nostro lavoro sono state effettuate analisi farmacogenetiche e d'occorrenza di AR relative alle varianti **rs6910071**, variante intronica interna al gene C6orf10, localizzata 263 Kb a monte di HLA-DRB1, e **rs660895**, variante intergenica localizzata 30,8 Kb a valle di HLA-DRB1. È stato riportato nella letteratura medica (Miretti et al., 2005; Denny et al., 2013; Gorman et al., 2004) che queste due varianti sono inserite nel linkage disequilibrium del gene HLA-DRB1 (6p21.32) e quindi trasmesse insieme ad esso (risultano associate allo Shared Epitope) ed associate all'occorrenza di Artrite Reumatoide. Si tratta di due siti di SNV (*Single Nucleotide Variant*) A>G presenti nella popolazione con una frequenza $\geq 1\%$. Nello studio di Xie et al., volto a delineare varianti addizionali con associazione forte e/o indipendente alla patologia, rs6910071 e rs660895 sono stati utilizzati per valutare l'indipendenza dell'associazione alla patologia del locus NKAPL,

in quanto riconosciuti come *tag SNPs* dell'allele HLA-DRB1*0401. L'analisi ha confermato la forte associazione allo sviluppo di AR di entrambi gli SNPs (Xie et al., 2013). Anche nel lavoro di Black e Watanabe, realizzato per identificare *clusters* di SNPs nella regione HLA associati ad AR, i polimorfismi rs6910071 e rs660895 sono stati collocati all'interno del *cluster* maggiormente associato alla suscettibilità alla malattia e costituito da SNPs circostanti i loci HLA-DRA, HLA-DRB5 e HLA-DRB1. Infine in uno studio svolto nel 2009, nel quale *shared epitope* e anticorpi anti-CCP o fattore reumatoide venivano incorporati in una mappatura di LD al fine di stimare l'associazione tra i suddetti parametri e i geni malattia identificati, l'rs660895 si è rivelato come lo SNP con il più alto livello d'associazione alla patologia (OR= 4.884 ; p-value= 1.42×10^{-107}), seguito da rs6910071 (OR=4,488 ; p-value= 1.00×10^{-96}) (Chiu et al.,2009).

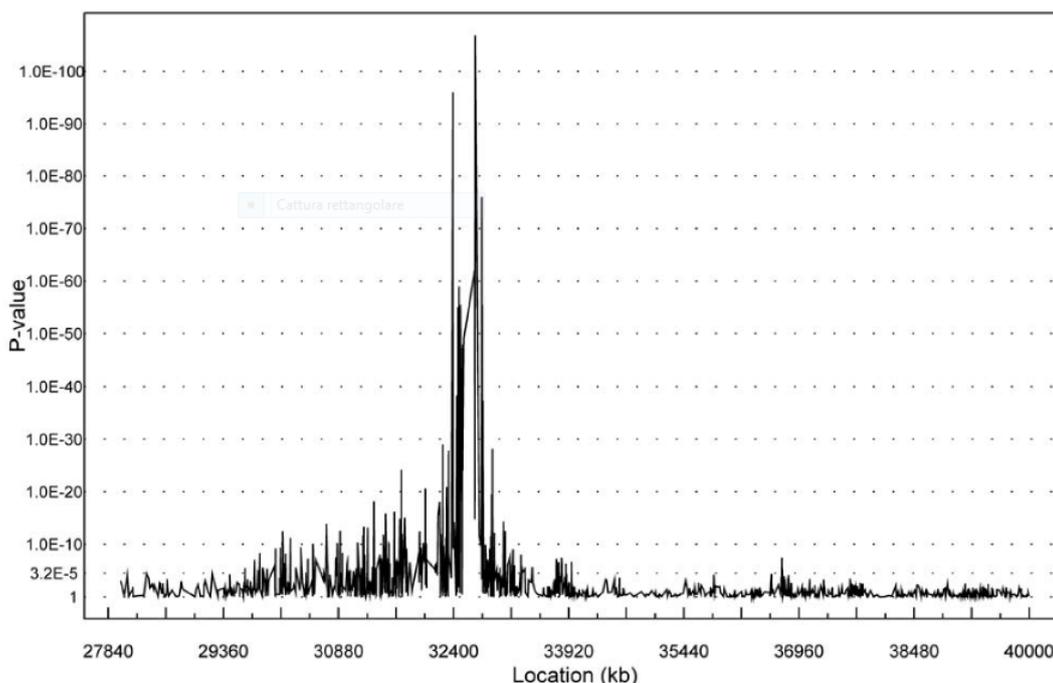


Figura 23 Rappresentazione dei p-values dei singoli SNPs ottenuti dall'analisi d'associazione basata sul test del χ^2 (Chiu et al.,2009).

L'attenzione del nostro studio è stata focalizzata anche sul locus DQA2. Questo gene, localizzato sul braccio corto del cromosoma 6 in posizione 6p21.32, appartiene alla famiglia HLA di classe II della catena α e codifica per una proteina, localizzata in vescicole intracellulari, che svolge un ruolo centrale nella presentazione dell'antigene alle molecole MHC di classe II, contribuendo al rilascio della molecola CLIP dal sito di legame peptidico.

Vignal et al., in un lavoro pubblicato nel 2009, avevano individuato 18 marcatori genetici fortemente associati ad AR. Una successiva analisi di regressione logistica multivariata applicata a questi marcatori in combinazione con il locus DRB1, aveva condotto ad un modello basato sull'effetto legato alla presenza di DRB1 in concomitanza con altri 3 marcatori. Tra questi era presente un polimorfismo localizzato nella regione 5' UTR (*untranslated region*) di DQA2. Approfondendo l'investigazione del dato, si era ipotizzato che l'associazione di DQA2 ad AR potesse derivare da un meccanismo criptico di LD con l'allele di DRB1.

Successivamente Liu et al., in uno studio caso-controllo atto ad identificare possibili interazioni geniche in grado di contribuire alla suscettibilità ad AR e SNPs che permettessero di discriminare tra pazienti affetti da AR ACCP+ e controlli sani, erano stati in grado d'individuare una forte interazione tra 2 SNPs, rispettivamente posizionati nella regione fiancheggiante 5' di DQA2 (rs9275595) e in DQB2 (rs10807113). Gli alleli di questi due geni incrementavano sinergicamente la suscettibilità ad AR: il solo allele A di rs9275595 aumentava il rischio di AR del 61%, mentre il solo allele G dell'rs10807113 appariva ininfluenza sul rischio di sviluppare AR. La simultanea presenza dei due alleli nei pazienti conduceva però ad un incremento del rischio di occorrenza della patologia di ben 11 volte.

Sulla base dei risultati ottenuti da questi lavori abbiamo valutato anche l'associazione di rs9275595 all'occorrenza di AR, alla risposta farmacologica e alla tossicità delle terapie impiegate.

4.1.1 Frequenze alleliche e genotipiche

Nelle seguenti tabelle sono state calcolate le frequenze alleliche e genotipiche relative ai polimorfismi rs6910071 ed rs660895, associati allo *shared epitope* del locus HLA-DRB1, ed rs9275595, nel locus HLA-DQA2. Dalle tabelle è emerso che per rs6910071 non vi sono sostanziali differenze tra casi e controlli nelle frequenze dell'allele ancestrale e della variante. La variante G nel polimorfismo rs660895 ha evidenziato una maggiore frequenza negli affetti (6% circa) rispetto ai controlli. Per quanto riguarda rs9275595, l'allele minore ha mostrato una frequenza aumentata di quasi 2 volte nei pazienti rispetto ai controlli sani.

rs6910071

Tabella 4: frequenze genotipiche e alleliche relative del polimorfismo rs6910071 nella casistica studiata. Sono mostrati i dati relativi a casi e controlli. In nero sono: il conteggio dei soggetti per ogni genotipo (N) e le loro relative frequenze. In verde sono i valori (HW) e le relative frequenze attesi considerando la popolazione in equilibrio di Hardy-Weinberg. In blu sono: le frequenze alleliche assolute e relative. χ^2 y: Test Chi² di Yates.

Casi		
AA	236	74,0%
AG	80	25,1%
GG	3	0,9%
A	552	86,5%
G	86	13,5%
Controlli		
AA	270	75,4%
AG	87	24,3%
GG	1	0,3%
A	627	87,6%
G	89	12,4%

rs660895

Tabella 5: frequenze genotipiche e alleliche relative del polimorfismo rs660895 nella casistica studiata. Sono mostrati i dati relativi a casi e controlli. In nero sono: il conteggio dei soggetti per ogni genotipo (N) e le loro relative frequenze. In verde sono i valori (HW) e le relative frequenze attesi considerando la popolazione in equilibrio di Hardy-Weinberg. In blu sono: le frequenze alleliche assolute e relative. χ^2 y: Test Chi² di Yates.

Casi		
AA	221	69,5%
AG	94	29,6%
GG	3	0,9%
A	536	84,3%
G	100	15,7%
Controlli		
AA	303	81,0%
AG	68	18,2%
GG	3	0,8%
A	674	90,1%
G	74	9,9%

rs9275595

Tabella 6: frequenze genotipiche e alleliche relative del polimorfismo rs9275595 nella casistica studiata. Sono mostrati i dati relativi a casi e controlli. In nero sono: il conteggio dei soggetti per ogni genotipo (N) e le loro relative frequenze. In verde sono i valori (HW) e le relative frequenze attesi considerando la popolazione in equilibrio di Hardy-Weinberg. In blu sono: le frequenze alleliche assolute e relative. χ^2 y: Test Chi² di Yates.

Casi		
TT	170	53,1%
TC	129	40,3%
CC	21	6,6%
T	469	73,3%
C	171	26,7%
Controlli		
TT	270	72,6%
TC	94	25,3%
CC	8	2,2%
T	634	85,2%
C	110	14,8%

4.1.2 Associazione tra genotipo ed occorrenza di Artrite Reumatoide

In primo luogo sono state ricercate possibili associazioni tra le varianti rs6910071 e rs660895, rs9275595 e l'occorrenza di malattia. Per tutti i tre polimorfismi è stata valutata la presenza di uno specifico genotipo in rapporto ad una maggiore probabilità di sviluppo di Artrite Reumatoide.

Nella tabelle seguenti, sono riportati i valori dell'Odds Ratio (OR) calcolati su casi e controlli, relativi ai genotipi delle varianti analizzate. I valori di OR sono stati considerati sulla base di un modello di codominanza nel quale venivano analizzati i genotipi eterozigote ed omozigote per la variante, in riferimento al genotipo omozigote wild-type.

Tabella 7: Variante rs6910071: occorrenza di malattia in dipendenza del genotipo. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti affetti da AR (casi) e controlli sani (ctrl). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.).

	OR caso/ctrl	95% C.I.	
GG/AA	3,432	0,355	33,220
AG/AA	1,052	0,741	1,493

Tabella 8: Variante rs660895: occorrenza di malattia in dipendenza del genotipo. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti affetti da AR (casi) e controlli sani (ctrl). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confi

	OR caso/ctrl	95% C.I.	
GG/AA	1,371	0,274	6,857
AG/AA	1,895	1,326	2,708

Tabella 9: Variante rs9275595: occorrenza di malattia in dipendenza del genotipo. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti affetti da AR (casi) e controlli sani (ctrl). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.).

	OR caso/ctrl	95% C.I.	
CC/TT	4,169	1,806	9,625
TC/TT	2,180	1,570	3,025

In riferimento alla variante rs6910071, non è stata evidenziata alcuna associazione tra genotipo ed occorrenza di AR.

rs660895 ha evidenziato un OR pari a 1,895 significativo per il genotipo AG, mentre il polimorfismo che ha evidenziato la maggiore associazione all'occorrenza della patologia è stato rs9275595, con valori di OR di 4,169 e 2,180 rispettivamente per i genotipi CC e TC, entrambi significativi (grafico seguente).

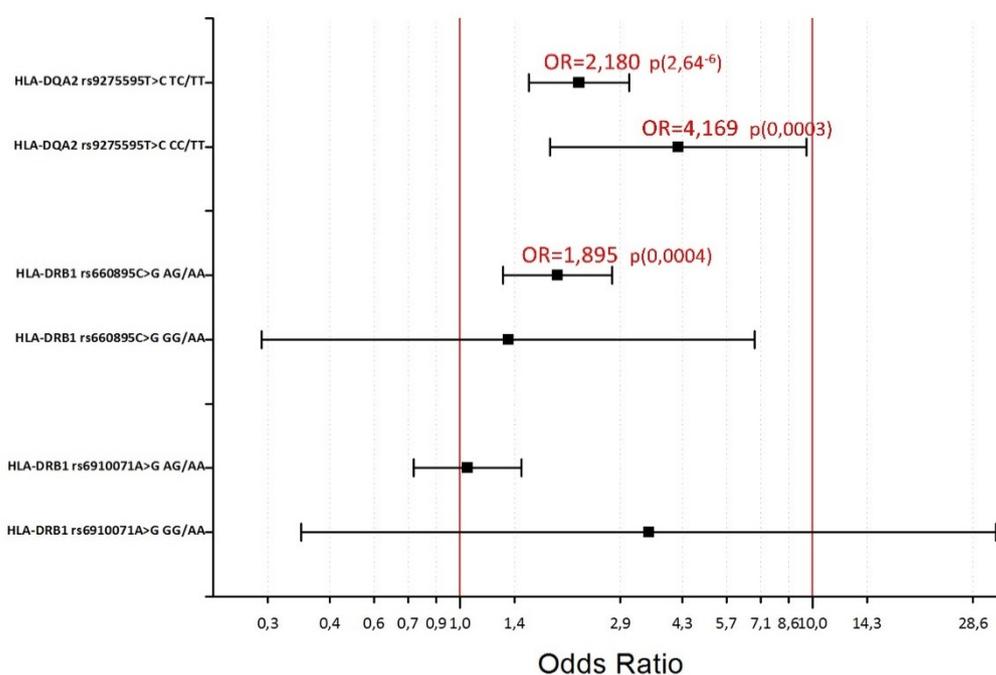


Grafico 1 Rappresentazione grafica (modello codominante) degli OR relativi all'associazione tra genotipo delle varianti rs6910071, rs660895, rs9275595 ed occorrenza di AR.

L'analisi è stata successivamente ampliata stratificando l'associazione di occorrenza di AR in base al genere. Dalla stratificazione effettuata è risultato evidente come, delle tre SNPs appartenenti alla regione HLA-D, rs9275595 fosse quello con la più forte associazione allo sviluppo della patologia, riscontrata sia negli individui di sesso maschile che femminile.

I dati ottenuti appaiono significativi in quanto supportati da p-value inferiori alla soglia dello 0,05.

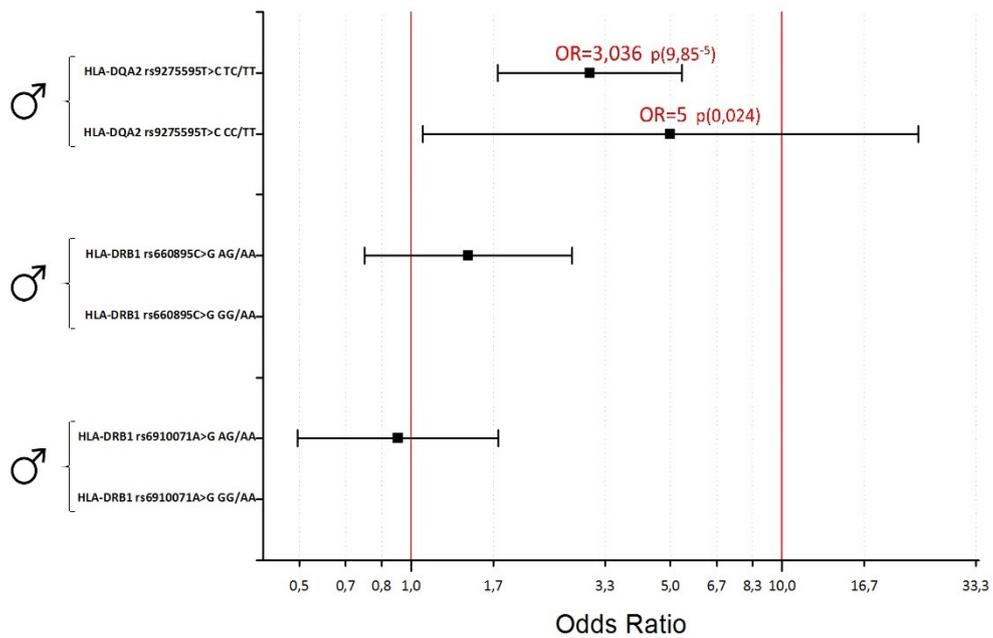


Grafico 2 Rappresentazione grafica (modello codominante) degli OR relativi all'associazione tra genotipo delle varianti rs6910071, rs660895, rs9275595 ed occorrenza di AR nel genere maschile.

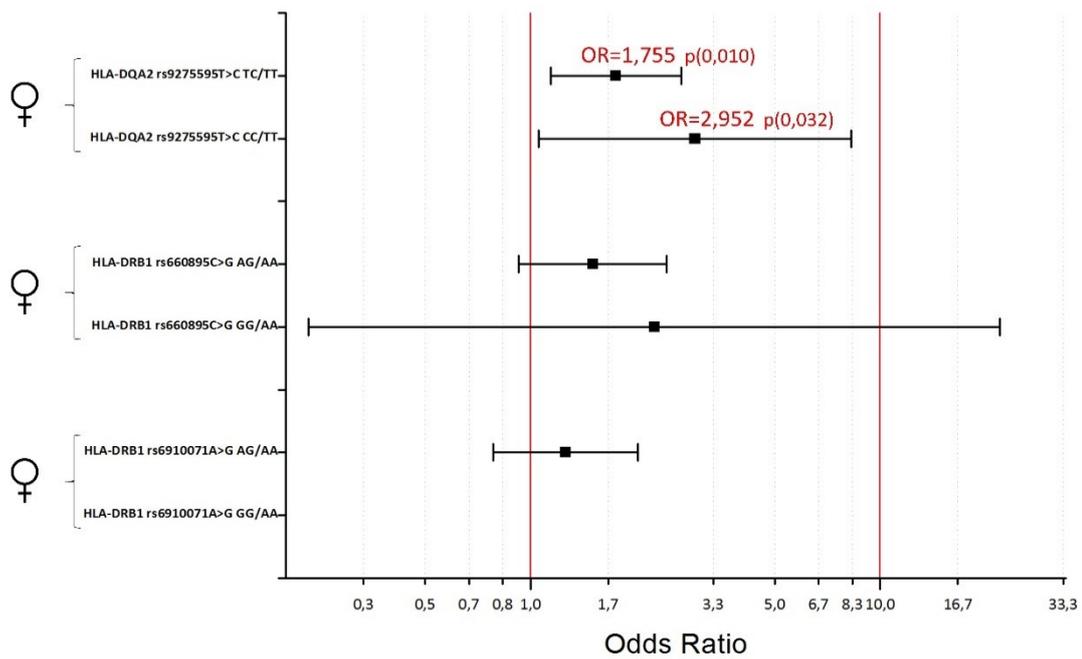


Grafico 3 Rappresentazione grafica (modello codominante) degli OR relativi all'associazione tra genotipo delle varianti rs6910071, rs660895, rs9275595 ed occorrenza di AR nel genere femminile.

4.1.3 Associazione tra genotipo ed efficacia al MTX

La ricerca scientifica è da tempo impegnata a ricercare marcatori clinici che possano predire l'efficacia o meno di un determinato trattamento. La disponibilità di tali marcatori potrebbe consentire ai pazienti che non rispondono o che sviluppano tossicità ad un farmaco, di indirizzarli verso altri trattamenti terapeutici più appropriati, evitando la progressione della malattia durante la cura, nonché la manifestazione di effetti avversi.

Il Methotrexate (MTX), è considerato da sempre il farmaco di prima linea nella cura dell'AR dotato di elevata efficacia e la cui disponibilità comporta costi sanitari relativamente bassi.

È stata quindi effettuata l'analisi farmacogenetica di MTX al fine di valutare l'associazione tra i profili genetici delle tre varianti finora oggetto di studio. In questo caso, il calcolo dei valori di OR di ciascun genotipo è stato effettuato sulla base dei pazienti che hanno mostrato efficacia alla terapia con Methotrexate (SI) e pazienti che non hanno risposto positivamente alla terapia (NO).

Tabella 10: Variante rs6910071: efficacia alla terapia con MTX in dipendenza del genotipo. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti responder (Y) e non responder (N). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.)

	SI	NO		OR SI/NO	95% C.I.					
AA	121	101	GG/AA	0,835	0,052	13,514				
AG	43	34					AG/AA	1,056	0,627	1,779
GG	1	1								
tot	165	136								

Tabella 11: Variante rs660895: efficacia alla terapia con MTX in dipendenza del genotipo. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti responder (Y) e non responder (N). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.)

	SI	NO		OR SI/NO	95% C.I.					
AA	16	93	GG/AA	5,813	0,346	97,727				
AG	8	42					AG/AA	1,107	0,440	2,788
GG	1	1								
tot	25	136								

Tabella 12: Variante rs9275595: efficacia alla terapia con MTX in dipendenza del genotipo. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti responder (Y) e non responder (N). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.)

	SI	NO		OR SI/NO	95% C.I.					
TT	121	67	CC/TT	0,886	0,381	2,062				
TC	105	59					TC/TT	0,985	0,637	1,525
CC	16	10								
tot	242	136								

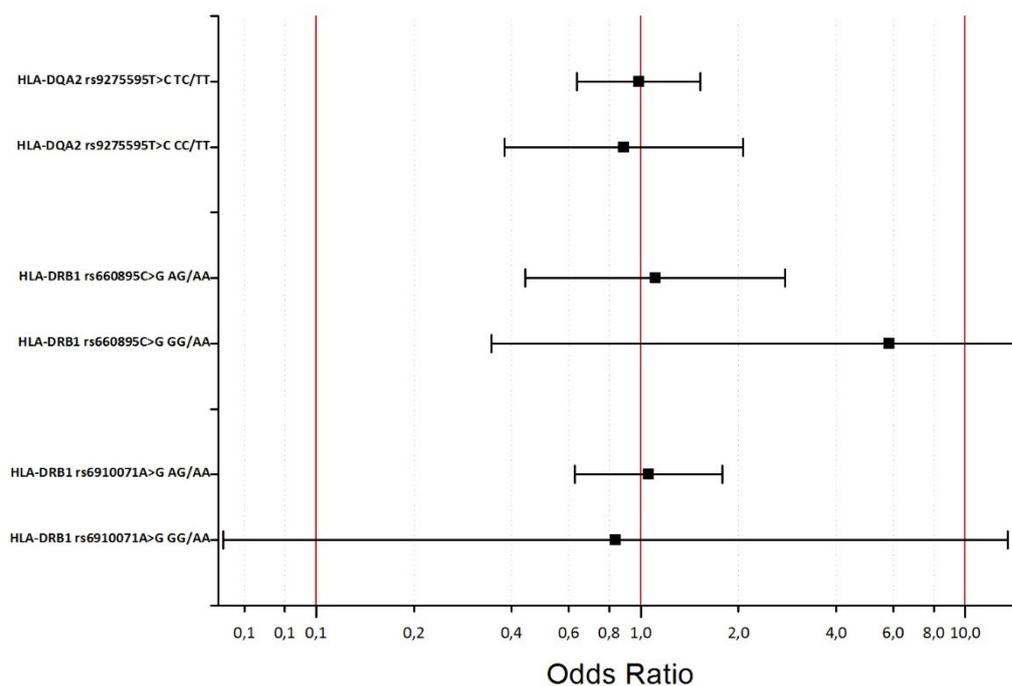


Grafico 4 Rappresentazione grafica (modello codominante) degli OR relativi all'associazione tra efficacia al trattamento con MTX e genotipo per le varianti rs6910071, rs660895, rs9275595.

Anche in questo caso abbiamo stratificato i dati ottenuti dalla nostra casistica in base al genere.

MASCHI

Tabella 13: 10. Variante rs6910071: efficacia alla terapia con MTX in dipendenza del genotipo nel genere maschile. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti responder (Y) e non responder (N). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.)

	SI	NO		OR SI/NO	95% C.I.	
AA	34	20	GG/AA AG/AA	-	-	-
AG	12	5		1,412	0,434	4,597
GG	0	0				
tot	46	25				

Tabella 14: Variante rs660895: efficacia alla terapia con MTX in dipendenza del genotipo nel genere maschile. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti responder (Y) e non responder (N). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.)

	SI	NO		OR SI/NO	95% C.I.	
AA	33	16	GG/AA AG/AA	-	-	-
AG	12	8		0,727	0,248	2,132
GG	0	1				
tot	45	25				

Tabella 15: Variante rs9275595: efficacia alla terapia con MTX in dipendenza del genotipo nel genere maschile. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti responder (Y) e non responder (N). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.)

	SI	NO		OR SI/NO	95% C.I.	
TT	24	121				
TC	21	105	CC/TT	0,630	0,136	2,922
CC	2	16	TC/TT	1,008	0,531	1,915
tot	47	242				

Negli uomini non è stata osservata alcuna particolare associazione tra i genotipi delle varianti considerate e la suscettibilità alla malattia.

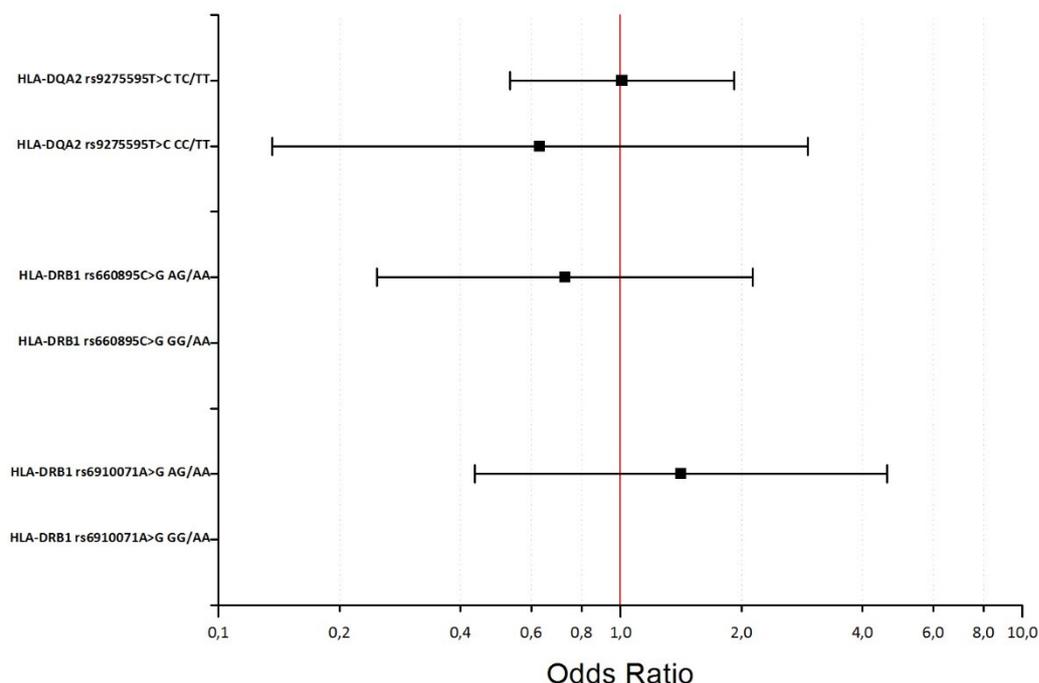


Grafico 5 Rappresentazione grafica (modello codominante) degli OR relativi all'associazione tra efficacia al trattamento con MTX e genotipo per le varianti rs6910071, rs660895, rs9275595 nel genere maschile.

FEMMINE

Tabella 16: Variante rs6910071: efficacia alla terapia con MTX in dipendenza del genotipo nel genere femminile. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti responder (Y) e non responder (N). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.)

	SI	NO		OR SI/NO	95% C.I.	
AA	87	80				
AG	31	29	GG/AA	0,920	0,057	14,948
GG	1	1	AG/AA	0,983	0,545	1,774
tot	119	110				

Tabella 17: Variante rs660895: efficacia alla terapia con MTX in dipendenza del genotipo nel genere femminile. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti responder (Y) e non responder (N). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.)

	SI	NO		OR SI/NO	95% C.I.	
AA	81	77	GG/AA AG/AA	-	-	-
AG	36	33		1,037	0,589	1,827
GG	2	0				
tot	119	110				

Tabella 18: Variante rs9275595: efficacia alla terapia con MTX in dipendenza del genotipo nel genere femminile. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti responder (Y) e non responder (N). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.)

	SI	NO		OR SI/NO	95% C.I.	
TT	67	55	CC/TT TC/TT	0,718	0,245	2,105
TC	45	47		0,786	0,457	1,352
CC	7	8				
tot	119	110				

Anche nelle femmine non è stata evidenziata alcuna particolare associazione allo sviluppo di AR.

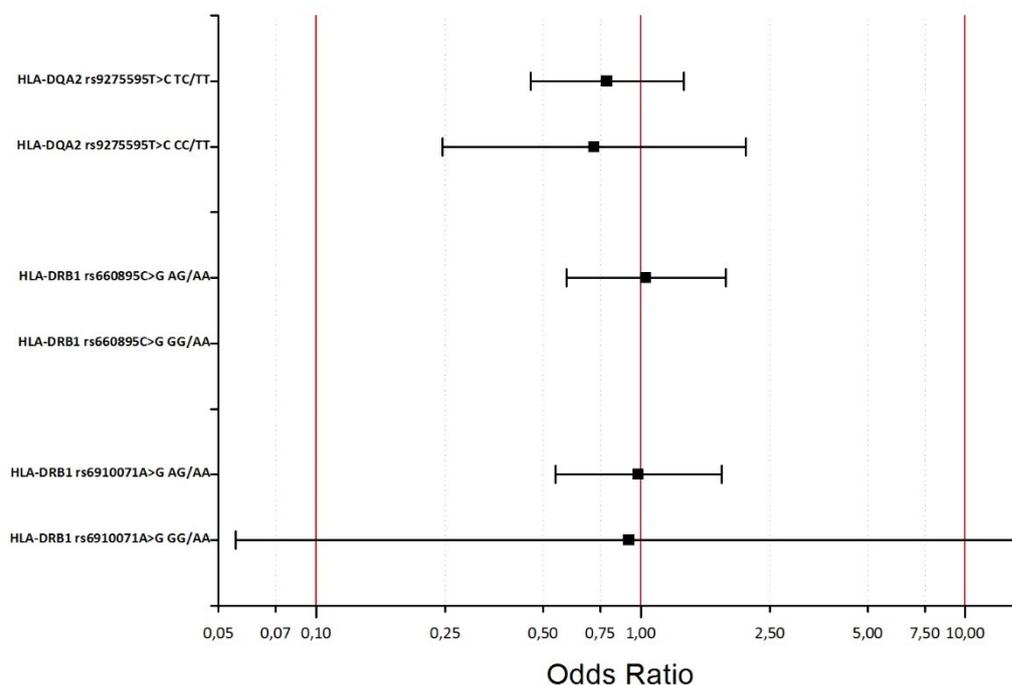


Gráfico 6 Rappresentazione grafica (modello codominante) degli OR relativi all'associazione tra efficacia al trattamento con MTX e genotipo per le varianti rs6910071, rs660895, rs9275595 nel genere femminile.

4.1.4 Associazione tra genotipo e tossicità al MTX

Abbiamo poi valutato la presenza di possibili associazioni tra rs6910071, rs660895 e rs9275595 e tossicità alla terapia con MTX.

Tabella 19: Variante rs6910071: tossicità della terapia con MTX in dipendenza del genotipo. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti che hanno manifestato tossicità (Y) e pazienti che non hanno manifestato tossicità (N). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.)

	SI	NO		OR SI/NO	95% C.I.		
AA	48	182	GG/AA	-	-	-	
AG	20	57		AG/AA	1,330	0,730	2,425
GG	0	2					
tot	68	241					

Tabella 20: Variante rs660895: tossicità della terapia con MTX in dipendenza del genotipo. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti responder (Y) e non responder (N). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.)

	SI	NO		OR SI/NO	95% C.I.		
AA	51	162	GG/AA	-	-	-	
AG	17	75		AG/AA	0,720	0,390	1,330
GG	0	3					
tot	68	240					

Tabella 21: Variante rs9275595: tossicità della terapia con MTX in dipendenza del genotipo. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti responder (Y) e non responder (N). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.)

	SI	NO		OR SI/NO	95% C.I.		
TT	42	121	CC/TT	0,720	0,228	2,276	
TC	22	105		TC/TT	0,604	0,339	1,076
CC	4	16					
tot	68	242					

In generale non sono state osservate associazioni significative tra le varianti oggetto di studio e l'instaurarsi di eventi avversi legati al trattamento farmacologico.

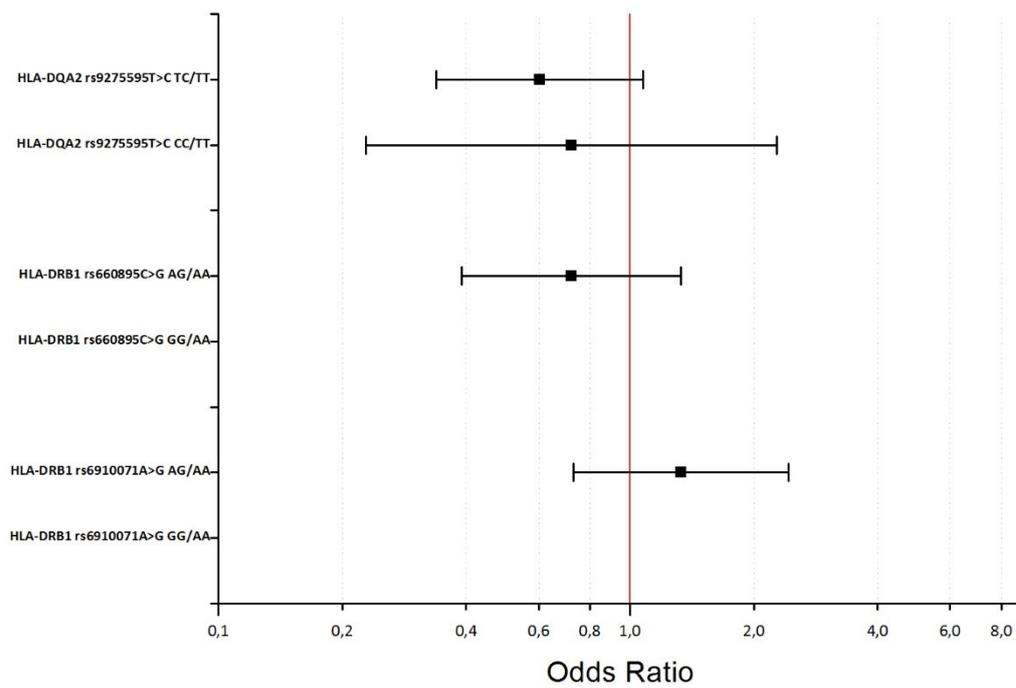


Grafico 7 Rappresentazione grafica (modello codominante) degli OR relativi all'associazione tra tossicità al trattamento con MTX e genotipo per le varianti rs6910071, rs660895, rs9275595.

4.1.5 Associazione tra genotipo e risposta ai farmaci biologici

Per ultimo, è stata analizzata la presenza di associazioni delle tre varianti alla risposta a trattamenti alternativi a base di farmaci biologici, in particolare farmaci anti-TNF α , il cui utilizzo risulta prevalente all'interno della casistica da noi studiata.

Tabella 22: Variante rs6910071: risposta alla terapia con MTX in dipendenza del genotipo. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti responder (Y) e non responder (N). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.)

	SI	NO		OR SI/NO	95% C.I.	
AA	75	23	GG/AA AG/AA	-	-	-
AG	33	3		3,373	0,946	12,023
GG	1	0				
tot	109	26				

Tabella 23: Variante rs660895: risposta alla terapia con MTX in dipendenza del genotipo. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti responder (Y) e non responder (N). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.)

	SI	NO		OR SI/NO	95% C.I.	
AA	78	17	GG/AA AG/AA	-	-	-
AG	30	9		0,726	0,292	1,807
GG	1	0				
tot	109	26				

Tabella 24: Variante rs9275595: risposta alla terapia con MTX in dipendenza del genotipo. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti responder (Y) e non responder (N). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.)

	SI	NO		OR SI/NO	95% C.I.	
TT	53	12	CC/TT TC/TT	2,264	0,264	19,419
TC	46	13		0,801	0,333	1,928
CC	10	1				
tot	109	26				

Dai valori di OR ottenuti non risultano particolari associazioni alla risposta terapeutica ai farmaci biologici, ad eccezione di un leggero trend per quanto riguarda il genotipo AG per rs6910071.

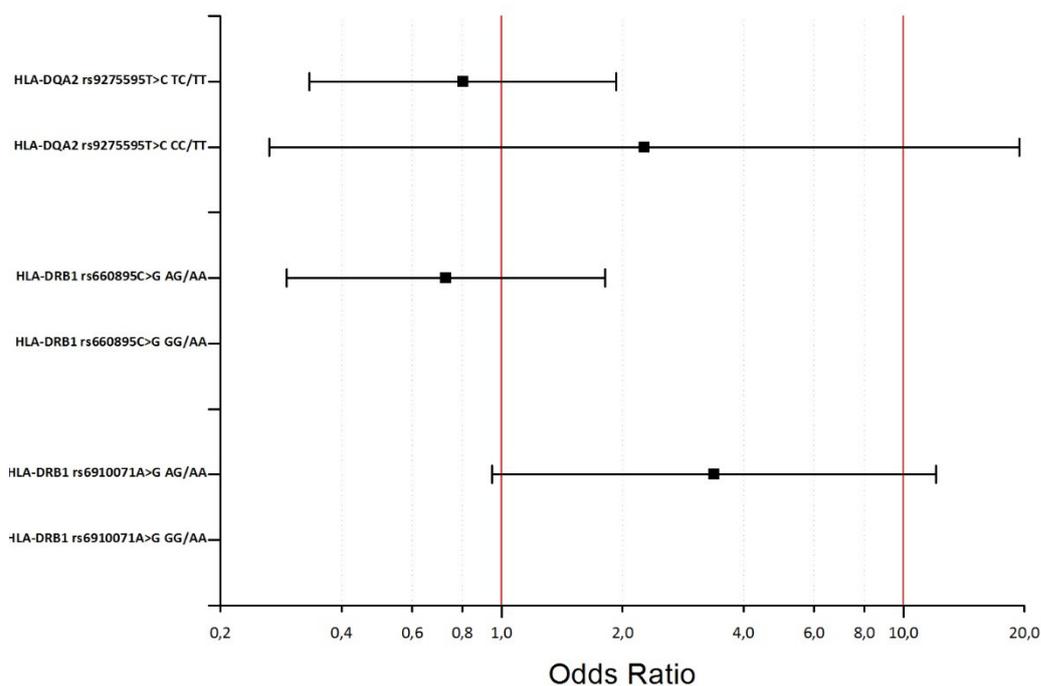


Grafico 8 Rappresentazione grafica (modello codominante) degli OR relativi all'associazione tra risposta al trattamento con farmaci biologici e genotipo per le varianti rs6910071, rs660895, rs9275595.

Abbiamo quindi stratificato la casistica in base al genere d'appartenenza.

MASCHI

Tabella 25: Variante rs6910071: risposta alla terapia con farmaci biologici in dipendenza del genotipo nel genere maschile. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti responder (Y) e non responder (N). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.)

	SI	NO		OR SI/NO	95% C.I.	
AA	17	3				
AG	6	1	GG/AA	-	-	-
GG	0	0	AG/AA	1,059	0,092	12,235
tot	23	4				

Tabella 26: Variante rs660895: risposta alla terapia con farmaci biologici in dipendenza del genotipo nel genere maschile. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti responder (Y) e non responder (N). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.)

	SI	NO		OR SI/NO	95% C.I.	
AA	16	2				
AG	6	2	GG/AA	-	-	-
GG	1	0	AG/AA	0,375	0,043	3,294
tot	23	4				

Tabella 27: Variante rs9275595: risposta alla terapia con farmaci biologici in dipendenza del genotipo nel genere maschile. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti responder (Y) e non responder (N). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.)

	SI	NO	OR SI/NO 95% C.I.		
TT	11	2			
TC	10	2			
CC	2	0			
tot	23	4			
			CC/TT	-	-
			TC/TT	0,909	0,107 7,718

Negli uomini è rimasta confermata l'assenza d'associazione in ognuna delle tre varianti.

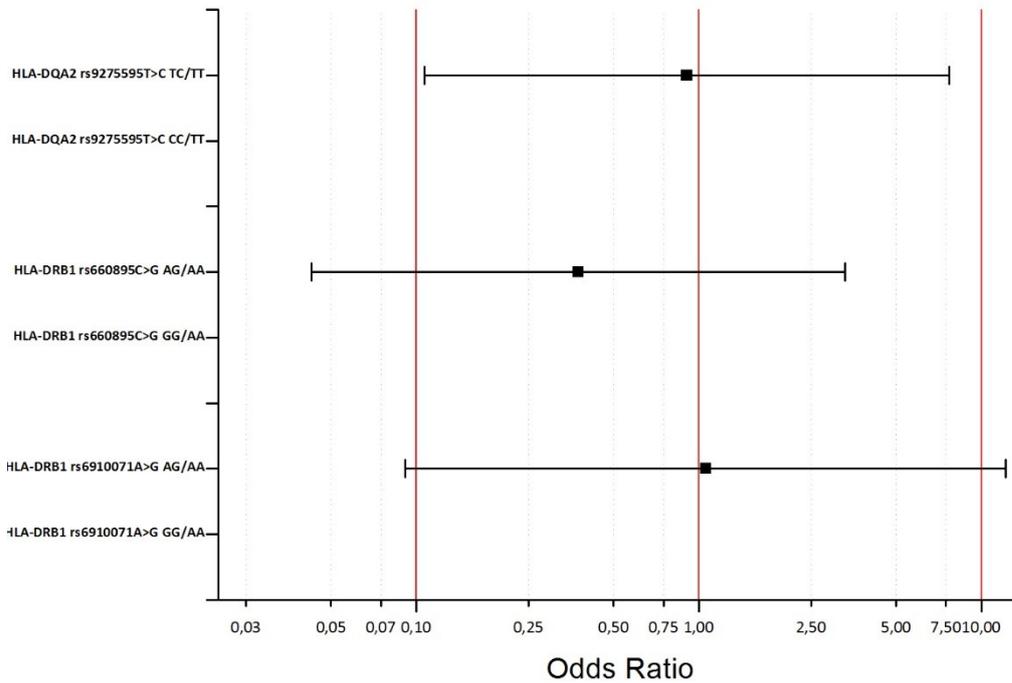


Grafico 9 Rappresentazione grafica (modello codominante) degli OR relativi all'associazione tra risposta al trattamento con farmaci biologici e genotipo per le varianti rs6910071, rs660895, rs9275595 nel genere maschile.

FEMMINE

Tabella 28: Variante rs6910071: risposta alla terapia con farmaci biologici in dipendenza del genotipo nel genere maschile. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti responder (Y) e non responder (N). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.)

	SI	NO		OR SI/NO	95% C.I.	
AA	58	20				
AG	27	2	GG/AA	-	-	-
GG	1	0	AG/AA	4,655	1,014	21,362
tot	86	22				

Tabella 29: Variante rs660895: risposta alla terapia con farmaci biologici in dipendenza del genotipo nel genere maschile. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti responder (Y) e non responder (N). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.)

	SI	NO		OR SI/NO	95% C.I.	
AA	62	15				
AG	24	7	GG/AA	-	-	-
GG	0	0	AG/AA	0,829	0,301	2,285
tot	86	22				

Tabella 30: Variante rs9275595: risposta alla terapia con farmaci biologici in dipendenza del genotipo nel genere maschile. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti responder (Y) e non responder (N). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.)

	SI	NO		OR SI/NO	95% C.I.	
TT	42	10				
TC	36	11	CC/TT	1,905	0,213	17,025
CC	8	1	TC/TT	0,779	0,297	2,046
tot	86	22				

Al contrario nelle femmine è stata individuata una forte associazione tra la variante rs6910071 e la risposta al trattamento con biologici, confermando il trend osservato all'interno della casistica generale. Donne con genotipo AG hanno infatti evidenziato un OR pari a 4,655 significativo ($p=0,003$).

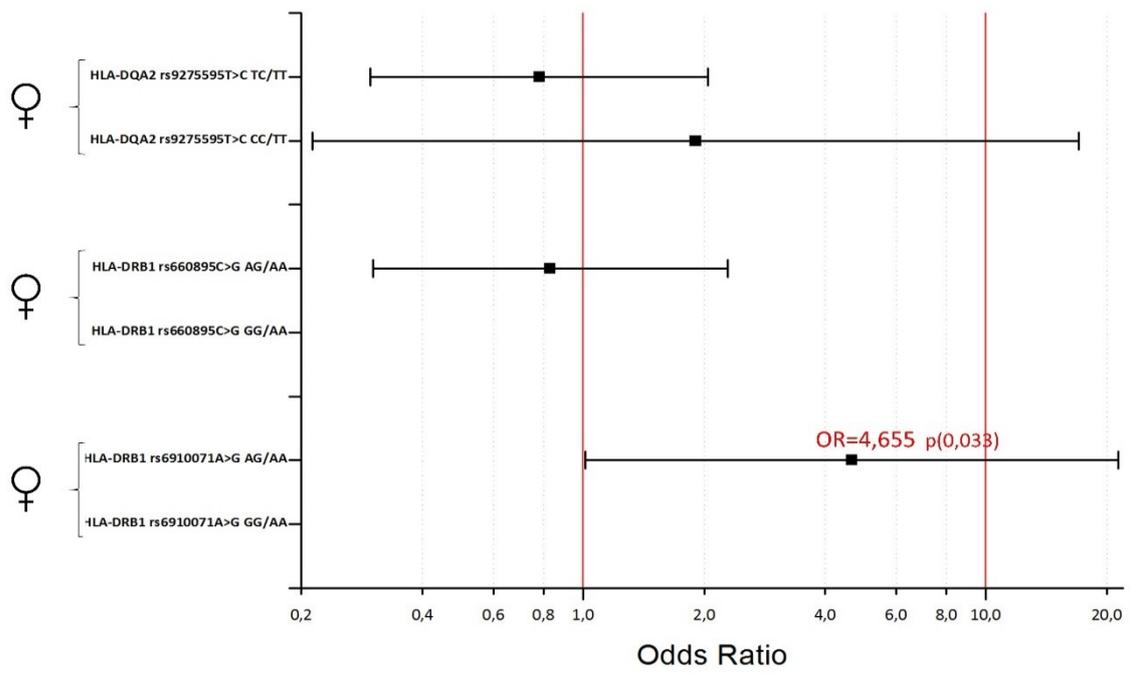


Grafico 10 Rappresentazione grafica (modello codominante) degli OR relativi all'associazione tra risposta al trattamento con farmaci biologici e genotipo per le varianti rs6910071, rs660895, rs9275595 nel genere femminile.

4.2 HLA-G

L'Artrite Reumatoide appartiene ad un gruppo eterogeneo di patologie, caratterizzate da un complesso meccanismo di ereditarietà genetica, virtualmente in grado di colpire diversi organi e tessuti, producendo una vasta gamma di fenotipi clinici. Fin da quando è stato realizzato che alterazioni al meccanismo di presentazione dell'antigene alle cellule T poteva condurre alla produzione di linfociti T o anticorpi autoreattivi, i geni codificanti per questa tipologia di molecole sono stati considerati come principali candidati allo sviluppo di questa malattia. Accertato che l'autoimmunità scaturisce dalla rottura dei meccanismi di immunotolleranza e considerato che HLA-G è ritenuta una molecola tollerogena, HLA-G è risultato un locus d'interesse per quanto riguarda l'occorrenza e la farmacogenetica dell'AR. Nello specifico HLA-G è una molecola non classica appartenente ad HLA di classe Ib, dotata di proprietà immunomodulatoria nei confronti dell'attività citotossica delle cellule *natural killer* (NK), dei linfociti CD8+, CD4+ e della funzione delle cellule dendritiche (Dorling et al., 2000) (Bainbridge et al., 2000). Il gene, localizzato sul cromosoma 6p21.31, contiene una inserzione (I)/delezione (D) di 14bp (rs1704) ed il polimorfismo +3142 C>G (rs1063320), posizionato nella regione 3' non tradotta (3'UTR) di HLA-G.

L'espressione di HLA-G è influenzata dai polimorfismi HLA-G 14 bp ins(I)/del (D) and +3142 C>G. HLA-G 14 bp I/D agisce sulla funzione di HLA-G influenzando la stabilità ed il *pattern* di *splicing* dell'mRNA (Rousseau et al., 2003). L'allele G di HLA-G +3142 C>G crea un sito di legame che favorisce l'affinità per alcuni microRNA (miRNA) (miR-148a, miR-148b, and miR-152), risultante in una ridotta espressione di HLA-G (Tan et al., 2007). In diversi studi, questi polimorfismi sono stati associati ad occorrenza di AR così come ad altre patologie autoimmuni, ma in alcuni casi con risultati controversi. La ragione di questa disparità potrebbe esser imputata a diversi fattori: una ridotta grandezza dei campioni studiati, un basso potere statistico o eterogeneità clinica. Nello studio di Catamo et al., l'aplotipo costituito dall'inserzione di 14bp e dalla variante G dell'rs1610696, è risultato più frequente nei pazienti affetti da AR rispetto ai controlli, mostrando associazione all'incremento del rischio di sviluppo della malattia (OR=9.34 ; 95% IC 1.28–411.38) (Catamo et al., 2014). Veit et al., invece hanno osservato un'associazione tra il genotipo GG di rs1063320 e un aumento del rischio di sviluppare AR, suggerendo l'ipotetico ruolo di marcatore di questo SNP per la suscettibilità alla malattia (Veit et al., 2014).

Dal punto di vista della farmacogenetica sono state riscontrate importanti evidenze, ottenute da uno studio prospettico, relative al coinvolgimento del polimorfismo HLA-G 14 bp I/D, nello specifico dell'allele D, in un miglioramento dello stato patologico dei pazienti. I risultati ottenuti, in linea con un precedente studio svolto su 156 pazienti trattati con DMARDs (Rizzo et al., 2006), hanno confermato un incremento della frequenza del genotipo DD in pazienti con riduzione dell'attività di malattia dopo 6 mesi di trattamento.

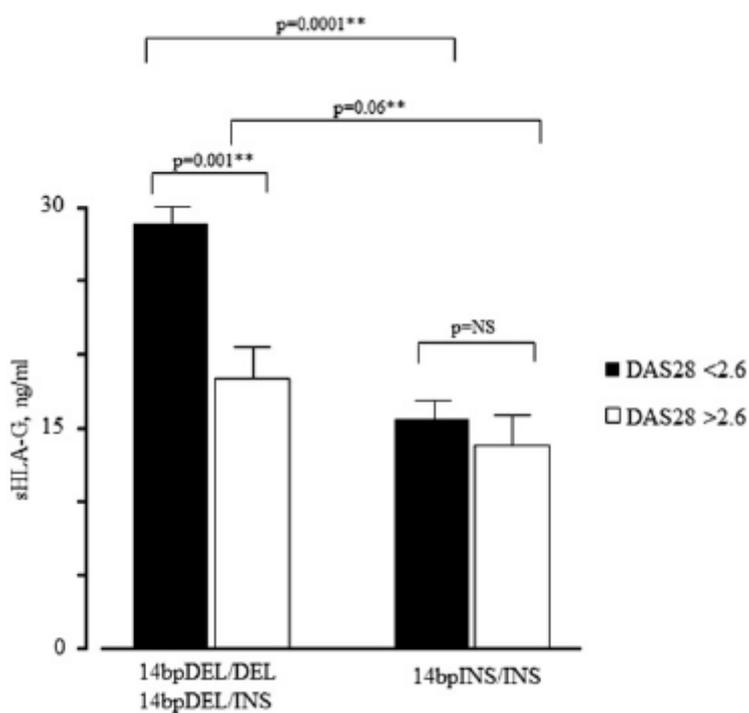


Figura 24 Distribuzione del polimorfismo HLA-G 14 bp I/D in pazienti con artrite reumatoide in fase precoce (Early Rheumatoid Arthritis, ERA). I pazienti ERA sono stati suddivisi in base allo score di DAS28 in pazienti in remissione (<2.6) e pazienti con patologia attiva (>2.6). ** χ^2 test (Rizzo et al., 2013).

Inoltre è stato osservato un aumento dei livelli di sHLA-G (*soluble HLA-G*) in pazienti soggetti a miglioramento dello stato di malattia durante il trattamento (Rizzo et al., 2013). Anche Verbruggen et al., hanno riscontrato che pazienti affetti da AR evidenziavano livelli ridotti di sHLA-G rispetto ai controlli (Verbruggen et al., 2006).

Abbiamo quindi deciso di valutare l'associazione tra i polimorfismi HLA-G 14bp ins/del, +3142 C>G (rs1063320) e l'occorrenza di malattia all'interno della nostra casistica. Successivamente abbiamo indagato l'influenza che questi SNPs possono avere nella farmacogenetica della patologia.

4.2.1 Frequenze alleliche e genotipiche

HLA-G 14bp ins/del

Tabella 31: frequenze genotipiche e alleliche relative del polimorfismo HLA-G 14bp ins/del nella casistica studiata. Sono mostrati i dati relativi a casi e controlli. In nero sono: il conteggio dei soggetti per ogni genotipo (N) e le loro relative frequenze.

Casi		
DD	108	33,5%
DI	147	45,7%
II	67	20,8%
D	363	56,4%
I	281	43,6%
Controlli		
DD	142	36,3%
DI	197	50,4%
II	52	13,3%
D	481	61,5%
I	301	38,5%

rs1063320

Tabella 32: frequenze genotipiche e alleliche relative del polimorfismo rs1063320 nella casistica studiata. Sono mostrati i dati relativi a casi e controlli. In nero sono: il conteggio dei soggetti per ogni genotipo (N) e le loro relative frequenze

Casi		
CC	66	20,8%
CG	157	49,5%
GG	94	29,7%
C	289	45,6%
G	345	54,4%
Controlli		
CC	73	20,3%
CG	202	56,1%
GG	85	23,6%
C	348	48,3%
G	372	51,7%

4.2.2 Associazione tra genotipo ed occorrenza di Artrite Reumatoide

Come per i polimorfismi analizzati per la regione HLA-D, è stata eseguito il calcolo dell'associazione tra le varianti rs1063320 ed HLA-G 14bp del, associate al gene HLA-G, e l'occorrenza di malattia. Nella tabelle seguenti, sono riportati i valori dell'Odds Ratio (OR) calcolati tra casi e controlli, relativi ai genotipi delle varianti analizzate.

Tabella 33: Variante HLA-G 14bp ins: occorrenza di malattia in dipendenza del genotipo. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti affetti da AR (casi) e controlli sani (ctrl). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di

	OR caso/ctrl	95% C.I.	
II/DD	1,694	1,091	2,631
DI/DD	0,981	0,706	1,363

Tabella 34.: Variante rs1063320: occorrenza di malattia in dipendenza del genotipo. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti affetti da AR (casi) e controlli sani (ctrl). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.).

	OR caso/ctrl	95% C.I.	
GG/CC	1,223	0,785	1,906
CG/CC	0,860	0,580	1,273

Individui con genotipo II per la variante HLA-G 14bp ins, hanno mostrato associazione all'occorrenza di Artrite Reumatoide (OR=1,694; p=0,018).

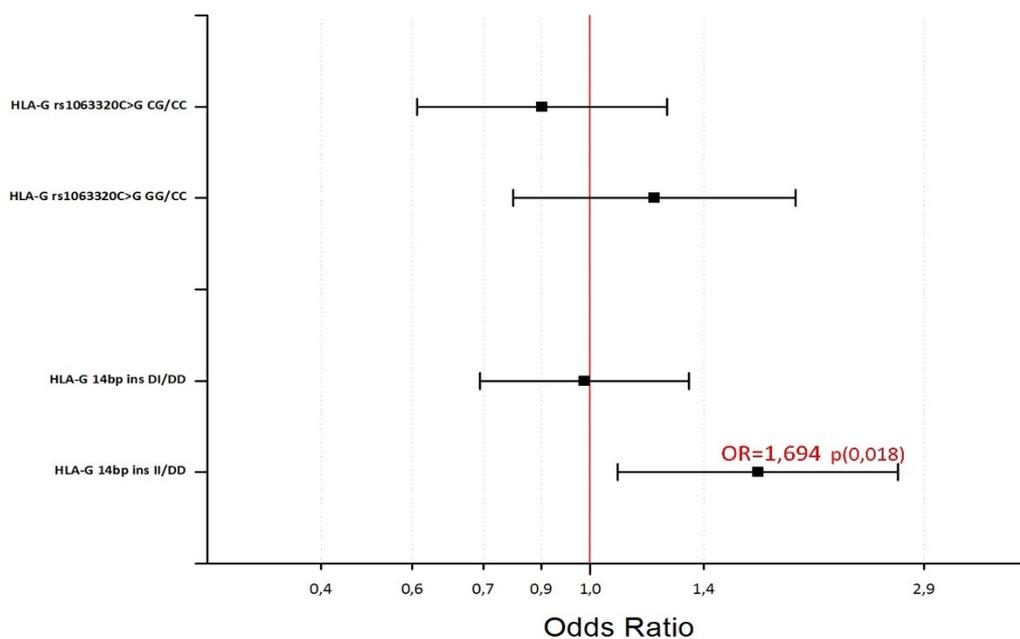


Grafico 11: Rappresentazione grafica (modello codominante) degli OR relativi all'associazione tra genotipo delle varianti HLA-G 14bp ins, rs1063320 ed occorrenza di AR.

MASCHI

Tabella 35: Variante HLA-G 14bp ins: occorrenza di malattia in dipendenza del genotipo nel genere maschile. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti affetti da AR (casi) e controlli sani (ctrl). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.).

	casi	ctrl		OR caso/ctrl	95% C.I.	
DD	26	77	II/DD	1,526	0,732	3,181
DI	35	98				
II	17	33				
tot	78	208				
			DI/DD	1,058	0,587	1,906

Tabella 36: Variante rs1063320: occorrenza di malattia in dipendenza del genotipo nel genere maschile. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti affetti da AR (casi) e controlli sani (ctrl). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.).

	casi	ctrl		OR caso/ctrl	95% C.I.	
CC	17	43	GG/CC	1,167	0,556	2,450
CG	36	105				
GG	24	52				
tot	77	200	CG/CC	0,867	0,441	1,707

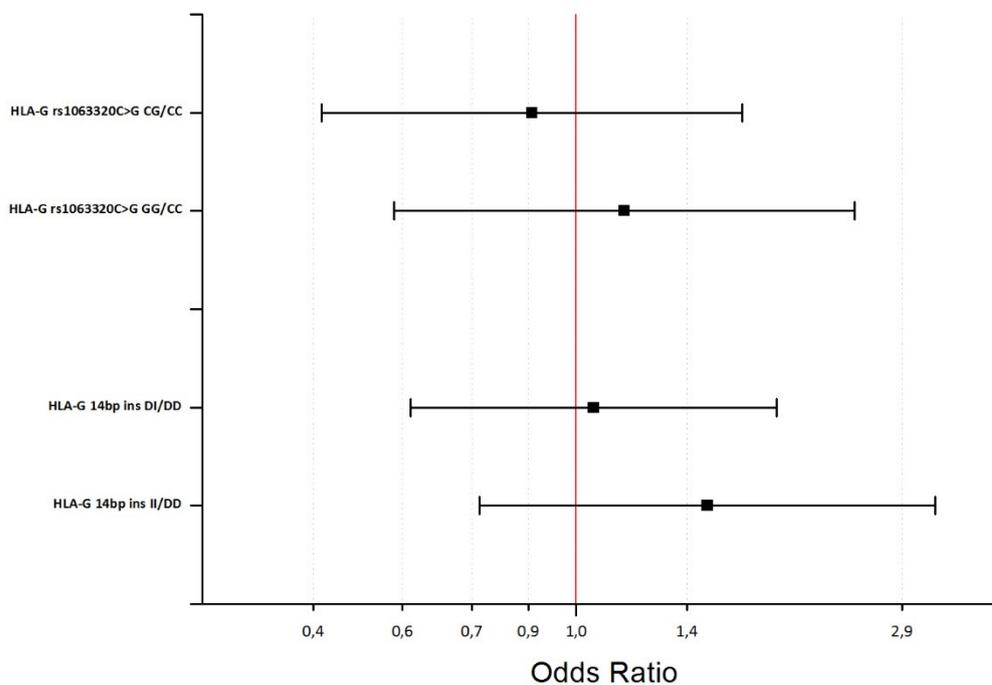


Grafico 12 Rappresentazione grafica (modello codominante) degli OR relativi all'associazione tra genotipo delle varianti HLA-G 14bp ins, rs1063320 ed occorrenza di AR nel genere maschile.

FEMMINE

Tabella 37: Variante HLA-G 14bp ins: occorrenza di malattia in dipendenza del genotipo nel genere femminile. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti affetti da AR (casi) e controlli sani (ctrl). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.).

	casi	ctrl		OR caso/ctrl	95% C.I.		
DD	81	56	II/DD	1,920	1,015	3,633	
DI	114	95					
II	50	18		DI/DD	0,830	0,536	1,283
tot	245	169					

Tabella 38: Variante rs1063320: occorrenza di malattia in dipendenza del genotipo nel genere femminile. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti affetti da AR (casi) e controlli sani (ctrl). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.).

	casi	ctrl		OR caso/ctrl	95% C.I.	
CC	49	26	GG/CC	1,198	0,634	2,264
CG	122	89				
GG	70	31	CG/CC	0,727	0,420	1,259
tot	241	146				

L'associazione tra l'inserzione di 14bp e sviluppo di AR evidenziata precedentemente tra i pazienti risulta soprattutto a carico degli individui di sesso femminile. In seguito a stratificazione della casistica per genere è emerso che femmine omozigoti per l'inserzione presentano un rischio di occorrenza pari a 1,920 ($p=0,043$).

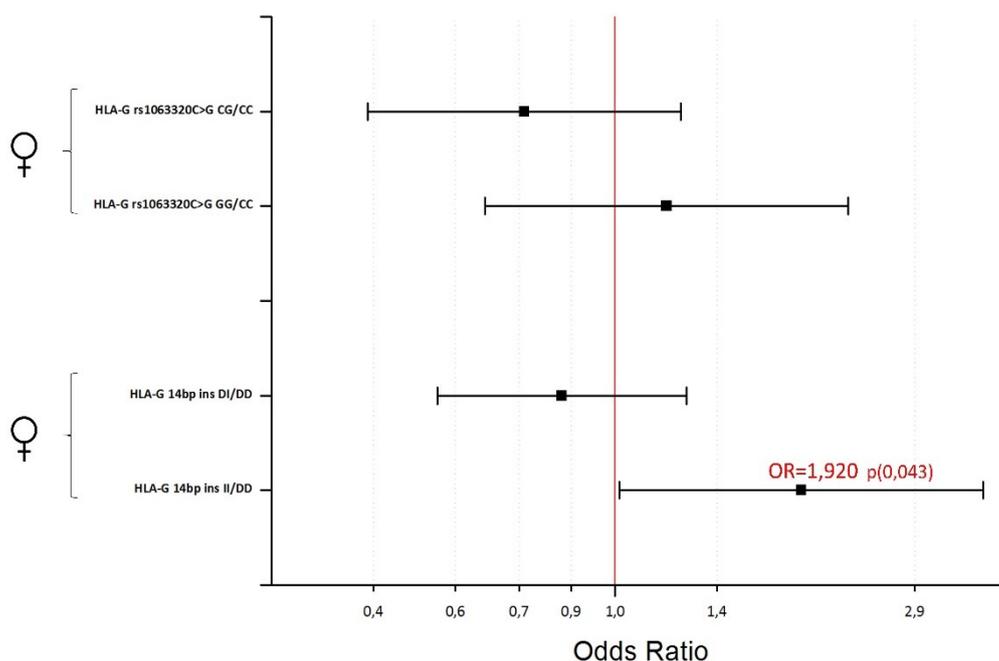


Grafico 13 Rappresentazione grafica (modello codominante) degli OR relativi all'associazione tra genotipo delle varianti HLA-G 14bp ins, rs1063320 ed occorrenza di AR nel genere femminile.

4.2.3 Associazione tra genotipo e efficacia al MTX

Tabella 39: Variante HLA-G 14bp ins: risposta alla terapia con MTX in dipendenza del genotipo. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti responder (Y) e non responder (N). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.)

	SI	NO		OR SI/NO 95% C.I.		
DD	65	39	II/DD DI/DD	0,800	0,423	1,514
DI	66	71				
II	36	27		0,558	0,332	0,938
tot	167	137				

Tabella 40: Variante rs1063320: risposta alla terapia con MTX in dipendenza del genotipo. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti responder (Y) e non responder (N). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.)

	SI	NO		OR SI/NO 95% C.I.		
CC	43	23	GG/CC	0,615	0,318	1,190
CG	75	73				
GG	46	40	CG/CC	0,550	0,302	1,002
tot	164	136				

Individui caratterizzati da genotipo DI per HLA-G 14bp ins/del mostrano scarsa risposta al trattamento con MTX (OR=0,558; p=0,027). È stato osservato inoltre una tendenza alla non risposta alla terapia in individui con genotipo CG per lo SNP rs1063320. La significatività per il valore di OR riscontrato appare però border line.

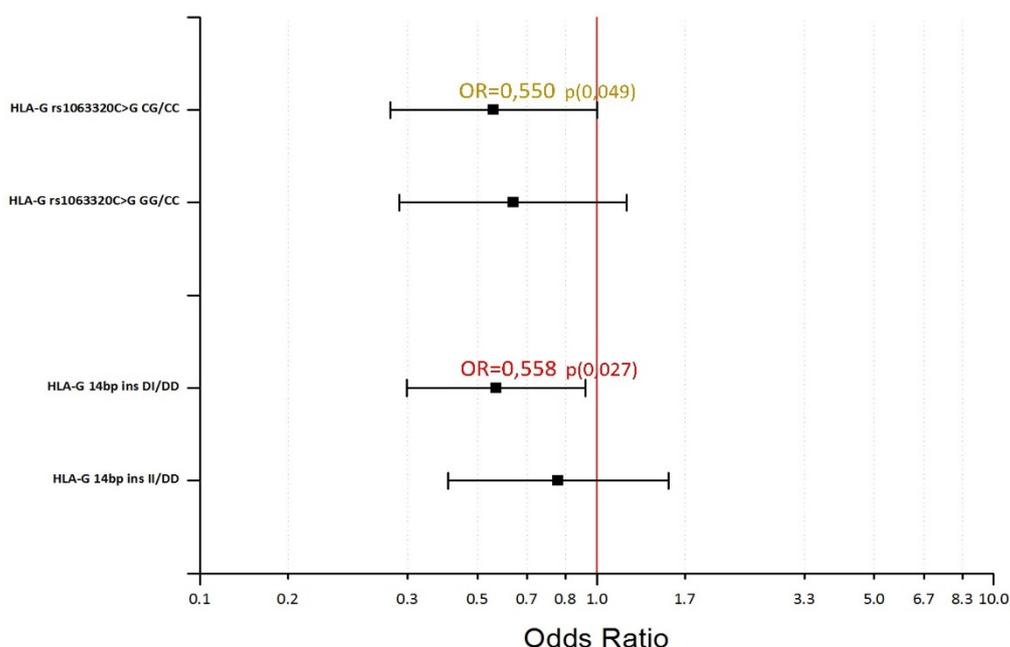


Grafico 14 Rappresentazione grafica (modello codominante) degli OR relativi all'associazione tra risposta al trattamento con MTX e genotipo per le varianti HLA-G 14bp ins, rs1063320.

Abbiamo ulteriormente approfondito l'analisi stratificando la casistica in base al sesso.

MASCHI

Tabella 41: Variante HLA-G 14bp ins: risposta alla terapia con MTX in dipendenza del genotipo nel genere maschile. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti responder (Y) e non responder (N). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.)

	SI	NO		OR SI/NO	95% C.I.	
DD	14	11	II/DD	1,729	0,462	6,468
DI	22	9				
II	11	5				
tot	47	25				
			DI/DD	1,921	0,635	5,810

Tabella 42: Variante rs1063320: risposta alla terapia con MTX in dipendenza del genotipo nel genere maschile. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti responder (Y) e non responder (N). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.)

	SI	NO		OR SI/NO	95% C.I.	
CC	10	7	GG/CC	1,500	0,401	5,605
CG	21	11				
GG	15	7				
tot	46	25	CG/CC	1,336	0,398	4,483

Nella casistica maschile non sono state evidenziate particolari associazioni per entrambe le varianti.

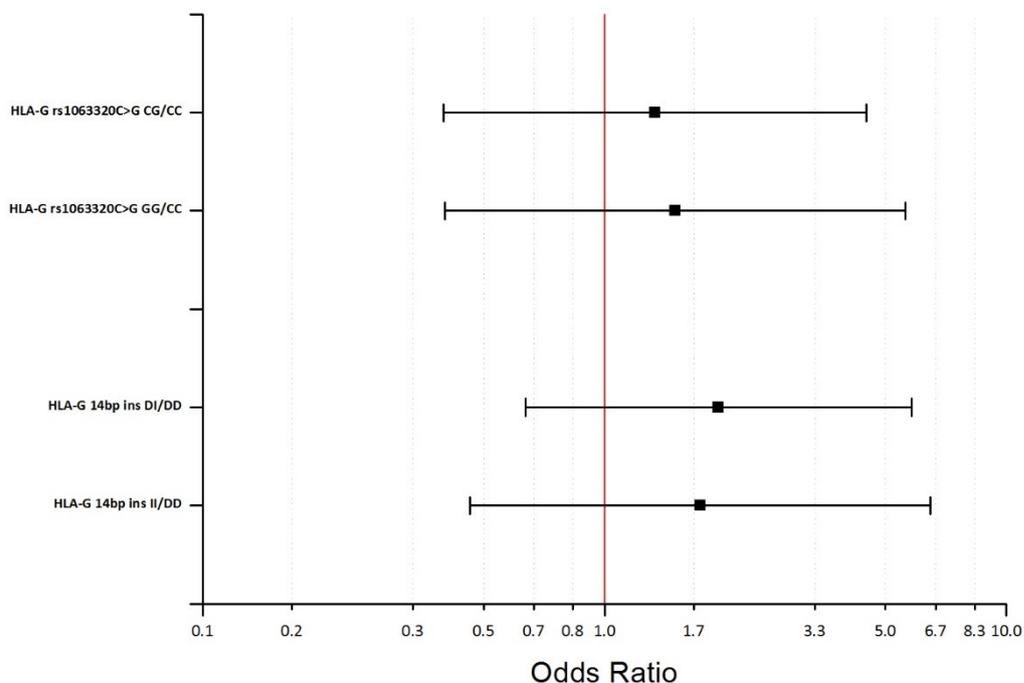


Grafico 15 Rappresentazione grafica (modello codominante) degli OR relativi all'associazione tra risposta al trattamento con MTX e genotipo per le varianti HLA-G 14bp ins, rs1063320 nel genere maschile.

FEMMINE

Tabella 43: Variante HLA-G 14bp del: risposta alla terapia con MTX in dipendenza del genotipo nel genere femminile. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti responder (Y) e non responder (N). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.)

	SI	NO		OR SI/NO	95% C.I.				
DD	51	27	II/DD DI/DD	0,602	0,287	1,259			
DI	44	62							
II	25	22							
tot	120	111					0,376	0,205	0,689

Tabella 44: Variante rs1063320: risposta alla terapia con MTX in dipendenza del genotipo nel genere femminile. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti responder (Y) e non responder (N). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.)

	SI	NO		OR SI/NO	95% C.I.	
CC	33	16	GG/CC CG/CC	0,455	0,210	0,986
CG	54	61				
GG	31	33				
tot	118	110		0,429	0,213	0,865

Nel genere femminile, pazienti CG e GG per rs1063320 hanno mostrato scarsa associazione alla risposta a MTX, con rispettivi valori di OR di 0,016 e 0,044, entrambi significativi. È apparsa inoltre associazione a scarsa risposta alla terapia in donne eterozigoti per 14bp ins (OR=0,376; p=0,001).

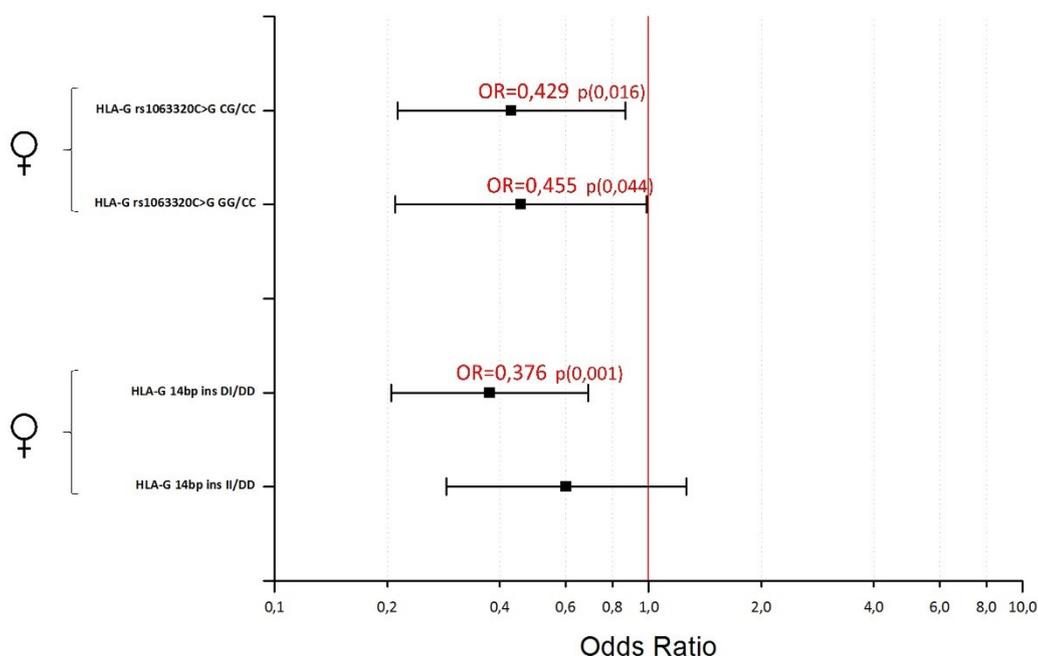


Grafico 16 Rappresentazione grafica (modello codominante) degli OR relativi all'associazione tra risposta al trattamento con MTX e genotipo per le varianti HLA-G 14bp ins, rs1063320 nel genere femminile.

4.2.4 Associazione tra genotipo e tossicità al MTX

Tabella 45: Variante HLA-G 14bp ins: tossicità della terapia con MTX in dipendenza del genotipo. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti che hanno manifestato tossicità (Y) e pazienti che non hanno manifestato tossicità (N). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.)

	SI	NO		OR SI/NO	95% C.I.	
AA	23	83	GG/AA	0,833	0,382	1,815
AG	33	109				
GG	12	52				
tot	68	244				
			AG/AA	1,093	0,597	1,999

Tabella 46: Variante 1063320: tossicità della terapia con MTX in dipendenza del genotipo. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti responder (Y) e non responder (N). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.).

	SI	NO		OR SI/NO	95% C.I.	
AA	11	55	GG/AA	1,111	0,478	2,584
AG	40	114				
GG	16	72				
tot	67	241				
			AG/AA	1,754	0,836	3,680

Da un'analisi generale della casistica, non sono emerse associazioni tra eventi avversi dovuti alla terapia con MTX e le varianti studiate.

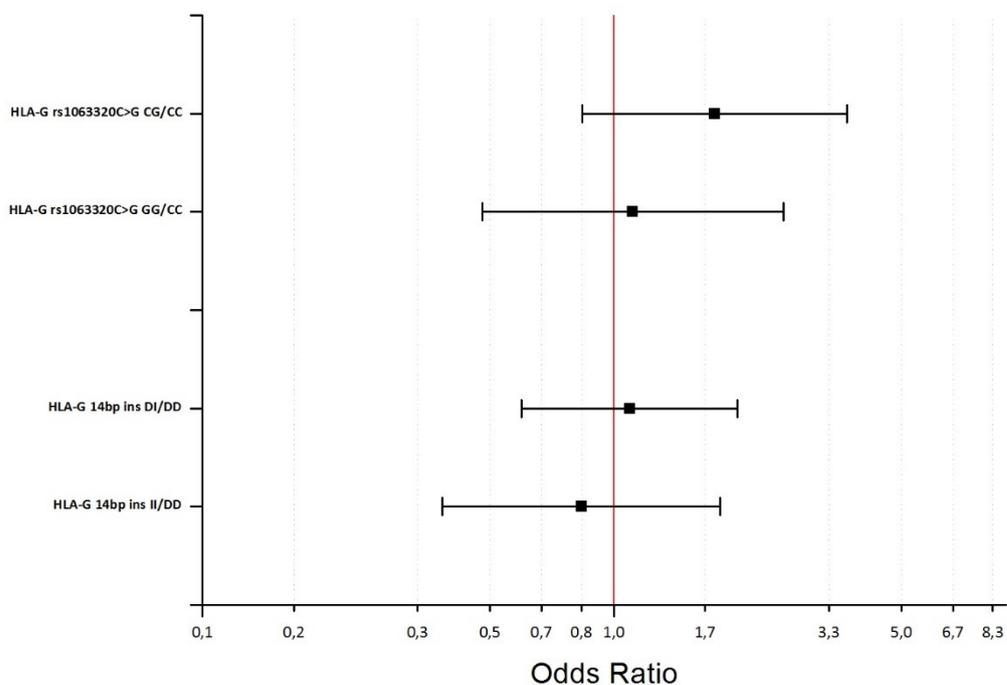


Gráfico 17 Rappresentazione grafica (modello codominante) degli OR relativi all'associazione tra tossicità al trattamento con MTX e genotipo per le varianti HLA-G 14bp ins, rs1063320.

Abbiamo effettuato la stratificazione della casistica in base al sesso al fine di approfondire la ricerca di eventuali associazioni legate al genere d'appartenenza.

MASCHI

Tabella 47: Variante HLA-G 14bp del: tossicità della terapia con MTX in dipendenza del genotipo nel genere maschile. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti che hanno manifestato tossicità (Y) e pazienti che non hanno manifestato tossicità (N). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.)

	SI	NO		OR SI/NO		95% C.I.
AA	5	21				
AG	5	28	GG/AA	0,600	0,102	3,536
GG	2	14	AG/AA	0,750	0,192	2,930
tot	12	63				

Tabella 48: Variante 1063320: tossicità della terapia con MTX in dipendenza del genotipo nel genere maschile. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti responder (Y) e non responder (N). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.)

	SI	NO		OR SI/NO		95% C.I.
AA	2	15				
AG	7	28	GG/AA	1,184	0,175	8,021
GG	3	19	AG/AA	1,875	0,345	10,182
tot	12	62				

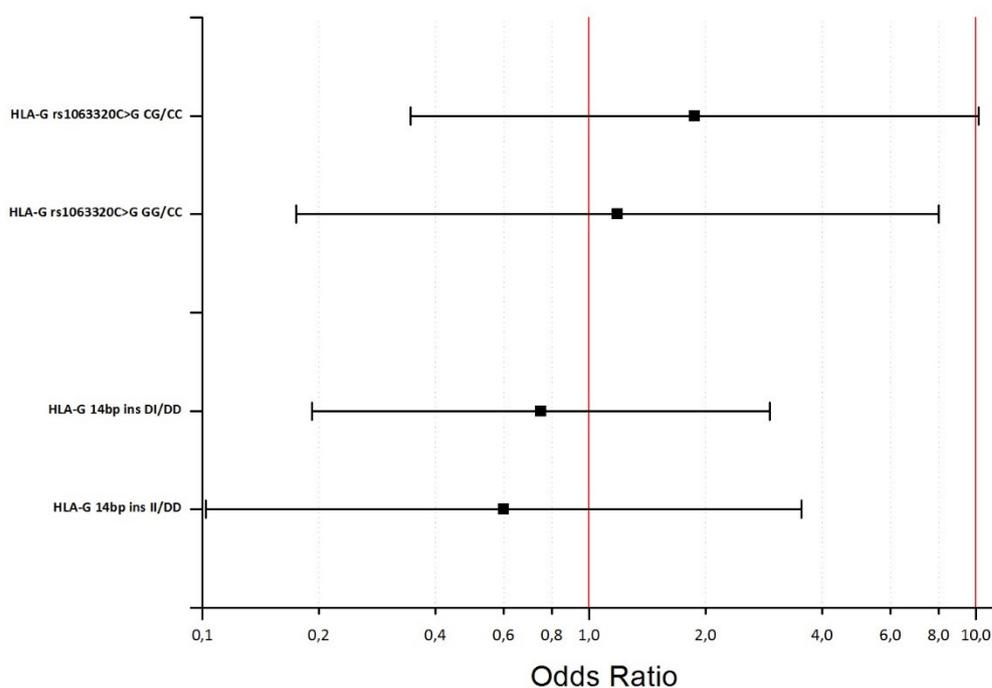


Gráfico 18 Rappresentazione grafica (modello codominante) degli OR relativi all'associazione tra tossicità al trattamento con MTX e genotipo per le varianti HLA-G 14bp ins, rs1063320 nel genere maschile.

FEMMINE

Tabella 49: Variante HLA-G 14bp del: tossicità della terapia con MTX in dipendenza del genotipo nel genere femminile. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti che hanno manifestato tossicità (Y) e pazienti che non hanno manifestato tossicità (N). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.)

	SI	NO		OR SI/NO	95% C.I.	
AA	18	61	GG/AA	0,892	0,373	2,134
AG	28	81				
GG	10	38				
tot	56	180				
			AG/AA	1,171	0,594	2,310

Tabella 50: Variante 1063320: tossicità della terapia con MTX in dipendenza del genotipo nel genere femminile. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti responder (Y) e non responder (N). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo i

	SI	NO		OR SI/NO	95% C.I.	
AA	9	40	GG/AA	1,090	0,424	2,802
AG	33	85				
GG	13	53				
tot	55	178				
			AG/AA	1,725	0,754	3,947

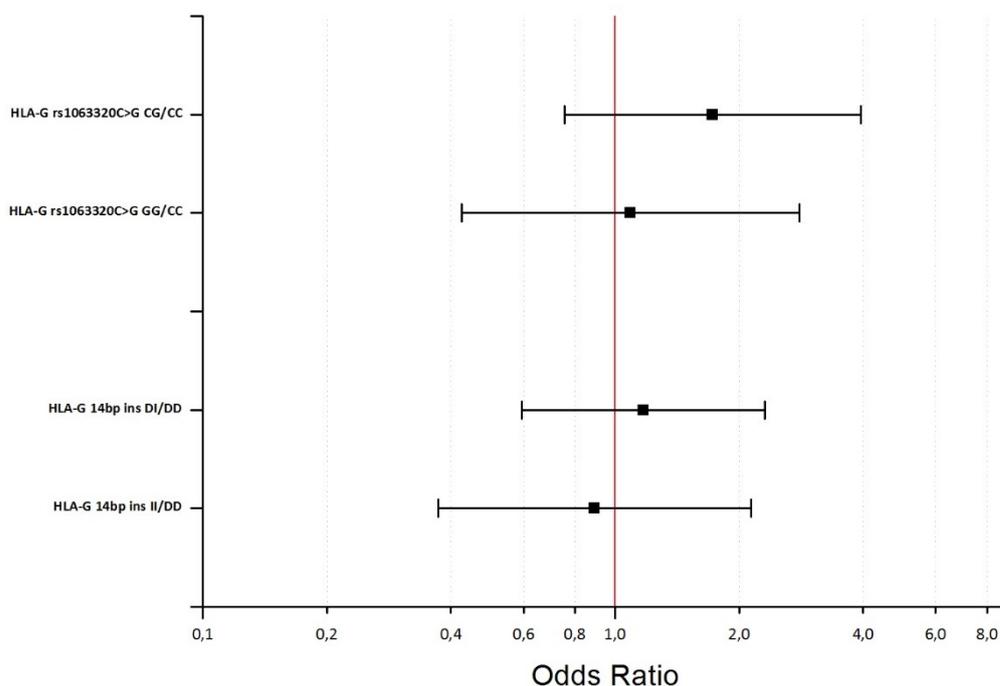


Grafico 19 Rappresentazione grafica (modello codominante) degli OR relativi all'associazione tra tossicità al trattamento con MTX e genotipo per le varianti HLA-G 14bp ins, rs1063320 nel genere femminile.

Sia nei maschi che nelle femmine non vi sono state particolari evidenze d'associazione.

4.1.5 Associazione tra genotipo e risposta ai farmaci biologici

Anche in questo caso è stata svolta la ricerca d'associazioni tra le varianti dei polimorfismi HLA-G 14bp ins/del, rs1063320 e la risposta ai farmaci biologici.

Tabella 51: Variante HLA-G 14bp ins: risposta alla terapia con farmaci biologici in dipendenza del genotipo. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti responder (Y) e non responder (N). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.).

	SI	NO		OR SI/NO	95% C.I.	
DD	33	9	II/DD DI/DD	0,864	0,266	2,803
DI	57	11				
II	19	6		1,413	0,531	3,764
tot	109	26				

Tabella 52: Variante rs1063320: risposta alla terapia con farmaci biologici in dipendenza del genotipo. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti responder (Y) e non responder (N). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.).

	SI	NO		OR SI/NO	95% C.I.	
CC	20	6	GG/CC CG/CC	0,764	0,242	2,408
CG	60	9				
GG	28	11		2,000	0,633	6,318
tot	108	26				

I risultati ottenuti sulla casistica totale dimostrano l'assenza d'associazioni.

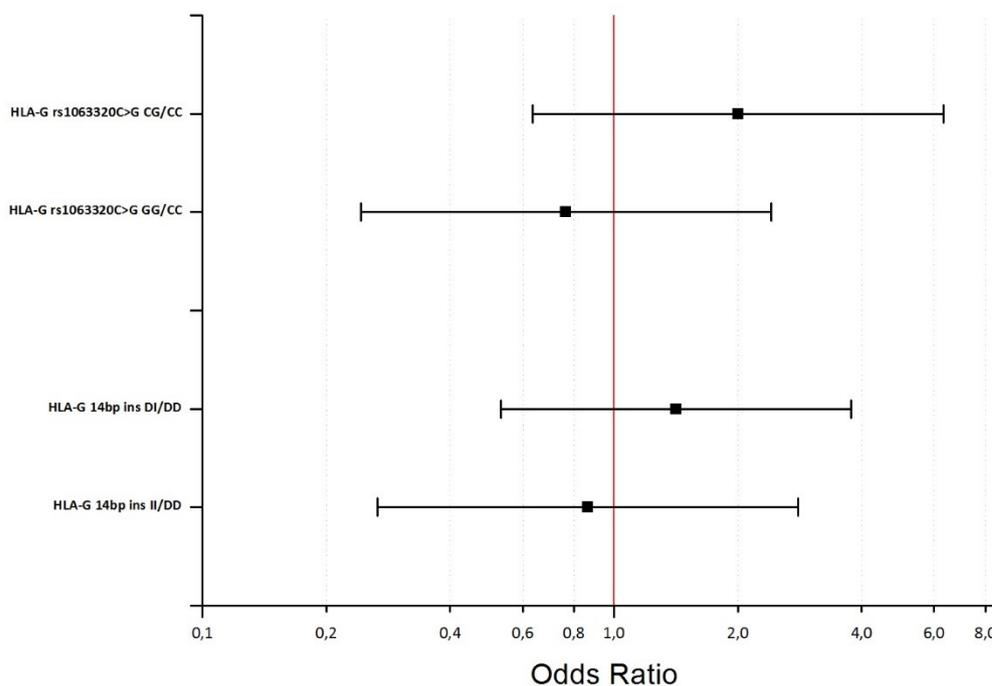


Grafico 20 Rappresentazione grafica (modello codominante) degli OR relativi all'associazione tra risposta al trattamento con farmaci biologici e genotipo per le varianti HLA-G 14bp ins, rs1063320.

MASCHI

Tabella 53: Variante HLA-G 14bp ins: risposta alla terapia con farmaci biologici in dipendenza del genotipo nel genere maschile. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti responder (Y) e non responder (N). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.)

	SI	NO		OR SI/NO	95% C.I.	
DD	11	2	II/DD	0,545	0,036	8,271
DI	9	1				
II	3	1				
tot	23	4				
			DI/DD	1,636	0,127	21,105

Tabella 54: Variante rs1063320: risposta alla terapia con farmaci biologici in dipendenza del genotipo nel genere maschile. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti responder (Y) e non responder (N). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.)

	SI	NO		OR SI/NO	95% C.I.	
CC	8	1	GG/CC	0,313	0,022	4,413
CG	10	1				
GG	5	2				
tot	23	4	CG/CC	1,250	0,067	23,261

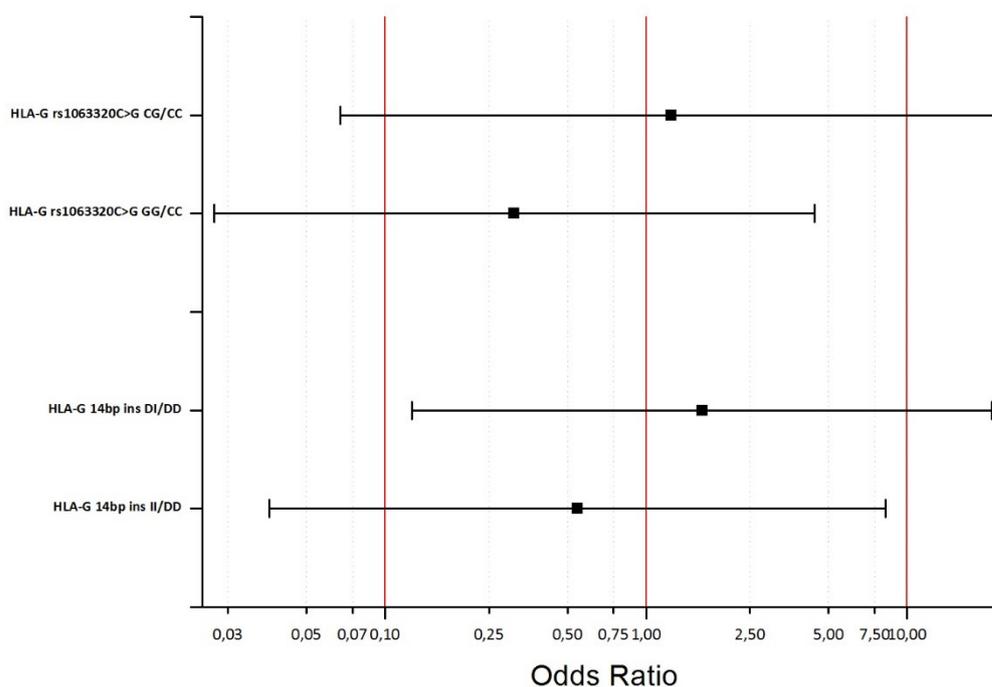


Grafico 21 Rappresentazione grafica (modello codominante) degli OR relativi all'associazione tra risposta al trattamento con farmaci biologici e genotipo per le varianti HLA-G 14bp ins, rs1063320 nel genere maschile.

FEMMINE

Tabella 55: . Variante HLA-G 14bp ins: risposta alla terapia con farmaci biologici in dipendenza del genotipo nel genere femminile. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti responder (Y) e non responder (N). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.)

	SI	NO		OR SI/NO	95% C.I.					
DD	22	7	II/DD	1,018	0,273	3,796				
DI	48	10								
II	16	5					DI/DD	1,527	0,514	4,542
tot	86	22								

Tabella 56: Variante rs1063320: risposta alla terapia con farmaci biologici in dipendenza del genotipo nel genere femminile. In alto: Odds Ratio (OR) calcolato tra pazienti responder (Y) e non responder (N). Per ogni genotipo, a fianco del valore di OR è indicato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% C.I.)

	SI	NO		OR SI/NO	95% C.I.	
CC	12	5	GG/CC	1,065	0,291	3,896
CG	50	8				
GG	23	9	CG/CC	2,604	0,722	9,392
tot	85	22				

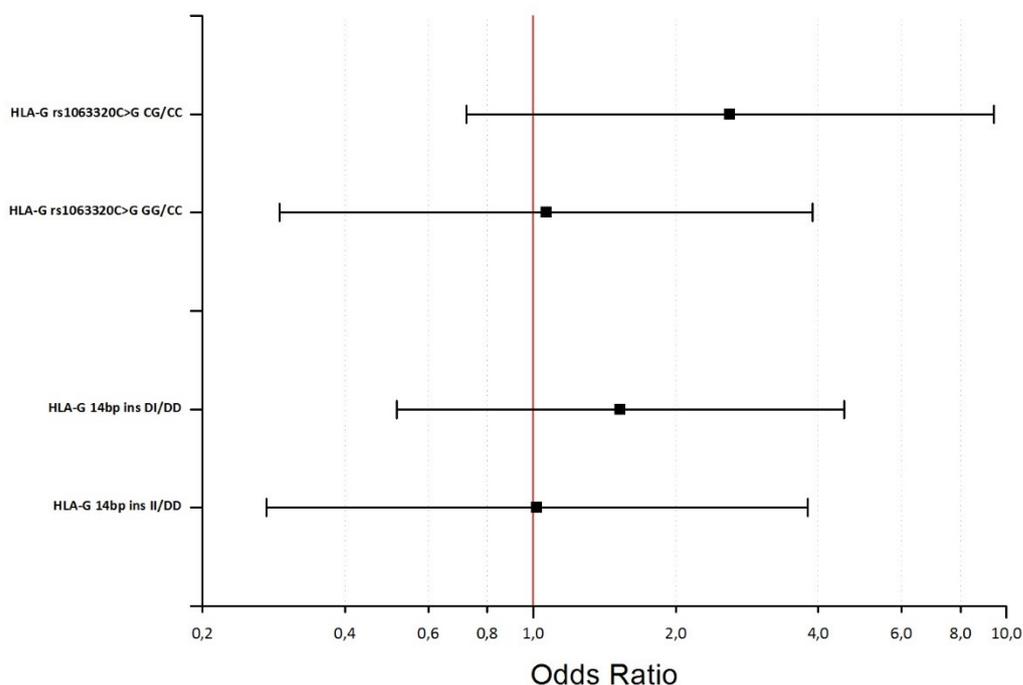


Grafico 22 Rappresentazione grafica (modello codominante) degli OR relativi all'associazione tra risposta al trattamento con farmaci biologici e genotipo per le varianti HLA-G 14bp ins, rs1063320 nel genere femminile.

Anche in seguito a stratificazione per genere, le varianti in questione non sono apparse associate alla risposta al trattamento con farmaci biologici.

4.3 Geni del metabolismo dei folati

Il razionale su cui si attesta l'utilizzo di basse dosi di Methotrexate nel trattamento delle artriti infiammatorie è determinato dal fatto che il farmaco è in grado di: ridurre la sintesi di purine e pirimidine, richieste per la proliferazione cellulare, e inibire la proliferazione delle cellule responsabili dell'infiammazione sinoviale. MTX promuove inoltre il rilascio di mediatori infiammatori endogeni dell'adenosina e produce alcuni effetti farmacologici addizionali quali: la generazione di specie reattive dell'ossigeno attraverso l'attivazione di JNK (*c-Jun N-terminal kinases*), l'induzione dell'apoptosi delle cellule T e l'inibizione di NF- κ B (*Nuclear factor- κ B*). MTX, in quanto noto antagonista dei folati, interferisce con l'omeostasi di questi ultimi. Questo processo finemente regolato a più livelli comprende: assorbimento ed eliminazione cellulare dei folati, metabolismo cellulare e ritenzione dei folati, espressione di enzimi regolatori chiave folato-dipendenti.

Polimorfismi nei geni del metabolismo dei folati e dell'omocisteina risultano di particolare interesse in quanto influenzano il trasporto e gli effetti metabolici di MTX.

Abbiamo quindi investigato sull'influenza esercitata da SNPs presenti nei geni del metabolismo dei folati e dell'omocisteina, sull'occorrenza di AR e sull'efficacia/tossicità alla terapia con MTX e al trattamento con farmaci biologici.

4.3.1 Frequenze alleliche

Sono stati calcolati i valori delle frequenze alleliche relative ai polimorfismi studiati, per soggetti inclusi nella casistica e suddivisi tra casi e controlli. I valori sono riportati nelle Tab. .

CASI

Tabella 57: Varianti dei geni del metabolismo dei folati. In tabella sono riportati per ciascun polimorfismo le frequenze alleliche assolute e relative.

SNPs	ALLELE	N.	FREQ.
<i>CBS 844ins68</i>	D	590	92,5%
	I	48	7,5%
<i>MTHFR 677C>T</i>	C	370	58,0%
	T	268	42,0%
<i>MTHFR 1298C>T</i>	A	425	66,6%
	C	213	33,4%
<i>MTR 2756A>G</i>	A	528	82,8%
	G	110	17,2%
<i>MTRR 66A>G</i>	A	298	46,7%
	G	340	53,3%
<i>SHMT1 1420C>T</i>	C	483	75,7%
	T	155	24,3%
<i>MTHFS 604A>G</i>	A	595	93,3%
	G	43	6,7%
<i>MTHFS XbaIT>G</i>	T	403	64,0%
	G	227	36,0%
<i>MTHFD1 1958G>A</i>	G	360	56,4%
	A	278	43,6%
<i>SLC19A1 80G>A</i>	G	362	57,6%
	A	266	42,4%
<i>TYMS 28bp</i>	2	273	44,8%
	3	337	55,2%
<i>TYMS 6bp del</i>	I	392	61,8%
	DD	242	38,2%
<i>DHFR 19bp del</i>	I	391	61,3%
	DD	247	38,7%
<i>ATIC 347C>G</i>	C	426	66,8%
	G	212	33,2%
<i>TCN2 776C>G</i>	C	394	61,8%
	G	244	38,2%

CONTROLLI

Tabella 58: Varianti dei geni del metabolismo dei folati. In tabella sono riportati per ciascun polimorfismo le frequenze alleliche assolute e relative.

SNPs	ALLELE	N.	FREQ.
<i>CBS 844ins68</i>	D	813	93,0%
	I	61	7,0%
<i>MTHFR 677C>T</i>	C	454	51,8%
	T	422	48,2%
<i>MTHFR 1298C>T</i>	A	624	71,2%
	C	252	28,8%
<i>MTR 2756A>G</i>	A	528	82,8%
	G	110	17,2%
<i>MTRR 66A>G</i>	A	298	46,7%
	G	340	53,3%
<i>SHMT1 1420C>T</i>	C	483	75,7%
	T	155	24,3%
<i>MTHFS 604A>G</i>	A	595	93,3%
	G	43	6,7%
<i>MTHFS XbaIT>G</i>	T	403	64,0%
	G	227	36,0%
<i>MTHFD1 1958G>A</i>	G	360	56,4%
	A	278	43,6%
<i>SLC19A1 80G>A</i>	G	362	57,6%
	A	266	42,4%
<i>TYMS 28bp</i>	2	273	44,8%
	3	337	55,2%
<i>TYMS 6bp del</i>	I	392	61,8%
	DD	242	38,2%
<i>DHFR 19bp del</i>	I	391	61,3%
	DD	247	38,7%
<i>ATIC 347C>G</i>	C	426	66,8%
	G	212	33,2%
<i>TCN2 776C>G</i>	C	394	61,8%
	G	244	38,2%

4.3.2 Associazione tra genotipo ed occorrenza di Artrite Reumatoide

Siamo andati a verificare la presenza di associazioni tra varianti presenti in geni coinvolti nel metabolismo dei folati e dell'omocisteina e lo sviluppo di Artrite Reumatoide. Nel grafico che segue sono rappresentati i valori di OR delle varianti analizzate.

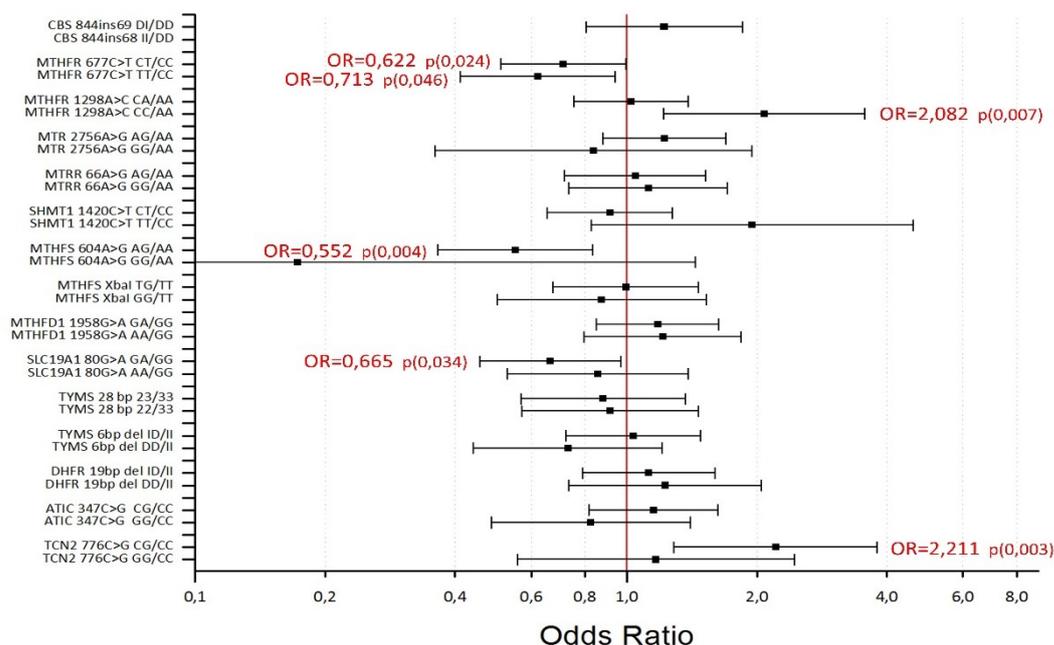


Grafico 23 Rappresentazione grafica (modello codominante) degli OR relativi all'associazione tra genotipo di varianti di geni coinvolti nel metabolismo dei folati ed occorrenza di AR.

Dall'analisi svolta sono risultate diverse associazioni legate a protezione e rischio di sviluppo della patologia, principalmente a carico dei polimorfismi MTHFR 677C>T, MTHFR 1298A>C, MTHFS 604A>G, SLC19A1 80G>A e TCN2 776C>G.

Nel polimorfismo MTHFR 677C>T, i genotipi eterozigote e omozigote per l'allele T hanno evidenziato un effetto protettivo nei confronti dell'occorrenza della malattia con valori di OR rispettivamente di 0,622 e 0,713. I valori risultano entrambi significativi con *p-values* inferiori a 0,05.

Individui omozigoti CC per MTHFR 1298A>C hanno mostrato un aumento del rischio legato allo sviluppo di AR di 2,082 (*p*=0,007) rispetto a individui eterozigoti.

Anche il polimorfismo 776C>G del gene TCN2 ha evidenziato associazione legata all'occorrenza in relazione al genotipo CG (OR= 2,211; *p*= 0,003).

Per quanto riguarda gli SNPs MTHFS 604A>G e SLC19A1 80G>A, pazienti eterozigoti per le relative varianti risultano dotati di un effetto protettivo nei confronti della patogenesi reumatoide.

I valori di OR presentati sono rispettivamente di 0,552 e 0,665, entrambi significativi (*p-values*<0,05).

4.3.3 Associazione tra genotipo e efficacia al MTX

Siamo passati all'analisi farmacogenetica della risposta a MTX correlata alla presenza di questi SNPs.

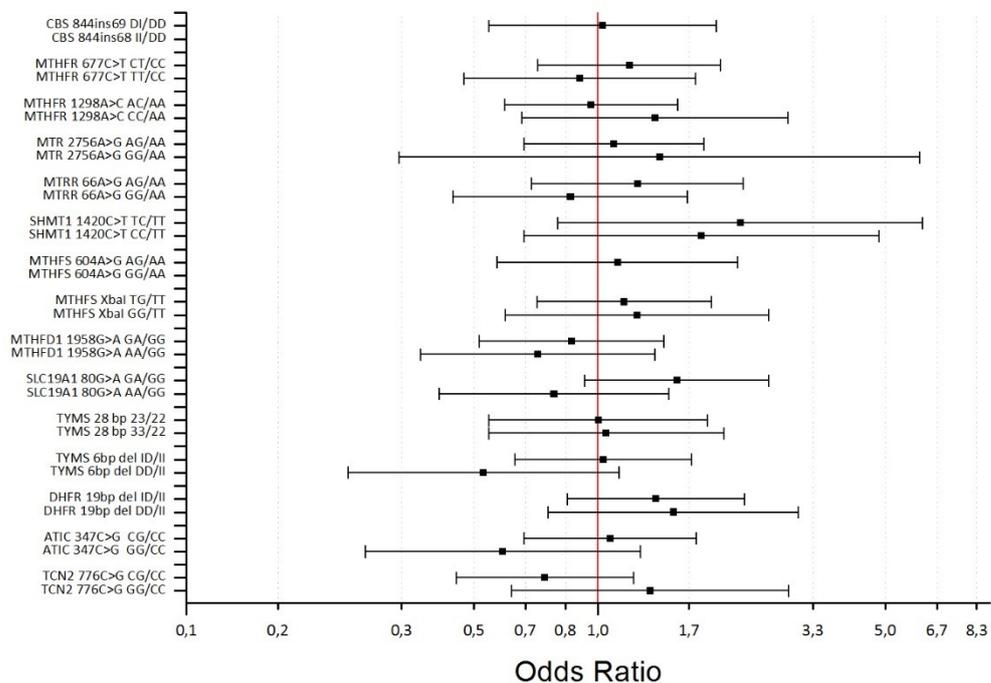


Grafico 24 Rappresentazione grafica (modello codominante) degli OR relativi all'associazione tra risposta al trattamento con MTX e genotipo di varianti di geni coinvolti nel metabolismo dei folati.

Purtroppo non sono state determinate associazioni significative legate alla risposta a MTX all'interno della casistica totale.

Successivamente è stata effettuata la stratificazione della popolazione studiata per individuare la presenza di possibili associazioni legate al genere.

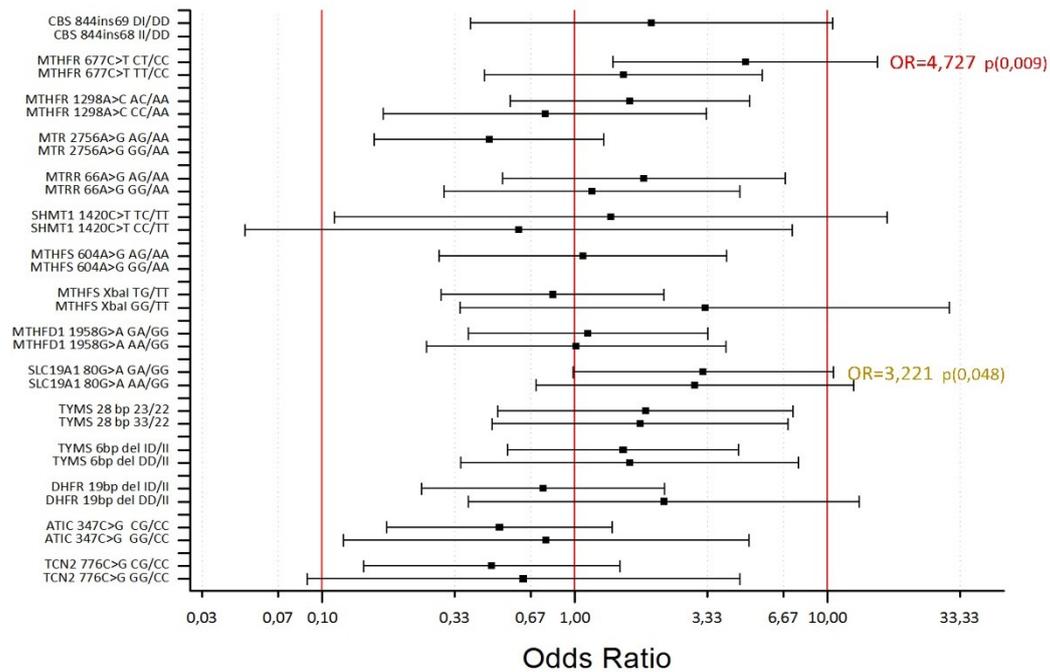


Grafico 25 Rappresentazione grafica (modello codominante) degli OR relativi all'associazione tra risposta al trattamento con MTX e genotipo di varianti di geni coinvolti nel metabolismo dei folati nel genere maschile.

Nella popolazione maschile è stata rilevata un'associazione piuttosto elevata nei confronti della risposta al trattamento con MTX in individui eterozigoti CT per il polimorfismo MTHFR 677C>T (OR=4,727). La significatività di quest'associazione è stata confermata da un valore p pari a 0,009. È stata individuata inoltre una tendenza d'associazione alla terapia in individui GA per SLC19A1 80G>A (OR=3,221; $p=0,048$).

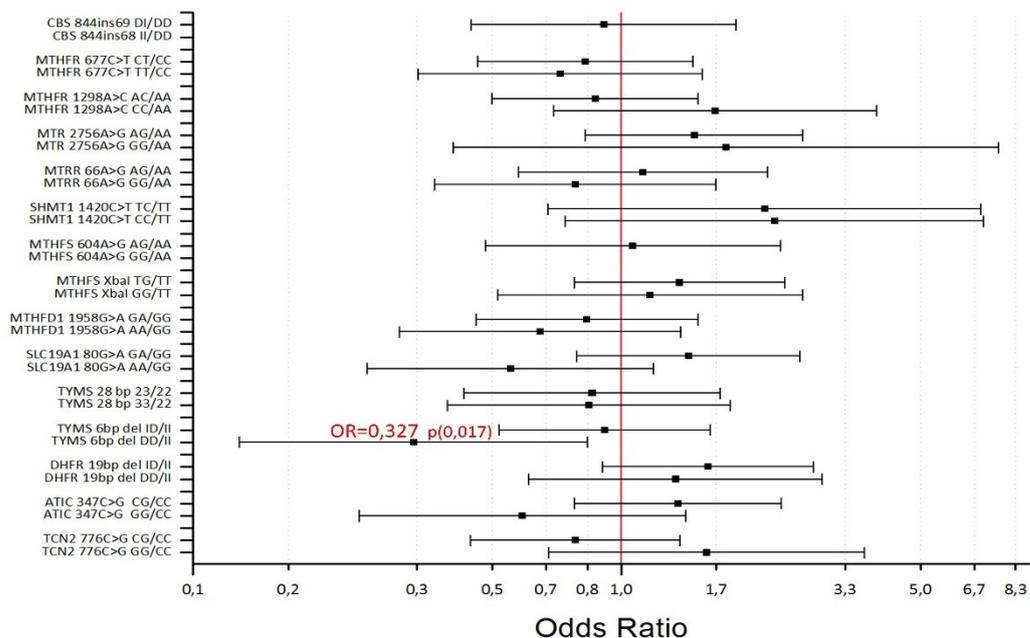


Grafico 26 Rappresentazione grafica (modello codominante) degli OR relativi all'associazione tra risposta al trattamento con MTX e genotipo di varianti di geni coinvolti nel metabolismo dei folati nel genere Femminile.

Femmine omozigoti per la delezione di 6bp di TYMS presentano una riduzione nella risposta a MTX aumentata di circa 3 volte rispetto a donne eterozigoti.

4.1.4 Associazione tra genotipo e tossicità al MTX

Dopo aver valutato la presenza di possibili associazioni tra le varianti studiate e la risposta al Methotrexate, siamo passati a valutarne l'associazione a tossicità analizzando prima l'intera casistica.

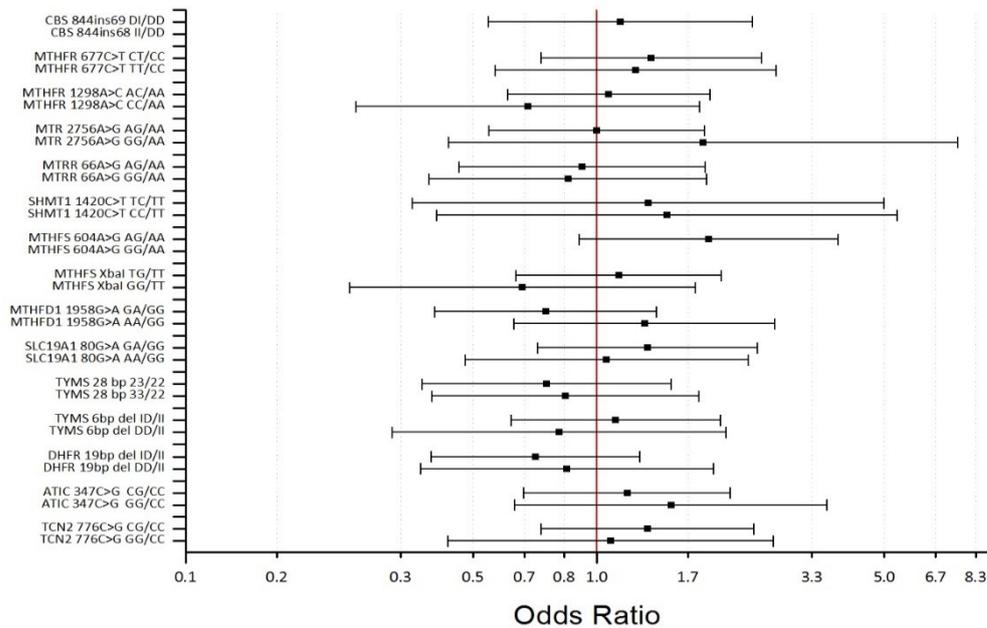


Grafico 27 Rappresentazione grafica (modello codominante) degli OR relativi all'associazione tra tossicità al trattamento con MTX e genotipo di varianti di geni coinvolti nel metabolismo dei folati.

Non sono emersi risultati significativi per quanto riguarda l'analisi condotta sulla totalità dei pazienti e si è quindi proceduto stratificando secondo il sesso d'appartenenza.

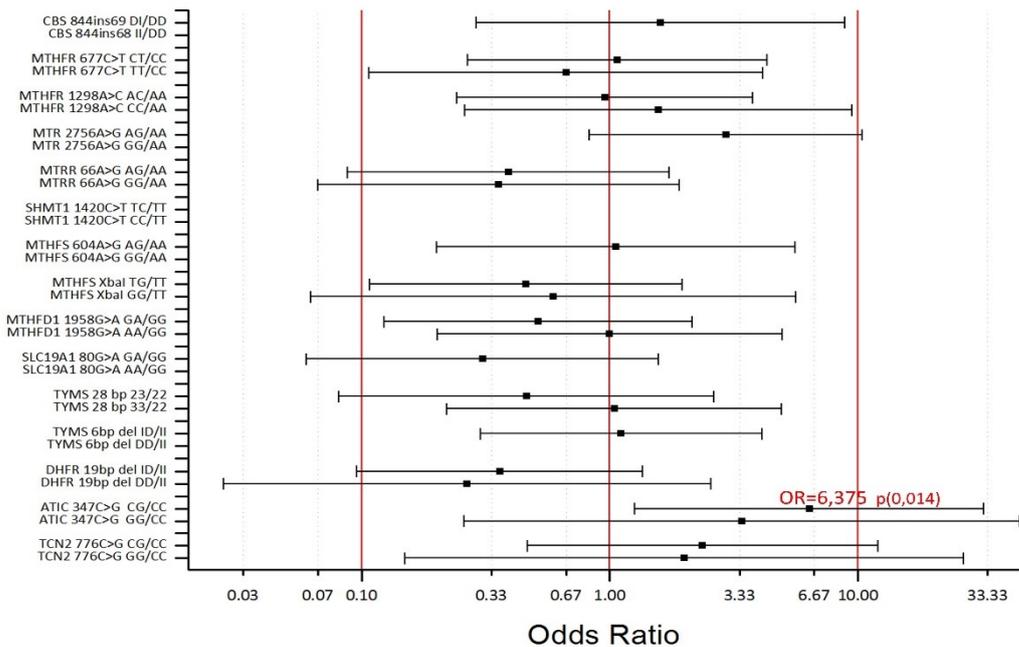


Grafico 28 Rappresentazione grafica (modello codominante) degli OR relativi all'associazione tra tossicità al trattamento con MTX e genotipo di varianti di geni coinvolti nel metabolismo dei folati nel genere maschile

Negli uomini è stato osservato che la presenza dell'eterozigote CG per il polimorfismo ATIC 347C>G produce un aumento dell'associazione al rischio di tossicità della terapia (OR=6,375; p=0,014).

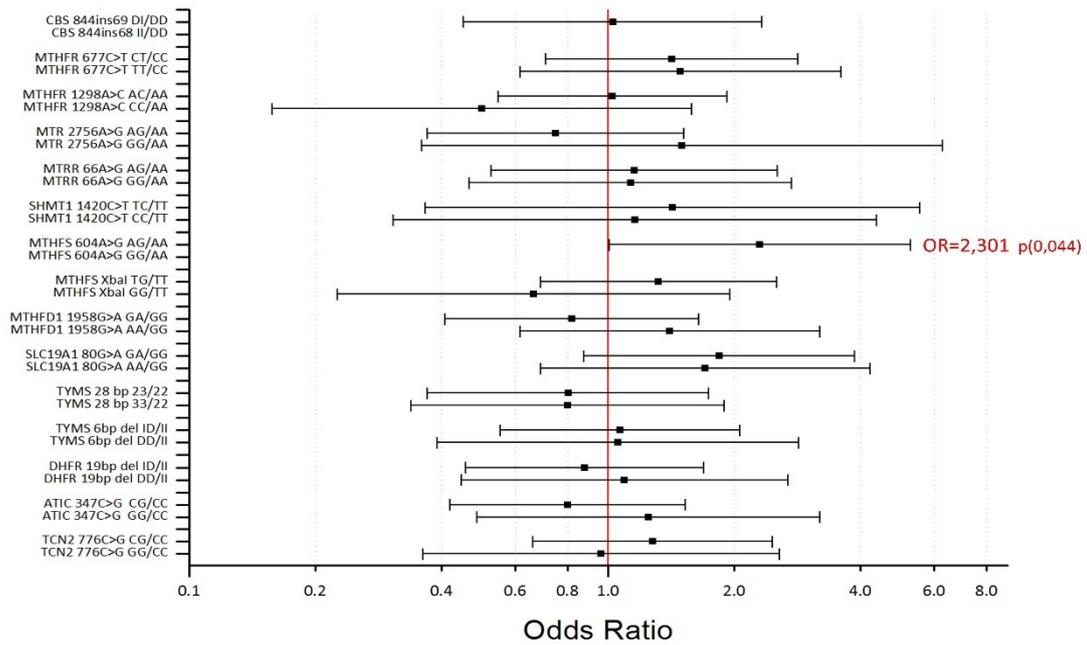


Grafico 29 Rappresentazione grafica (modello codominante) degli OR relativi all'associazione tra tossicità al trattamento con MTX e genotipo di varianti di geni coinvolti nel metabolismo dei folati nel genere femminile.

Negli individui di sesso femminile, la presenza dell'allele G in eterozigosi per MTHFS 604A>G determina la presenza d'associazione alla tossicità

4.1.5 Associazione tra genotipo e risposta ai farmaci biologici

Abbiamo quindi valutato la risposta delle 15 varianti oggetto di studio in relazione alla risposta al trattamento con farmaci biologici.

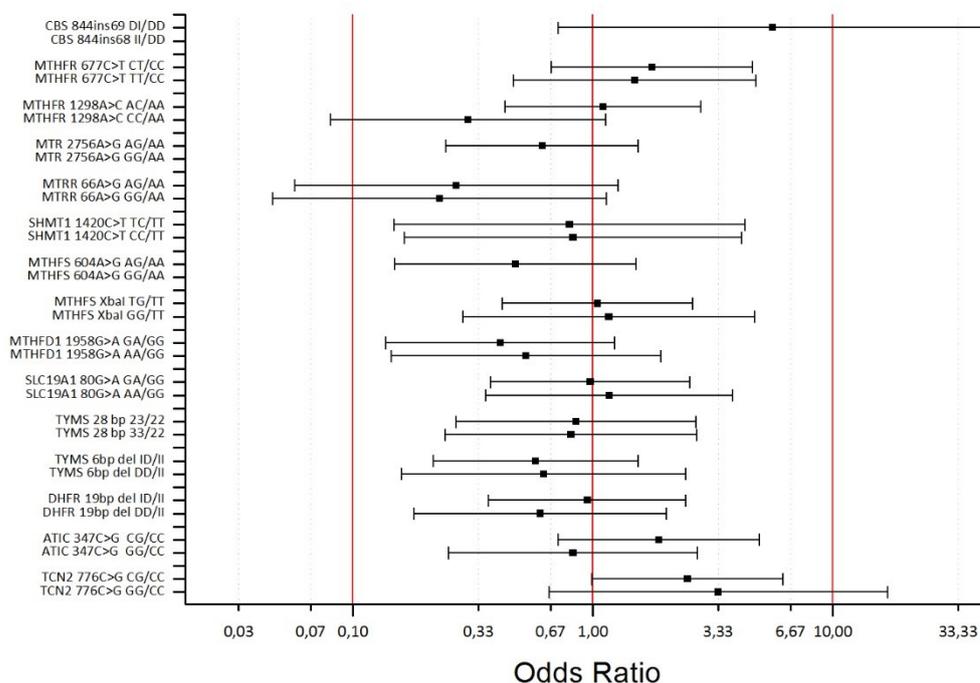


Grafico 30 Rappresentazione grafica (modello codominante) degli OR relativi all'associazione tra risposta al trattamento con farmaci biologici e genotipo di varianti di geni coinvolti nel metabolismo dei folati.

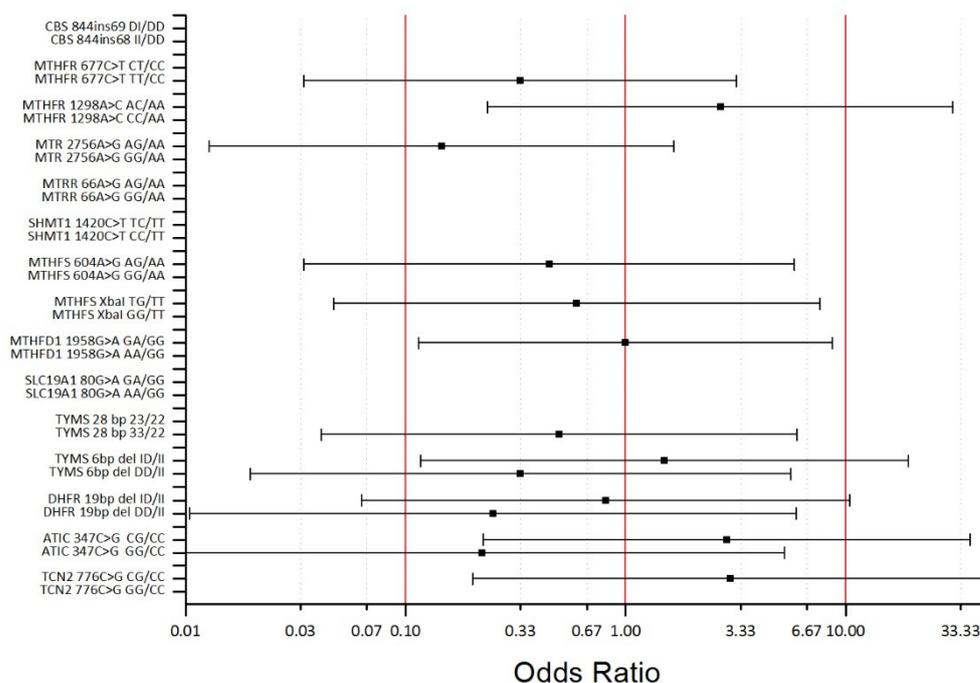


Grafico 31 Rappresentazione grafica (modello codominante) degli OR relativi all'associazione tra risposta al trattamento con farmaci biologici e genotipo di varianti di geni coinvolti nel metabolismo dei folati nel genere maschile.

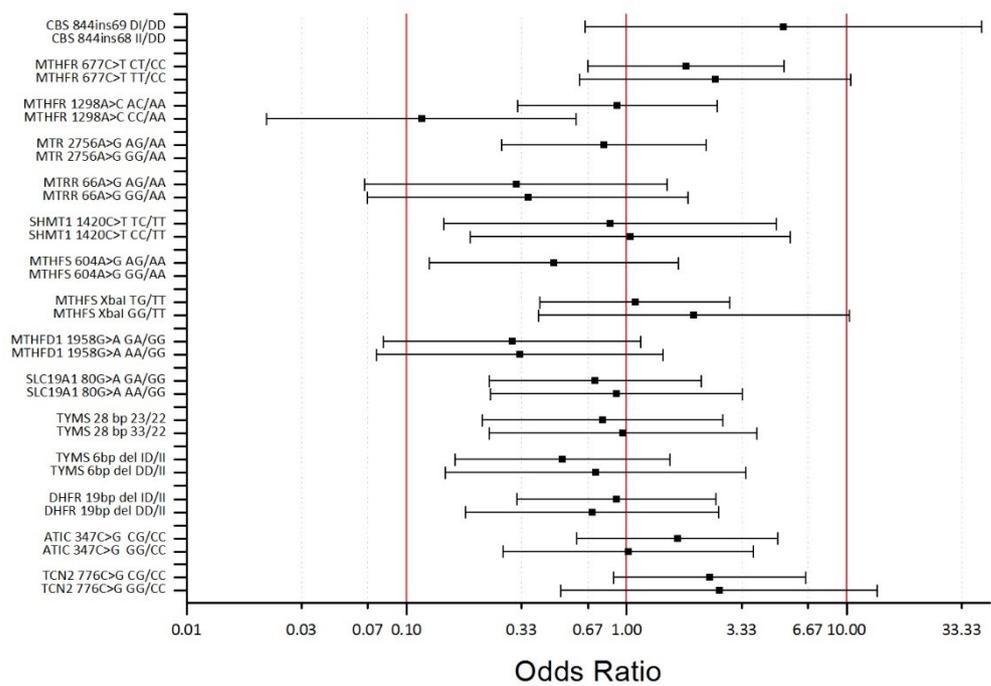


Grafico 32 Rappresentazione grafica (modello codominante) degli OR relativi all'associazione tra risposta al trattamento con farmaci biologici e genotipo di varianti di geni coinvolti nel metabolismo dei folati nel genere femminile.

Anche in seguito alla stratificazione della casistica non sono apparse particolari associazioni legate al sesso dei pazienti.

4.4 Analisi di interazioni epistatiche

L'Artrite Reumatoide è caratterizzata da una componente genetica complessa costituita dal coinvolgimento di più geni dotati di funzionalità specifiche e appartenenti a metabolismi diversi. In base a ciò è stata condotta un'analisi d'interazione gene-gene (GxG) per verificare la presenza di eventuali interazioni tra i geni oggetto dello studio. La metodica riassume il rischio di malattia attraverso un modello predisponente dicotomizzato (alto rischio/basso rischio) da un'interazione ottimale GxG, che non considera effetti cumulativi dovuti a molteplici interazioni GxG. Sono state analizzate le 3 combinazioni genotipiche possibili per ogni individuo componente la casistica (322 individui in totale) in relazione a tutte le varianti geniche oggetto di studio (20), con lo scopo di valutare la presenza di interazioni geniche in grado di determinare, l'occorrenza di AR, l'efficacia e la tossicità al Metotrexato e la risposta al trattamento con farmaci biologici. Il risultato più rilevante tra le interazioni ottenute è relativo all'efficacia nella risposta al MTX nel genere femminile.

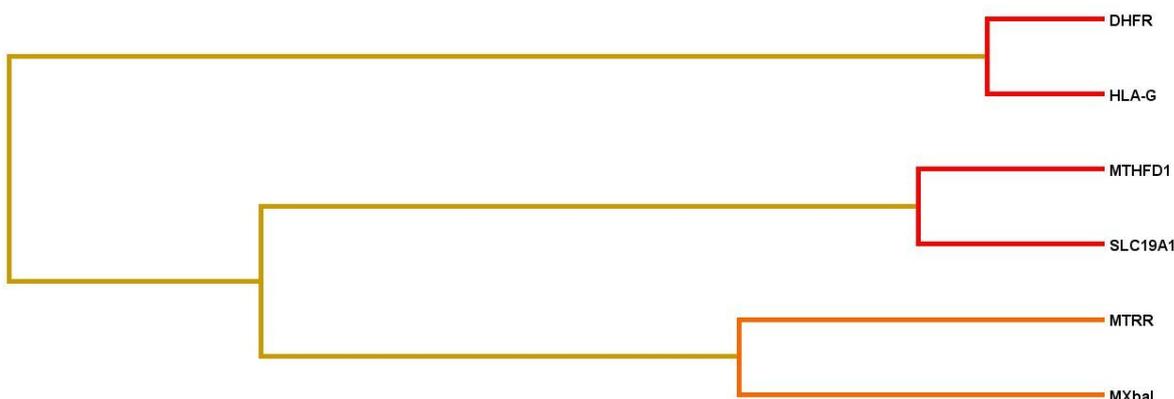


Figura 25: Dendrogramma dell'interazione genica nella risposta al MTX nelle femmine

Il dato evidenzia la presenza di un'interazione sinergica tra i geni DHFR-HLA-G che risulta determinare individualmente una correlazione con l'efficacia a MTX.

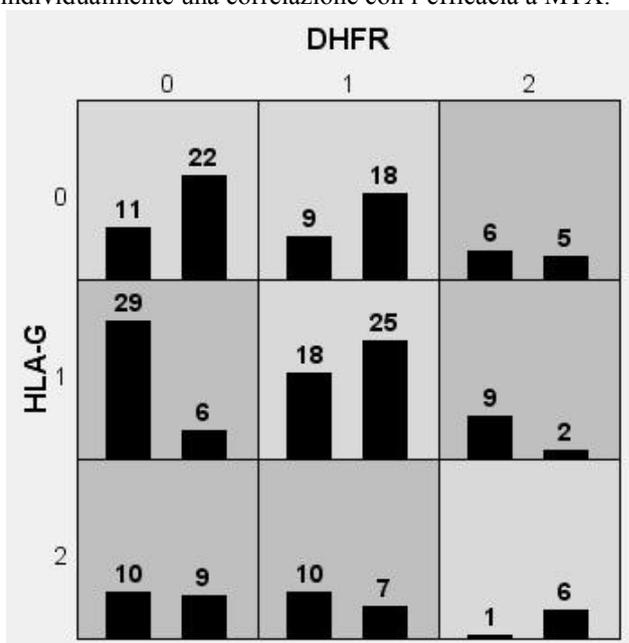


Figura 26 Matrice d'interazione tra i polimorfismi dei geni DHFR ed HLA-G.

Analizzando la matrice d'interazione tra i due geni si osserva come la combinazione genotipica a più alto rischio di inefficacia nei confronti della risposta al farmaco sia determinata dall'inserzione in eterozigosi di HLA-G in contemporanea presenza con l'omozigosi per l'allele *wild type* del gene DHFR. In presenza però del genotipo DI per DHFR l'effetto sembra sparire. Calcolando l'OR relativo al genotipo DI di HLA-G rispetto alle restanti combinazioni alleliche di entrambe le varianti, emerge un valore pari a 6,140 significativo (95% IC 2,422-15,57), che evidenzia l'associazione alla risposta al farmaco dovuta all'interazione di questi due geni.

5

Discussione

L'Artrite Reumatoide è una malattia infiammatoria autoimmune, generalmente caratterizzata da andamento cronico e progressivo che interessa prevalentemente le articolazioni sinoviali, conducendo ad erosione della cartilagine e dell'osso fino a causare severa disabilità, e con possibile coinvolgimento sistemico. È considerata la più comune tra le malattie autoimmuni con una prevalenza compresa tra lo 0,5-1% e un'incidenza media annua pari allo 0,02-0,05%, nella popolazione generale. Stratificando in base alla posizione geografica, si osserva una prevalenza ridotta nei paesi dell'Europa meridionale, con frequenze comprese tra lo 0,3-0,7% ed un'incidenza media annua di circa 0,016%.

Le caratteristiche di questa patologia sono tipiche delle malattie complesse o multifattoriali, nelle quali il contributo alla patogenesi della malattia risulta fornito da fattori genetici e ambientali. Inizialmente il fenotipo clinico è solitamente contraddistinto da artrite simmetrica erosiva, con possibili coinvolgimenti extra-articolari. L'andamento cronico della malattia tende a evolvere, attraverso fasi di riacutizzazione e di remissione, fino a progressiva degenerazione del tessuto articolare, tale da procurare deformità, invalidità e spesso un precoce invecchiamento del sistema cardiovascolare.

Il meccanismo patogenetico, non ancora ben definito, appare basato sull'alterazione dei meccanismi della risposta immunitaria, con conseguente attivazione delle popolazioni linfocitarie e stimolazione delle cellule monocito-macrofagiche, dei condrociti, degli osteoclasti e dei fibroblasti sinoviali. L'instaurarsi di questa risposta infiammatoria, caratterizzata dal rilascio di citochine (TNF α) e interleuchine (IL-1 e IL-6), conduce alla distruzione del tessuto connettivale, ad opera delle metalloproteinasi della matrice, e all'attivazione dell'osteoclastogenesi.

Nella letteratura scientifica si ipotizza che l'alterata risposta immunitaria, in soggetti geneticamente predisposti, sia provocata da specifici agenti infettivi capaci di generare reazioni infiammatorie, in grado di eludere i normali meccanismi di controllo immunitario, innescando così uno stato flogistico che tende all'automantenimento anche in assenza dello stimolo infettivo d'origine.

L'apporto dei fattori genetici allo sviluppo della patologia sembra esser stimato attorno al 50-60%, ma il contributo più importante risulta fornito dai geni del sistema maggiore d'istocompatibilità (MHC), conosciuto anche nell'uomo come *Human Leukocyte Antigen* (HLA), di classe II.

L'importante ruolo dei fattori genetici nel meccanismo dell'AR è sostenuto da evidenze epidemiologiche che confermano una maggiore frequenza della patologia tra i familiari dei pazienti, e dalle forti differenze relative alla prevalenza della malattia nelle diverse etnie. Vista la multifattorialità della patologia e l'eterogeneità della sua occorrenza, risulta evidente l'importanza dell'identificazione di marcatori genetici in grado di determinare il rischio legato allo sviluppo della malattia e che forniscano supporto per l'attuazione di misure preventive e per la creazione di terapie specifiche realizzate sulla base del profilo genetico del paziente. La capacità di predire la risposta farmacologica ad una determinata terapia basandosi sulle caratteristiche genotipiche del paziente, permetterebbe d'intervenire precocemente sui soggetti che non rispondono alla cura, indirizzandoli verso trattamenti alternativi e ostacolando in questo modo la progressione della malattia e la manifestazione di possibili effetti tossici legati alla precedente terapia.

L'indagine effettuata in questo studio può esser suddivisa principalmente in tre parti.

La prima parte basata sull'analisi di occorrenza di AR in relazione alla presenza di polimorfismi associati a *shared epitope*, nel gene HLA-DRB1, e a uno SNP del locus HLA-DQA2. Successivamente è stata effettuata l'analisi farmacogenetica, nella quale è stata verificata l'esistenza di associazioni all'efficacia e alla tossicità al trattamento, con MTX e all'efficacia per terapia a base di farmaci biologici.

Nella seconda parte, l'attenzione è stata focalizzata su 2 polimorfismi che interessano la regione HLA-G, per la precisione, HLA-G 14bp ins/del (rs16375) e +3142 C>G (rs1063320). Anche in questo caso siamo partiti dalla ricerca di possibili associazioni tra le varianti considerate e la suscettibilità alla malattia, per poi passare all'analisi farmacogenetica relativa a efficacia e tossicità ai suddetti trattamenti.

Infine è stata valutata l'associazione di un pannello di varianti geniche, appartenenti al metabolismo dei folati e dell'omocisteina, con il rischio di sviluppo di AR e con l'efficacia/tossicità

alla terapia con MTX e alla terapia con farmaci biologici. In questo caso è stata realizzata *in primis* l'analisi farmacogenetica, partendo dalla ricerca d'associazioni all'efficacia e alla tossicità al Metotrexato, in quanto, oltre ad essere il farmaco di prima scelta nel trattamento della patologia, è considerato un forte antagonista dei folati.

Al termine di queste analisi è stata inoltre verificata la presenza di possibili interazioni epistatiche tra i geni oggetto dello studio.

Ogni individuo appartenente alla casistica studiata (complessivamente 322 pazienti, dei quali il 98% di origine italiana, e 438 controlli sani) è stato genotipizzato per le varianti precedentemente elencate ed è stato trattato con terapia a base di MTX e/o farmaci biologici (principalmente anti-TNF α).

5.1 HLA-DRB1 e HLA-DQA2

Da diversi anni è stata accertata l'associazione tra alleli del locus HLA-DRB1 e l'Artrite Reumatoide. Gli alleli associati codificano per una sequenza di 5 amminoacidi in posizione 70-74 della catena β 1 di HLA-DRB1, meglio conosciuta come *shared epitope* (SE). È stato riconosciuto che alleli HLA-DRB1 contenenti SE, codificanti le sequenze amminoacidiche QKRAA, QQRAA e KKRAA, risultano associati allo sviluppo della patologia. Gli alleli SE evidenziano particolare associazione a forme di AR caratterizzate da sieropositività per anticorpi anti-peptide ciclico citrullinato (anti-CCP). Questi peptidi, sono soggetti al processo di citrullinazione, cioè una modificazione post-traduzionale che consiste nella conversione dell'arginina in citrullina. Si pensa che questo cambiamento permetta il legame degli antigeni modificati con gli alleli SE, inducendo la rottura del meccanismo di immunotolleranza che regola la produzione di anticorpi contro questi peptidi. Recenti studi hanno ipotizzato l'appartenenza di queste forme di AR ad uno specifico sottogruppo della patologia, contraddistinto da un decorso più severo. Geni codificanti per questa tipologia di alleli sembrano stimolare la risposta immunitaria nei confronti delle proteine citrullinate con conseguente aumento degli anticorpi anti-CCP, incrementando di circa 3,5-4 volte il rischio patogenetico. È stata rilevata associazione anche tra alleli SE e sieropositività al fattore reumatoide (FR).

Nonostante il Locus HLA-DRB1 sia fortemente coinvolto nella patogenesi, non è sufficiente per spiegare la complessità del ruolo di MHC nello sviluppo dell'Artrite Reumatoide. L'identificazione di altri loci di suscettibilità è stata resa difficile dal grande *Linkage Disequilibrium* (LD) di questa regione.

In diversi studi è stata evidenziata la presenza di due *tag* SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) in forte LD con il locus HLA-DRB1. Questi SNPs, rs6910071 ed rs660895, risultano localizzati a una distanza di circa 300 Kb tra loro. Il primo è posizionato in una regione intronica all'interno di C6orf10, locus di 561 aa che codifica per una proteina ancora sconosciuta la cui espressione tissutale appare soprattutto a livello del tessuto interstiziale del testicolo e nell'appendice, il secondo in una regione intergenica 30,8 Kb a valle di HLA-DRB1.

Entrambi i polimorfismi sono caratterizzati dalla sostituzione di un'adenina (A), che rappresenta l'allele ancestrale, con una guanina (G) con MAF (*Minor Allele Frequency*) pari a 10,483% e 19,848%, rispettivamente per rs6910071 ed rs660895. A livello europeo, la variante G sembra possedere una frequenza più alta: 26,5% per rs6910071 e 27,9% per rs660895. All'interno della nostra casistica la variante rs6910071 si presenta con una frequenza rispettivamente del 13,5% e 12,4% nei casi e nei controlli. Differenze tra affetti e controlli sani si evidenziano maggiormente nel genere femminile, nel quale la variante compare con frequenza del 14% nei pazienti, rispetto ai controlli in cui si riscontra una frequenza del 10,8%. Per quanto riguarda rs660895, è stata osservato un divario maggiore tra la frequenza riscontrata negli affetti (15,7%) e quella dei non affetti (9,9%); stratificando in base al genere notiamo che, anche in questo caso, la variante risulta agire soprattutto nelle femmine, manifestandosi nel 14% dei casi. Negli uomini la differenza di frequenza dell'allele G tra casi e controlli rimane del 2%.

Oltre all'associazione ad AR descritta per questi due SNPs, diversi lavori hanno messo in luce l'associazione del locus DQA2 con il rischio di malattia. Varianti di questo locus erano già state implicate nell'identificazione di effetti d'associazione addizionali indipendenti da DRB1, con risultati positivi. Il lavoro di Liu e colleghi (Liu et al., 2011) ha rafforzato questo dato evidenziando l'associazione del polimorfismo rs9275595 di HLA-DQA2 con l'occorrenza di AR. In particolare, in seguito ad un'analisi per valutare l'esistenza di possibili interazioni geniche, avevano riscontrato che la sola presenza dell'allele di A di rs9275595 incrementava la possibilità di sviluppare AR del 61%, mentre in contemporanea presenza con l'allele G dell'rs10807113, quest'ultimo localizzato all'interno del locus DQB2 e singolarmente ininfluenza

nei confronti del rischio di AR, conduceva ad un aumento del rischio di occorrenza della patologia di ben 11 volte.

Lo SNP rs9275595, localizzato in una regione intergenica sul braccio corto del cromosoma 6, consiste in una sostituzione dell'amminoacido timina (T) con una citosina (C). La MAF di questo polimorfismo calcolata su casistica europea, è stimata attorno al 29,6%.

Dopo aver genotipizzato l'intera casistica per le varianti rs6910071, rs660895 ed rs9275595 siamo passati tramite calcolo dell'*Odds Ratio* alla valutazione della presenza di associazioni con l'occorrenza della malattia e con l'efficacia/tossicità alle terapie a base di MTX e farmaci biologici.

In merito alla suscettibilità ad AR sono risultate alcune evidenti associazioni. La prima è relativa alla variante rs660895, nella quale il genotipo AG presenta OR= 1,895 significativo ($p= 4*10^{-4}$). Il risultato per questa variante ha evidenziato una discreta associazione, che però non appare significativa come quella riscontrata nell'analisi d'associazioni di singoli SNPs condotta da Chiu et al. (2009). La stratificazione operata per rs660895 non ha messo in evidenza ulteriori associazione sulla base del genere d'appartenenza. L'associazione rilevata, per rs9275595, mette in luce la relazione tra il genotipo CC (OR= 4,169; $p= 3 \times 10^{-4}$) e TC (OR= 2,180; $p=2,64*10^{-6}$) ed il rischio di sviluppo della malattia. Approfondendo l'analisi attraverso stratificazione in base al genere, l'associazione di rs9275595 è stata ritrovata in entrambi i sessi senza particolari differenze, evidenziando l'indipendenza di quest'associazione dal genere. Il dato osservato, all'interno della nostra casistica, che propone l'allele C di rs9275595 come fattore di rischio per lo sviluppo di AR, è risultato in contrasto con quello evidenziato da Liu e colleghi, nel quale è l'allele ancestrale A che determina un aumento del rischio di malattia. Rs6910071 non ha mostrato alcun tipo di associazione all'interno della nostra casistica, manifestando una dissimilarità con i risultati ottenuti in studi GWAS, nei quali veniva confermato il ruolo funzionale di questa variante nell'occorrenza di AR (Park et al.,2009) (Chiu et al., 2009).

Siamo passati poi all'analisi farmacogenetica, iniziando dall'identificazione di associazioni relative all'efficacia al trattamento con MTX. Abbiamo esaminato la casistica totale per poi procedere con la relativa stratificazione sulla base del genere. Purtroppo non sono emerse associazioni da parte di nessuna delle tre varianti esaminate relativamente all'efficacia di MTX.

Successivamente è stata realizzata l'analisi d'associazione alla tossicità per il medesimo trattamento farmacologico ma non sono state evidenziati risultati significativi.

Infine abbiamo indagato la presenza d'associazioni tra le varianti oggetto di studio e l'efficacia alla terapia a base di farmaci biologici. Osservando la totalità della casistica, non sono apparse particolari associazioni ad eccezione di una debole tendenza identificata tra gli individui eterozigoti AG per rs6910071. Stratificando tale *trend* sulla base del genere è risultata una forte associazione (OR= 4,655) tra il genotipo considerato e l'efficacia al trattamento nelle femmine. Il valore di OR riportato appare significativo (*p-values* pari a 0,033). Tale dato suggerisce l'esistenza di un meccanismo patogenetico differente tra i due generi, che influisce quindi sulla risposta terapeutica e che potrebbe essere utilizzato come marker predittivo in ambito farmacogenetico.

5.2 HLA-G

Il gene HLA-G, localizzato nella regione 6p21.3, appartiene alle molecole non classiche del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I, e codifica per la proteina HLA-G. Questa molecola è dotata, in condizioni fisiologiche, di scarsa espressione tissutale specifica ed esercita una funzione immunoregolatoria, inibendo la citolisi mediata dalle cellule T e l'attività citotossica delle cellule NK. Inoltre la proteina è in grado di regolare la proliferazione cellulare di queste, stimolando la produzione di cellule con funzione soppressoria e regolativa, specifica nei confronti dei linfociti T. Poiché considerata una molecola tollerogena, l'espressione di HLA-G sembra esercitare un ruolo protettivo nei confronti dei meccanismi di autoimmunità, di conseguenza la presenza di polimorfismi all'interno di questo locus possono alterare la stabilità dell'mRNA della molecola, riducendo i livelli di HLA-G solubile e causando perdita dello stato d'immunosoppressione, probabilmente alla base della patogenesi reumatoide.

I polimorfismi più studiati all'interno di questa regione sono l'inserzione/delezione di 14bp (HLA-G 14bp ins/del; rs16375) e +3142 G>C (rs1063320), localizzati nella regione 3'UTR del gene HLA-G. Il primo SNP causa un'alterazione del *pattern di splicing* del trascritto di HLA-G, destabilizzando quindi l'mRNA; la variante di rs1063320 incrementa l'affinità per alcuni specifici microRNA (miRNA) nei confronti di HLA-G, riducendone di conseguenza l'espressione. L'associazione tra questi SNPs e l'occorrenza di Artrite Reumatoide è già stata dimostrata in altri studi, evidenziando, in particolar modo, un aumento del rischio di malattia legato alla presenza dell'inserzione di 14bp (Catamo et al., 2014) e alla variante G di rs1063320 (Veit et al., 2014). L'inserzione di 14bp (allele I) è inoltre coinvolta nella risposta alla terapia con MTX, nello specifico risulta associata ad un *outcome* sfavorevole nei confronti della cura, al contrario pazienti DD hanno rivelato un miglioramento nello stato di salute ed un aumento dei livelli di sHLA-G durante la terapia (Rizzo et al., 2013).

Abbiamo analizzato il dato di occorrenza di AR per le suddette varianti all'interno della nostra casistica.

L'inserzione in doppia dose è risultata associata, per OR pari a 1,694 significativo ($p=0,018$), al rischio di AR; al contrario, rs1063320 non ha evidenziato associazioni. Ampliando l'analisi mediante stratificazione per genere, è emerso che negli uomini nessuna delle due varianti sembra favorire lo sviluppo della patologia, mentre nel genere femminile è stata ritrovata l'associazione del genotipo II di HLA-G 14bp ins/del all'occorrenza di AR (OR= 1,920; 95% IC 1,015-3,633). La significatività del dato è stata confermata da $p\text{-value} < 0,05$. Questa specificità per il genere femminile evidenziata da HLA-G potrebbe essere legata al fatto che la molecola risulta espressa soprattutto a livello del trofoblasto, dove esplica la sua funzione tollerogena regolando i meccanismi di trasporto transplacentale durante la gravidanza (Aagaard et al., 2006).

Per quanto riguarda l'efficacia della risposta alla terapia a base di MTX, l'allele I ha nuovamente mostrato associazione: individui eterozigoti DI risultano associati a inefficacia nei confronti del trattamento farmacologico, evidenziando un OR di 0,558 per $p\text{-value}$ pari a 0,027. La presenza dell'allele I sembra interferire con i meccanismi d'azione del farmaco, mentre, come dimostrato in recenti studi, la delezione tende ad aumentare la stabilità dell'mRNA di HLA-G, prolungando l'effetto anti-infiammatorio, e sembra interagire positivamente con l'azione del farmaco (Rizzo et al., 2006) (Baricordi et al., 2007) (Stamp et al., 2009). È apparso anche un debole *trend* della variante G in singola dose dell'rs1063320 (OR= 0,550; 95% IC 0,302-1,002), ma con intervallo di confidenza decisamente *borderline* per attribuire una reale significatività al dato. Indagando l'influenza delle varianti considerate sulla base del genere d'appartenenza degli individui affetti, è emerso che nelle pazienti femmine il genotipo DI appare fortemente associato ad inefficacia al MTX (OR= 0,376; $p=0,001$). Il dato ottenuto risulta in linea con il dato osservato da Rizzo e colleghi in cui la presenza dell'allele D implicava un miglioramento dello stato patologico del paziente (Rizzo et al., 2013). Alcuni studi hanno evidenziato però risultati controversi (Stamp et al., 2009) (Kooloos et al., 2010), questo può essere dovuto a differenze di espressione genica tra le popolazioni che possono influenzare il potere degli studi d'associazione conducendo a risultati diversi. Inoltre la differenza nelle dosi di MTX ed il differente cut-off nella definizione della risposta alla terapia possono creare differenze tra i risultati ottenuti.

La tendenza osservata sulla totalità della casistica per rs1063320, ha mostrato invece associazione alla risposta negativa al farmaco, sia in individui eterozigoti che omozigoti per l'allele G, con OR rispettivamente di 0,429 e 0,455 significativi per $p\text{-value}$ inferiori a 0,05.

In riferimento alla tossicità alla terapia con MTX e all'efficacia del trattamento con farmaci biologici, non abbiamo avuto evidenze d'associazione nella totalità della casistica e neppure associazioni genere-specifiche.

5.3 Geni del metabolismo dei folati e dell'omocisteina

Il Metotrexato rappresenta ad oggi il farmaco di elezione tra i DMARDs convenzionali (cDMARDs) nella cura dell'Artrite Reumatoide, e di altre patologie infiammatorie, per via del suo costo e per l'esperienza nel suo utilizzo. Tuttavia, un significativo numero di pazienti con AR non trae beneficio dal farmaco o non riesce a tollerarlo. Conosciuto anche come antagonista dei folati, interviene nella biosintesi di purine e pirimidine e nel metabolismo di metionina e omocisteina, quest'ultimo correlato con la metilazione di DNA, RNA e proteine. MTX ha inoltre effetto, mediante inibizione dell'enzima 5-Aminoimidazolo-4-Carbossiamide Ribonucleotide Transformilasi (AICAR T'asi), sul rilascio di mediatori endogeni antiinfiammatori dell'adenosina, modula anche le risposte delle citochine a determinati livelli e può promuovere l'apoptosi di linfociti attivati (Genestier et al., 2000). I principali limiti nell'utilizzo di MTX sono dovuti alla sua variabile efficienza e alla sua tossicità. Numerosi effetti tossici sono associati all'uso del MTX, quali nodulosità, polmonite da ipersensibilità, tossicità del sistema nervoso centrale, reazioni post-dose, sintomi gastrointestinali (GI) come nausea, vomito, dolore addominale e diarrea, epatite con aumento di transaminasi, anomalie ematologiche, eruzioni cutanee, alopecia e osteopatia (rara) (Grabar et al., 2008). Da anni si cerca di migliorare l'efficacia e diminuire la tossicità del farmaco attraverso una migliore comprensione della sua farmacologia, attraverso l'utilizzo di analisi farmacogenetiche basate sull'identificazione di differenze genetiche (polimorfismi) negli enzimi coinvolti nella via metabolica del MTX.

In questo studio si è indagato il ruolo di varianti polimorfiche, nell'eziologia dell'Artrite Reumatoide (AR) e della loro importanza nel determinare la risposta terapeutica al Metotrexato (MTX).

In primis è stato analizzato un pannello di quindici polimorfismi di geni del metabolismo dei folati e dell'omocisteina, nell'intento di identificare nuove marcatori genetici a bassa penetranza correlati all'efficacia e alla tossicità a MTX.

Per quanto riguarda l'efficacia al farmaco, non sono state rilevate associazioni significative per nessuna delle varianti considerate, all'interno della casistica totale. Stratificando successivamente per genere, è stata riscontrata un'associazione positiva in individui eterozigoti CT per il polimorfismo MTHFR 677C>T (OR= 4,727; $p=0,009$) ed una tendenza d'associazione debolmente significativa del genotipo GA per SLC19A1 80G>A (OR=3,221; $p=0,048$), in individui di sesso maschile. L'associazione tra MTHFR 677C>T e l'efficacia al farmaco è infatti già stata dimostrata anche in altri studi (Dervieux et al., 2006) (Kurzawski et al., 2007). Nelle donne invece, la delezione in doppia dose della variante TYMS 6bp ins/del ha evidenziato una forte associazione a inefficacia al trattamento, con valore di OR pari 0,327 significativo ($p=0,017$). La delezione si associa con una diminuzione dell'espressione dell'mRNA di TYMS, che risulta in una riduzione dell'attività enzimatica della molecola.

Passando alla valutazione di associazioni con la tossicità ad MTX, non sono emerse associazioni all'interno della casistica totale, ma andando a discriminare tra maschi e femmine, è risultata una forte associazione, nei maschi, del genotipo CG di ATIC 347C>G allo sviluppo di effetti collaterali in seguito al trattamento (OR=6,375; $p=0,014$). La variante G di ATIC aveva già evidenziato in altri studi effetti collaterali, nello specifico a livello gastrointestinale (Dervieux et al., 2006) (Wessel et al., 2006).

Donne eterozigoti per la variante G di MTHFS 604A>G appaiono associate a risposta tossica alla terapia, con OR pari a 2,301 e p -value di 0,044. La presenza della variante in MTHFS determina la sostituzione, a livello proteico, di un amminoacido polare neutro, la Treonina, con uno apolare, l'Alanina, conducendo a possibili alterazioni nella struttura dell'enzima. Un malfunzionamento dell'enzima condurrebbe innanzitutto all'alterazione dell'equilibrio nelle concentrazioni di folato, inoltre, considerando che MTHFS esercita indirettamente anche un controllo sulla reazione di metilazione dell'omocisteina, una sua carenza o un suo malfunzionamento determinerebbero un accumulo di omocisteina nel sangue.

Una volta osservata l'implicazione di alcune di queste varianti nella farmacogenetica del Metotrexato, abbiamo provato a ricercare possibili associazioni delle stesse all'occorrenza della patologia.

Sono state subito individuate diverse correlazioni legate a protezione e rischio di sviluppo della patologia, principalmente a carico dei polimorfismi MTHFR 677C>T, MTHFR 1298A>C, MTHFS 604A>G, SLC19A1 80G>A e TCN2 776C>G.

I genotipi CT e TT dello SNP MTHFR 677C>T sembrano avere un effetto protettivo nei confronti della suscettibilità ad AR (OR= 0,622; $p=0,024$) (OR= 0,713; $p=0,046$), mentre individui CC per MTHFR 1298A>C hanno evidenziato associazione positiva al rischio di AR (OR= 2,082; $p=0,007$).

Anche MTHFS 604A>G e SLC19A1 80G>A sono risultati protettivi nei confronti dell'occorrenza di malattia; nello specifico, individui eterozigoti per entrambi i polimorfismi hanno riportato valori di OR rispettivamente di 0,552 ($p=0,004$) e 0,665 ($p=0,034$).

Infine è stato riscontrato che soggetti eterozigoti per TCN2 776C>G sono maggiormente a rischio di sviluppo di AR (OR= 2,211; $p=0,003$).

Per ultimo, abbiamo verificato la presenza di associazioni tra le varianti considerate e l'efficacia alla terapia con farmaci biologici. L'unico polimorfismo che ha mostrato associazione negativa, solamente nel genere femminile, è stato nuovamente MTHFR 1298A>C. In particolare femmine portatrici l'omozigosi per l'allele C hanno evidenziato un valore di OR pari a 0,117 significativo per p -value di 0,004.

È stata effettuata un'ulteriore analisi MDR, per ricercare eventuali sinergie o ridondanze geniche che permettessero d'individuare interazioni funzionali tra tutte le varianti analizzate in questo studio. È stata evidenziata un'interazione tra HLA-G 14bp ins/del e DHFR 19bp ins/del. Per la precisione l'inserzione in eterozigosi di HLA-G in contemporanea presenza con l'omozigosi per l'allele *wild type* del gene DHFR sembra agire favorendo la non risposta al farmaco. In presenza però del genotipo DI per DHFR l'effetto sembra sparire. Calcolando l'OR relativo al genotipo DI di HLA-G rispetto alle restanti combinazioni alleliche di entrambe le varianti, emerge un valore pari a 6,140 significativo (95% IC 2,422-15,57).

5.2 Conclusioni

L'analisi svolta in questo studio ha permesso d'individuare la presenza di varianti associate all'occorrenza di Artrite Reumatoide e alla risposta farmacologica alle principali terapie utilizzate nel trattamento della patologia. Lo studio è stato condotto su popolazione italiana (98% dei pazienti di origine italiana) ed ogni individuo appartenente alla casistica studiata (complessivamente 322 pazienti e 438 controlli sani) è stato genotipizzato per le varianti d'interesse ed è stato trattato con terapia a base di MTX e/o farmaci biologici (principalmente anti-TNF α).

Inizialmente sono state analizzate varianti localizzate nella regione HLA, imputata di fornire il maggior contributo genetico in termini di occorrenza della malattia. All'interno di questa regione è stata valutata la funzione di varianti polimorfiche associate a *shared epitope* del gene HLA-DRB1. Le varianti selezionate rs6910071 e rs660895 hanno evidenziato associazioni differenti tra loro. Per quanto riguarda la variante rs6910071 e l'occorrenza di AR, non è stata evidenziata alcuna associazione significativa, al contrario, è stato ottenuto un risultato interessante dall'analisi farmacogenetica. La variante G in singola dose è apparsa associata ad una buona risposta farmacologica al trattamento con farmaci biologici anti-TNF- α nel solo genere femminile. L'associazione è stata confermata da un valore di OR = 4,655 ($p = 0,033$).

Questo risultato, oltre ad attribuire una valenza predittiva della variante G alla risposta a trattamenti a base di farmaci biologici anti-TNF- α , permette di valutare preventivamente una terapia alternativa in pazienti caratterizzati da un differente genotipo. Il dato lascia inoltre spazio all'ipotesi che l'AR manifesti caratteristiche patogenetiche diverse sulla base del sesso dell'individuo affetto.

La variante G di rs660895 ha manifestato invece associazione alla suscettibilità alla malattia con valore di OR, in individui eterozigoti AG, pari a 1,895 significativo per ($p = 4 \cdot 10^{-4}$). Il dato non sembra essere in relazione ad uno specifico genere.

Sempre in relazione alla ricerca di varianti associate a rischio di AR all'interno della regione HLA, è stato identificato ed analizzato lo SNV rs9275595. Questo polimorfismo ha presentato risultati rilevanti in termini di associazione ed in entrambi i sessi. La variante C ha evidenziato infatti una forte associazione sia in eterozigosi che in omozigosi nella totalità della popolazione studiata, con valori di OR pari a 4,169 e 2,180 rispettivamente per il genotipo CC e TC. Questi valori sono risultati significativi per *p-values* inferiori a 0,05.

L'associazione si è riconfermata anche in seguito a stratificazione per genere e per ambedue i genotipi. Nei maschi, individui CC hanno evidenziato un OR= 5, mentre eterozigoti TC hanno avuto valore di OR pari a 3,036. Nelle femmine, soggetti omozigoti per la variante hanno esibito un valore di OR=2,952, invece donne eterozigoti, un OR= 1,755. Tutti i valori di *Odds Ratio* sono risultati significativi per $p < 0,05$. I dati ottenuti mettono in luce l'indipendenza dell'associazione di questa variante dal genere d'appartenenza degli individui affetti.

Siamo passati poi a considerare varianti funzionali del gene HLA-G, un importante regolatore della risposta immunosoppressiva e ritenuto di notevole importanza nello sviluppo di malattie immuno-mediate. In questo locus, sono stati analizzati i polimorfismi HLA-G 14bp ins/del (rs16375) e +3142C>G (rs1063320). L'inserzione di 14bp ha mostrato associazione allo sviluppo di AR (OR= 1,694; $p = 0,018$), che in seguito a stratificazione della casistica, si è rafforzata nel genere femminile con un valore di OR pari a 1,920 e significativo ($p = 0,043$) in soggetti omozigoti II.

Passando poi alla farmacogenetica del Metotrexato, sia la variante 14bp *ins* che l'allele G di rs1063320 hanno manifestato associazione all'inefficacia nei confronti del farmaco. Analizzate le varianti sulla totalità della casistica, l'inserzione ha evidenziato un OR= 0,558 (p= 0,027), mentre la variante G un debole *trend* (OR= 0,550; 95% IC 0,302-1,002). Nel genere femminile l'associazione è stata riconfermata e individui DI hanno ottenuto un OR pari a 0,376 significativo per p= 0,001, mentre il trend osservato per rs1063320 è diventato un'associazione significativa sia in soggetti omozigoti GG (OR= 0,455; p= 0,044) che in soggetti eterozigoti CG (OR= 0,429; p= 0,016). Per quanto riguarda l'efficacia al trattamento con farmaci biologici non sono emerse associazioni degne di nota.

I dati ottenuti hanno confermato l'influenza esercitata dalla variante HLA-G 14bp *ins* con il rischio di occorrenza di AR nella popolazione italiana, ed il ruolo sia di rs16375 che di rs1063320 nella risposta al trattamento farmacologico con MTX. Le associazioni riscontrate sono risultate specifiche per il genere femminile, spiegando in parte le differenze nell'incidenza e nella suscettibilità alla malattia tra i due generi.

È stato valutato anche un pannello di varianti polimorfiche in geni legati al trasporto e al metabolismo dei folati e dell'omocisteina, in quanto bersagli del Metotrexato, farmaco di prima linea terapeutica e antagonista dei folati. I dati ottenuti dall'analisi di queste varianti hanno evidenziato l'influenza di alcuni di questi nei confronti del rischio di occorrenza di AR o della risposta al farmaco.

Le varianti MTHFR 677C>T, MTHFS 604A>G ed SLC19A1 80G>A hanno mostrato un effetto protettivo nei confronti della suscettibilità alla malattia, mentre individui CC per MTHFR 1298A>C e CG per TCN2 776C>G hanno manifestato un aumentato rischio di sviluppare la patologia. Le associazioni ottenute sono risultate significative per *p-values* inferiori a 0,05.

Per quanto riguarda l'identificazione di associazioni all'efficacia della terapia con MTX, è stato calcolato un valore di OR pari a 4,727 (p= 0,009) in individui di sesso maschile con genotipo CT per MTHFR 677C>T. È stato individuato anche una tendenza ad associazione in soggetti eterozigoti per la variante SLC19A1 80G>A ma *borderline* in termini di significatività. Nel genere femminile è stata individuata solamente un'associazione all'inefficacia del trattamento in pazienti omozigoti DD per TYMS 6bp *del* (OR= 0,327; p= 0,017).

Nella tossicità al trattamento con MTX, è stata riscontrata l'influenza dell'allele G in doppia dose per ATIC 347C>G (OR= 6,375; p= 0,014) nei soli maschi, mentre nelle femmine, soggetti eterozigoti per lo SNP MTHFS 604A>G tendono a sviluppare tossicità al farmaco (OR= 2,301; p= 0,044).

Dall'analisi d'associazione tra le varianti oggetto di studio e l'efficacia al trattamento con farmaci biologici è stata individuata una relazione in individui di sesso femminile con genotipo CC per MTHFR 1298A>C (OR= 0,117; p= 0,004).

I risultati ottenuti da questo studio, oltre a chiarire e confermare aspetti riguardanti la componente genetica che favorisce la patogenesi di questa malattia, possono fornire importanti elementi per lo sviluppo di forme di medicina personalizzata applicabili nella pratica clinica, tali da consentire allo specialista reumatologo di impostare per ogni paziente la terapia più efficace, determinata sulla base del profilo genetico individuale e riducendo nel contempo il rischio legato allo sviluppo di eventi avversi.

Tali evidenze possono essere tradotte in importanti risvolti in termini economia sanitaria.

Le analisi ed i risultati riportati in questo studio, essendo stati eseguiti su una casistica italiana limitata, sono da considerarsi come preliminari e le ipotesi sviluppate necessitano di essere confermate mediante analisi di una casistica più ampia e indipendente.

5

Bibliografia

- Alamanos Y, Drosos AA. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2005; 4(3): 130-6.
- Alamanos Y, Drosos AA. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*. 2005 Mar;4(3):130-6.
- Alamanos Y, Voulgari PV, Drosos AA. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum*. 2006 Dec; 36(3):182-8. Epub 2006 Oct 11.
- Albani S, Carson DA, Roudier J. Genetic and environmental factors in the immune pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 1992; 18: 729–40.
- American College of Rheumatology. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002.
- Arend WP, Dayer JM. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 151–60.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 1988; 31: 315-24.
- Bainbridge DR, Ellis SA, Sargent IL. HLA-G suppresses proliferation of CD4 (+) T-lymphocytes. *J Reprod Immunol* 2000 Aug; 48 (1):17–26.
- Baricordi OR, Govoni M, Rizzo R, Trotta F. In rheumatoid arthritis, a polymorphism in the HLA-G gene concurs in the clinical response to Methotrexate treatment. *Ann Rheum Dis* 2007; 66(8): 1125-6.
- Bathon JM, Martin RW, Fleischmann RM, Tesser JR, Schiff MH, Keystone EC, et al. A comparison of Etanercept and Methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2000; 343: 1586-93.
- Baumgartner SW, Fleischmann RM, Moreland LW, Schiff MH, Markenson J, Whitmore JB. Etanercept (Enbrel) in patients with rheumatoid arthritis with recent onset versus established disease: improvement in disability. *J Rheumatol*. 2004 Aug; 31(8):1532-7.
- Benucci M, Cammelli E, Manfredi M, Saviola G, Baiardi P, Mannoni A. Early rheumatoid arthritis in Italy: study of incidence based on a two-level strategy in a sub-area of Florence (Scandicci-Le Signe). *Rheumatol Int* 2008; 28(8): 777-81.
- Berkun Y, Levartovsky D, Rubinow A, Orbach H, Aamar S, Grenader T, Abou Atta I, Mevorach D, Friedman G, Ben-Yehuda A. Methotrexate related adverse effects in patients with rheumatoid arthritis are associated with the A1298C polymorphism of the MTHFR gene. *Ann Rheum Dis*. 2004 Oct; 63(10):1227-31.
- Bohanec Grabar P, Logar D, Lestan B, Dolzan 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 Nov;64(11):1057-68
- Bowes J, Barton A. Recent advances in the genetics of RA susceptibility. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47: 399-402.
- Bugatti S, Vitolo B, Caporali R, Montecucco C, Manzo A. B cells in Rheumatoid Arthritis: From Pathogenetic Players to Disease Biomarkers. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 681678, DOI 10.1155/2014/681678.
- Burmester GR, Feist E, Dörner T. Emerging cell and cytokine targets in rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 2014; 10: 77-88.

- Carbonell J, Cobo T, Balsa A, Descalzo MA, Carmona L, and the SERAP Study Group. The incidence of rheumatoid arthritis in Spain: results from a nationwide primary care registry. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47: 1088–92.
- Carrier N, Cossette P, Daniel C, et al. The DEERA HLA-DR alleles in patients with early polyarthritis: protection against severe disease and lack of association with rheumatoid arthritis autoantibodies. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 698-707.
- Carrier N, Cossette P, Daniel C, et al. The DEERA HLA-DR alleles in patients with early polyarthritis: protection against severe disease and lack of association with rheumatoid arthritis autoantibodies. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 698-707.
- Catamo E, Addobbati C, Segat L, Sotero Frago T, Domingues Barbosa A, Tavares Dantas A, de Ataíde Mariz H, F da Rocha L Jr, Branco Pinto Duarte AL, Monasta L, Sandrin-Garcia P, Crovella S. HLA-G gene polymorphisms associated with susceptibility to rheumatoid arthritis disease and its severity in Brazilian patients. *Tissue Antigens*. 2014 Sep; 84(3):308-15.
- Catrina AI, Ulfgrén AK, Lindblad S, et al. Low levels of apoptosis and high FLIP expression in early rheumatoid arthritis synovium. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 934.
- Catuogno M, Bompane D. Citochine e immunomodulatori nell'artrite reumatoide: dalla patogenesi alla terapia. *Scripta Medica* 2005; 8: 83-91.
- Catuogno M, Bompane D. Citochine e immunomodulatori nell'artrite reumatoide: dalla patogenesi alla terapia. *Scripta Medica* 2005; 8: 83-91.
- Chan ES, Cronstein BN. Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases. *Arthritis Res*. 2002; 4(4):266-73. Epub 2002 Mar 19.
- Chen ZS, Lee K, Walther S, Raftogianis RB, Kuwano M, Zeng H, Kruh GD. Analysis of methotrexate and folate transport by multidrug resistance protein 4 (ABCC4): MRP4 is a component of the methotrexate efflux system. *Cancer Res*. 2002 Jun 1; 62(11):3144-50.
- Chiu YF1, Kao HY, Chen YS, Hsu FC, Yang HC. Assessment of gene-covariate interactions by incorporating covariates into association mapping. *BMC Proc*. 2009 Dec 15; 3 Suppl 7:S85.
- Chou CT, Pei L, Chang DM, Lee CF, Schumacher HR, Liang MH. Prevalence of rheumatic diseases in Taiwan: a population study of urban, suburban, rural differences. *J Rheumatol* 1994; 21: 302-6.
- Choy EH, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2001 Mar 22; 344(12):907-16.
- Cimmino MA, Parisi M, Moggiana G, Mela GS, Accardo S. Prevalence of rheumatoid arthritis in Italy: the Chiavari Study. *Ann Rheum Dis* 1998; 57: 315-8.
- Clements CS, Kjer-Nielsen L, McCluskey J, Rossjohn J. Structural studies on HLA-G: implications for ligand and receptor binding. *Hum Immunol*. 2007 Apr; 68(4):220-6. Epub 2006 Oct 27.
- Cohen S, Hurd E, Cush J, Schiff M, Weinblatt ME, Moreland LW, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with Anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, in combination with Methotrexate: results of a twenty-four-week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 614-24.
- Corrao S, Pistone G. Artrite reumatoide. *Manuale pratico per la diagnosi in reumatologia* 2009; (3). Pensiero scientifico ed.

- Criswell LA, Lum RF, Turner KN, Woehl B, Zhu Y, Wang J et al. The influence of genetic variation in the HLA-DRB1 and LTA-TNF regions on the response to treatment of early rheumatoid arthritis with Methotrexate or Etanercept. *Arthritis & Rheumatism* 2004; 50: 2750-6
- Criswell LA. Gene discovery in rheumatoid arthritis highlights the CD40/NF-kappaB signaling pathway in disease pathogenesis. *Immunol Rev.* 2010 Jan; 233(1):55-61.
- Cronstein BN. Low-dose methotrexate: a mainstay in the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacol Rev.* 2005 Jun; 57(2):163-72.
- de Almeida D, Ling S, Holoshitz J. New insights into the functional role of the rheumatoid arthritis shared epitope. *FEBS Letters* 2011; 585: 3619-26, DOI 10.1016/j.febslet.2011.03.035.
- De Waure C, Ricciardi et al. Epidemiologia e burden of disease dell'artrite reumatoide. *IJPH - Year 8, Volume 7, Number 2, Suppl. 2, 2010.*
- de Waure C, Sferrazza A, Gualano MR, La Torre G, Montecucco C, Ricciardi W. Epidemiologia e burden of disease dell'artrite reumatoide. *Italian Journal of Public Health* 2010; 7: S3-13.
- Della Rossa A, Neri R, Talarico R, et al. Diagnosis and referral of rheumatoid arthritis by primary care physician: results of a pilot study on the city of Pisa, Italy. *Clin Rheumatol* 2010; 29(1): 71-81.
- Denny JC, Bastarache L, Ritchie MD, Carroll RJ, Zink R et al. Systematic comparison of phenome-wide association study of electronic medical record data and genome-wide association study data. *Nat Biotechnol* 2013; 31(12): 1102-10.
- Denny JC, Bastarache L, Ritchie MD, Carroll RJ, Zink R et al. Systematic comparison of phenome-wide association study of electronic medical record data and genome-wide association study data. *Nat Biotechnol* 2013; 31(12): 1102-10.
- 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 Oct; 54(10):3095-103.
- Di Giacinto G. Artrite reumatoide: diagnosi e terapia nella medicina generale. *M.D. Medicinae Doctor – Anno XXI* 2014; 2: 41-6.
- Donadi EA, Castelli EC, Arnaiz-Villena A, Roger M, Rey D, Moreau P. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. *Cell Mol Life Sci.* 2011 Feb; 68(3):369-95.
- Dorling A, Monk NJ, Lechler RI. HLA-G inhibits the transendothelial migration of human NK cells. *Eur J Immunol* 2000 Feb; 30 (2):586–593.
- Drozdik M, Rudas T, Pawlik A, Kurzawski M, Czerny B, Gornik W, Herczynska M. The effect of 3435C>T MDR1 gene polymorphism on rheumatoid arthritis treatment with disease-modifying antirheumatic drugs. *Eur J Clin Pharmacol.* 2006 Nov;62(11):933-7. Epub 2006 Aug 24.
- Du Montcel ST, Michou L, Petit-Teixeira E, Osorio J, Lemaire I, Lasbleiz S, Pierlot C, Quillet P, Bardin T, Prum B, Cornelis F, Clerget-Darpoux F. New classification of HLA-DRB1 alleles supports the shared epitope hypothesis of rheumatoid arthritis susceptibility. *Arthritis Rheum.* 2005 Apr;52(4):1063-8

- Edwards CJ, Cooper C. Early environmental factors and rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 2006; 143: 1-5.
- Edwards CJ, Goswami R, Goswami P, et al. Growth and infectious exposure during infancy and the risk of rheumatoid factor in adult life. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 401-4.
- Edwards CJ, Szczepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, et al. Efficacy of B-cell-targeted therapy with Rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2004; 350: 2572-81.
- Egsmose C, Lund B, Borg G, Pettersson H, Berg E, Brodin U, et al. Patients with rheumatoid arthritis benefit from early 2nd line therapy: 5 years follow-up of a prospective double blind placebo controlled study. *J Rheumatol* 1995; 22: 2208-13.
- Emery P, Breedveld FC, Dougados M, Kalden JR, Schiff MH, Smolen JS. Early referral recommendation for newly diagnosed rheumatoid arthritis: evidence based development of a clinical guide. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 290-7.
- Feitsma AL, van der Voort EI, Franken KL, el Bannoudi H, Elferink BG, Drijfhout JW, Huizinga TW, de Vries RR, Toes RE, Ioan-Facsinay A. Identification of citrullinated vimentin peptides as T cell epitopes in HLA-DR4-positive patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 117-25.
- Ferraz-Amaro I, González-Juanatey C, López-Mejias R, Riancho-Zarrabeitia L, González-Gay MA. Metabolic Syndrome in Rheumatoid Arthritis. *Mediators of Inflammation* 2013; 710928, Hindawi Publishing Corporation ed., DOI 10.1155/2013/710928.
- Firestein GS, Budd RC, Gabriel SE, McInnes IB, O'Dell JR. Etiology and Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Kelley's Textbook of Rheumatology* 9th ed. 2012; 1035-86.
- Fishman P, Bar-Yehuda S. Rheumatoid arthritis: History, Molecular Mechanisms and Therapeutic Applications. *A3 Adenosine Receptors from Cell Biology to Pharmacology and Therapeutics* 2010: 291-8, P.A. Borea ed., DOI 10.1007/978-90-481-3144-0_15.
- Franceschi PL, Mannoni A. L'artrite reumatoide in medicina generale. *Collana Disease Management* 2008; 24: 7-27.
- Gabriel SE, Michaud K. Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: 229.
- Gabriel SE, Michaud K. Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: 229.
- Galivan J. Evidence for the cytotoxic activity of polyglutamate derivatives of methotrexate. *Mol Pharmacol.* 1980 Jan; 17(1):105-10.
- González-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C, Martin J. Rheumatoid arthritis: a disease associated with accelerated atherogenesis. *Semin Arthritis Rheum* 2005; 35: 8-17.
- Gorman JD, David-Vaudey E, Pai M, Lum RF, Criswell LA. Particular HLA-DRB1 Shared Epitope genotypes are strongly associated with rheumatoid vasculitis. *Arthritis & Rheumatism* 2004; 50(11): 3476-84.
- Gorman JD, David-Vaudey E, Pai M, Lum RF, Criswell LA. Particular HLA-DRB1 Shared Epitope genotypes are strongly associated with rheumatoid vasculitis. *Arthritis & Rheumatism* 2004; 50(11): 3476-84.

- Gottenberg JE, Dayer JM, Lukas C, et al. Serum IL-6 and IL-21 are associated with markers of B cell activation and structural progression in early rheumatoid arthritis: results from the ESPOIR cohort. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2012; 71(7): 1243-8.
- Gottenberg JE, Miceli-Richard C, Ducot B, Goupille P, Combe B, Mariette X. Markers of B-lymphocyte activation are elevated in patients with early rheumatoid arthritis and correlated with disease activity in the ESPOIR cohort. *Arthritis Research and Therapy* 2009; 11(4, article no. R114).
- Grassi W1, De Angelis R, Lamanna G, Cervini C. The clinical features of rheumatoid arthritis. *Eur J Radiol.* 1998 May;27 Suppl 1: S18-24.
- Gyetvai A, Szekanecz Z, Soós L, Szabó Z, Fekete A, Kapitány A, et al. New classification of the shared epitope in rheumatoid arthritis: impact on the production of various anti-citrullinated protein antibodies. *Rheumatology Oxford* 2010; 49:25–33.
- Haagsma CJ, Blom HJ, van Riel PL, van't Hof MA, Giesendorf BA, van Oppenraaij-Emmerzaal D, van de Putte LB. Influence of sulphasalazine, methotrexate, and the combination of both on plasma homocysteine concentrations in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1999 Feb; 58(2):79-84.
- Hochberg MC, Chang RW, Dwosh I, Lindsey S, Pincus T, Wolfe F. The American College of Rheumatology 1991 revised criteria for the classification of global functional status in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1992; 35(5): 498-502.
- Hooijberg JH, Broxterman HJ, Kool M, Assaraf YG, Peters GJ, Noordhuis P, Scheper RJ, Borst P, Pinedo HM, Jansen G. Antifolate resistance mediated by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Cancer Res.* 1999 Jun 1; 59(11):2532-5.
- Horak P, Smrzova A, Krejci K, Tichy T, Zadrazil J, Skacelova M. Renal manifestations of rheumatic diseases. A review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2013; 157(2): 98-104, DOI 10.5507/bp.2013.042.
- Hughes LB, Beasley TM, Patel H, Tiwari HK, Morgan SL, Baggott JE, Saag KG, McNicholl J, Moreland LW, Alarcón GS, Bridges SL Jr. 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 Sep; 65(9):1213-8. Epub 2006 Jan 26.
- Huizinga TW, Amos CI, van der Helm-van Mil AH, Chen W, van Gaalen FA, Jawaheer D, Schreuder GM, et al. Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 3433–8.
- Iebba F, Di Sora F, Tarasi A, Leti W, Montella F. L'artrite reumatoide come modello di malattia genetica multifattoriale: una rassegna della letteratura. *Recenti Prog Med* 2011; 102: 175-82.
- Iebba F, Di Sora F, Tarasi A, Leti W, Montella F. Rheumatoid arthritis: a typical multifactorial genetic disease: review of the literature. *Recenti Prog Med.* 2011 Apr;102(4):175-82
- Jansen LM, van Schaarendgurg D, van der Horst-Bruinsma I, van der Stadt RJ, de Koning MH, Dijkmans BA. The predictive value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in early arthritis. *J Rheumatol* 2003; 30: 1691-5.
- Kalla AA, Tikly M. Rheumatoid arthritis in the developing world. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2003; 17: 863–75.

- Källberg H, Jacobsen S, Bengtsson C, et al. Alcohol consumption is associated with decreased risk of rheumatoid arthritis: results from two Scandinavian case-control studies. *Ann Rheum Dis* 2009; 68: 222-7.
- Kerstens PJ, Boerbooms AM, Jeurissen ME, Fast HJ, Assmann KJ, van de Putte LB. Accelerated nodulosis during low dose methotrexate therapy for rheumatoid arthritis: an analysis of ten cases. *J Rheumatol* 1992; 19: 867-71.
- Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, et al. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope) - restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 38-46.
- Koopman WJ, Schrohenberg RE. Rheumatoid factor. *Rheumatoid arthritis: etiology, diagnosis and therapy* 1985; Utsinger PD, Zvaifler NJ, Ehrlich GE, ed., JB Lippincott.
- Kremer JM, Dougados M, Emery P, Durez P, Sibia J, Shergy W, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with the selective costimulation modulator Abatacept: twelve-months results of a phase iib, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 2263-71.
- Lang TJ. Estrogen as an immunomodulator. *Clin Immunol* 2004; 113: 224.
- Lee HS, et al. Several regions in the major histocompatibility complex confer risk for anti-CCP-antibody positive rheumatoid arthritis, independent of the DRB1 locus. *Mol Med* 2008; 14: 293-300.
- Linn-Rasker SP, van der Helm-van Mil AH, van Gaalen FA, et al. Smoking is a risk factor for anti-CCP antibodies only in rheumatoid arthritis patients who carry HLA-DRB1 shared epitope alleles. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 366-71.
- 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. *N Engl J Med* 2000; 343: 1594-602.
- Liu C1, Ackerman HH, Carulli JP. A genome-wide screen of gene-gene interactions for rheumatoid arthritis susceptibility. *Hum Genet.* 2011 May;129(5):473-85
- MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 30-7.
- MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, Silman AJ. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum.* 2000 Jan; 43(1):30-7.
- Marotto D, Nieddu ME, Cossu A, Carcassi A. Prevalence of rheumatoid arthritis in North Sardinia: the Tempio Pausania's study. *Reumatismo* 2005; 57(4): 273-6.
- Meeuwisse CM, van der Linden MP, Rullmann TA, et al. Identification of CXCL13 as a marker for rheumatoid arthritis outcome using an in silico model of the rheumatic joint. *Arthritis and Rheumatism* 2011; 63(5): 1265-73.
- Miretti MM, Walsh EC, Ke X, Delgado M, Griffiths M, Hunt S et al. A high-resolution Linkage-Disequilibrium map of the Human Major Histocompatibility Complex and first generation of tag single-nucleotide polymorphisms. *Am J Hum Genet* 2005; 76: 634-46.
- Miretti MM, Walsh EC, Ke X, Delgado M, Griffiths M, Hunt S et al. A hig-resolution Linkage-Disequilibrium map of the Human Major Histocompatibility Complex and first generation of tag single-nucleotide polymorphisms. *Am J Hum Genet* 2005; 76: 634-46.

- Mo YQ, Dai L, Zheng DH, et al. Synovial infiltration with CD79a-positive B cells, but not other B cell lineage markers, correlates with joint destruction in rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology* 2011; 38(11): 2301-8.
- Moreland LW, Schiff MH, Baumgartner SW, Tindall EA, Fleischmann RM, Bulpitt KJ, et al. Etanercept therapy in rheumatoid arthritis: a randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 1999; 130: 478-86.
- Nagai Y, Imanishi T. RAvariome: a genetic risk variants database for rheumatoid arthritis based on assessment of reproducibility between or within human populations. *Database* 2013; article ID bat073, DOI 10.1093/database/bat073.
- Pedersen JK, Kjaer NK, Svendsen AJ, Hørslev-Petersen K. Incidence of rheumatoid arthritis from 1995 to 2001: impact of ascertainment from multiple sources. *Rheumatol Int* 2009; 29: 411-15.
- Pedersen M, Jacobsen S, Klarlund M, et al. Environmental risk factors differ between rheumatoid arthritis with and without auto-antibodies against cyclic citrullinated peptides. *Arthritis Res Ther* 2006; 8: R133.
- Perricone C, Ceccarelli F, Valesini G. An overview on the genetic of rheumatoid arthritis: a never-ending story. *Autoimmun Rev*. 2011 Aug; 10(10):599-608.
- Ranganathan P, Culverhouse R, Marsh S, Mody A, Scott-Horton TJ, Brasington R, Joseph A, Reddy V, Eisen S, McLeod HL. Methotrexate (MTX) pathway gene polymorphisms and their effects on MTX toxicity in Caucasian and African American patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2008 Apr; 35(4):572-9. Epub 2008 Mar 15.
- Reveille JD. The genetic contribution to the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 1998; 10:187-200
- Rizzo R, Farina I, Bortolotti D, Galuppi E, Rotola A, Melchiorri L, Ciancio G, Di Luca D, Govoni M. HLA-G may predict the disease course in patients with early rheumatoid arthritis. *Hum Immunol*. 2013 Apr; 74(4):425-32.
- Rizzo R, Farina I, Bortolotti D, Galuppi E, Rotola A, Melchiorri L, Ciancio G, Di Luca D, Govoni M. HLA-G may predict the disease course in patients with early rheumatoid arthritis. *Hum Immunol* 2013; 74: 425-32.
- Rizzo R, Rubini M, Govoni M, Padovan M, Melchiorri L, Stignani M, et al. HLA-G 14-bp polymorphism regulates the methotrexate response in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenet Genomics* 2006; 16:615-23.
- Rodríguez LA, Tolosa LB, Ruigómez A, Johansson S, Wallander MA. Rheumatoid arthritis in UK primary care: incidence and prior morbidity. *Scand J Rheumatol* 2009; 38: 173-7.
- Rodríguez LA, Tolosa LB, Ruigómez A, Johansson S, Wallander MA. Rheumatoid arthritis in UK primary care: incidence and prior morbidity. *Scand J Rheumatol* 2009; 38: 173-7.
- Rousseau P, Le Discorde M, Mouillot G, Marcou C, Carosella ED, Moreau P. The 14 bp deletion-insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-GmRNA stability. *Hum Immunol* 2003 Nov; 64(11):1005-1010.
- Salaffi F, De Angelis R, Grassi W. MARche Pain Prevalence; INvestigation Group (MAPPING) study. Prevalence of musculoskeletal conditions in an Italian population sample: results of a regional community-based study. I. The MAPPING study. *Clin Exp Rheumatol* 2005; 23(6): 819-28.
- Scott DL, Wolfe F, Huizinga TWJ. Rheumatoid Arthritis. *Lancet* 2010;376: 1094-1108.

- Shweiki D, Itin A, Soffer D, et al. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992; 359: 843.
- Silman AJ, MacGregor AJ, Thomson W, Holligan S, Carthy D, Farhan A, et al. Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Br J Rheumatol* 1993;32: 903–7.
- Snustad PD, Simmons MJ. *Principi di genetica*, 2010.
- Stolt P, Yahya A, Bengtsson C, et al. Silica exposure among male current smokers is associated with a high risk of developing ACPA positive rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 1072-76.
- Takatori R, Takahashi KA, Tokunaga D, Hojo T, Fujioka M, Asano T, Hirata T, Kawahito Y, Satomi Y, Nishino H, Tanaka T, Hirota Y, Kubo T. ABCB1 C3435T polymorphism influences methotrexate sensitivity in rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol*. 2006 Sep-Oct;24(5):546-54.
- Tan Z, Randall G, Fan J, Camoretti-Mercado B, Brockman-Schneider R, Pan L et al. Allele-specific targeting of microRNAs to HLA-G and risk of asthma. *Am J Hum Genet* 2007 Oct; 81(4):829–834.
- Tanaka S. Regulation of bone destruction in rheumatoid arthritis through RANKL-RANK pathways. *World J Orthop* 2013; 4(1): 1-6, Baishideng ed., DOI 10.5312/wjo.v4.i1.1.
- Taniguchi A, Urano W, Tanaka E, Furihata S, Kamitsuji S, Inoue E, Yamanaka M, Yamanaka H, Kamatani N. 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 Jun;17(6):383-90.
- Tobón GJ, Youinou P, Saraux A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. *J Autoimmun* 2010; 35: 10-4.
- Turkiewicz AM, Moreland LW. *Rheumatoid Arthritis. Clinical Care in the Rheumatic Diseases* 3rd ed. 2006; 157-66.
- Urano W, Taniguchi A, Yamanaka H, Tanaka E, Nakajima H, Matsuda Y, Akama H, Kitamura Y, Kamatani N. 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 Apr; 12(3):183-90.
- van der Heide A, Jacobs JW, Bijlsma JW, Heurkens AH, van Booma-Frankfort C, van der Veen MJ, et al. The effectiveness of early treatment with “second-line” antirheumatic drugs: a randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 1996; 124: 699-707.
- van der Helm-van Mil AH, Huizinga TW, de Vries RR, Toes RE. Emerging patterns of risk factor make-up enable subclassification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 1728–35.
- van der Horst-Bruinsma IE, Hazes JM, Schreuder GM, et al. Influence of non-inherited maternal HLA-DR antigens on susceptibility to rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1998; 57: 672-5.
- Van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 1998; 62:1044–1051 Akil M, Amos RS. *ABC of*

- Rheumatology. Rheumatoid arthritis – I: clinical features and diagnosis. *BMJ* 1995; 310: 587-90.
- Van Ede AE, Laan RF, Blom HJ, Huizinga TW, Haagsma CJ, Giesendorf BA, de Boo TM, van de Putte LB. 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 Nov;44(11):2525-30.
- van Eden W. Heat-shock proteins as immunogenic bacterial antigens with the potential to induce and regulate autoimmune arthritis. *Immunol Rev* 1991;121: 5–28.
- van Riel PL, van Gestel AM, Scott DL, European League against Rheumatism. *EULAR handbook of clinical assessments in Rheumatoid Arthritis*, 3rd edition.
- Veit TD, de Lima CP, Cavalheiro LC, Callegari-Jacques SM, Brenol CV, Brenol JC et al. HLA-G +3142 polymorphism as a susceptibility marker in two rheumatoid arthritis populations in Brazil. *Tissue Antigens* 2014; 83(4):260–266.
- Veit TD, de Lima CPS, Cavalheiro LC, Callegari-Jacques SM, Brenol CV, Brenol JCT, Xavier RM, da Cunha Sauma MFL, dos Santos EJM, Chies JAB. HLA-G +3142 polymorphism as a susceptibility marker in two rheumatoid arthritis populations in Brazil. *Tissue Antigens* 2014; 83: 260-6.
- Veit TD, de Lima CPS, Cavalheiro LC, Callegari-Jacques SM, Brenol CV, Brenol JCT, Xavier RM, da Cunha Sauma MFL, dos Santos EJM, Chies JAB. HLA-G +3142 polymorphism as a susceptibility marker in two rheumatoid arthritis populations in Brazil. *Tissue Antigens* 2014; 83: 260-6.
- Veit TD, Vianna P, Scheibel I, Brenol C, Brenol JCT, et al. Association of the HLA-G 14-bp insertion/deletion polymorphism with juvenile idiopathic arthritis and rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 2008; 71: 440-6.
- Veit TD, Vianna P, Scheibel I, Brenol C, Brenol JCT, et al. Association of the HLA-G 14-bp insertion/deletion polymorphism with juvenile idiopathic arthritis and rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 2008; 71: 440-6.
- Verbruggen LA, Rebmann V, Damanet C, De Cock S, Grosse-Wilde H. Soluble HLA-G in Rheumatoid Arthritis. *Human Immunology* 2006; 67: 561-7.
- Verbruggen LA, Rebmann V, Damanet C, De Cock S, Grosse-Wilde H. Soluble HLA-G in Rheumatoid Arthritis. *Human Immunology* 2006; 67: 561-7.
- Verbruggen LA, Rebmann V, Demanet C, De Cock S, Grosse-Wilde H. Soluble HLA-G in rheumatoid arthritis. *Hum. Immunol* 2006; 67: 561–7.
- Verport KN, van Gaalen FA, van der Helm-van Mil AHM, et al. Association of HLA-DR3 with anti-cyclic citrullinated peptide antibody-negative Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 3058-62.
- Verport KN, van Gaalen FA, van der Helm-van Mil AHM, et al. Association of HLA-DR3 with anti-cyclic citrullinated peptide antibody-negative Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 3058-62.
- Viegas Brenol C, Degani Veit T, Bogo Chies JA, Machado Xavier R. The role of HLA-G gene and molecule on the clinical expression of rheumatologic diseases. *Rev Bras Rheumatol* 2012; 52 (1).

- Vignal C, et al. Genetic association of the major histocompatibility complex with rheumatoid arthritis implicates two non-DRB1 loci. *Arthritis Rheum* 2009; 60:53–62.
- Weinblatt ME, Keystone EC, Furst DE, Kavanaugh AF, Chartash EK, Segurado OG. Long-term efficacy and safety of Adalimumab plus Methotrexate in patients with rheumatoid arthritis: ARMADA 4-year extended study. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 753-9.
- Weisman MH, Furst DE, Park GS, Kremer JM, Smith KM, Wallace DJ, Caldwell JR, Dervieux T. Risk genotypes in folate-dependent enzymes and their association with methotrexate-related side effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2006 Feb;54(2):607-12.
- Wessels JA, de Vries-Bouwstra JK, Heijmans BT, Slagboom PE, Goekoop-Ruiterman YP, Allaart CF, Kerstens PJ, van Zeben D, Breedveld FC, Dijkmans BA, Huizinga TW, Guchelaar HJ. 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 Apr; 54(4):1087-95.
- Weyand CA, Hicok KC, Conn DL, Goronzy J. The influence of HLA-DRB1 genes on disease severity in rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* 1992; 117: 801-6.
- Weyand CA, Hicok KC, Conn DL, Goronzy J. The influence of HLA-DRB1 genes on disease severity in rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* 1992; 117: 801-6.
- Xie G1, Lu Y, Sun Y, Zhang SS, Keystone EC, Gregersen PK, Plenge RM, Amos CI, Siminovitch KA. Identification of the NF- κ B activating protein-like locus as a risk locus for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2013 Jul;72(7):1249-54
- Youinou P, Pers JO, Gershwin ME, Shoenfeld Y. Geo-epidemiology and autoimmunity. *J Autoimmun*. 2010 May; 34(3):J163-7.

presente dichiarazione attraverso l'Archivio istituzionale ad accesso aperto "EPRINTS.unife.it" oltre che attraverso i Cataloghi delle Biblioteche Nazionali Centrali di Roma e Firenze. DICHIARO SOTTO LA MIA RESPONSABILITÀ: (1) che la copia della tesi depositata presso l'Università di Ferrara in formato cartaceo è del tutto identica a quella presentata in formato elettronico (CD-ROM, DVD), a quelle da inviare ai Commissari di esame finale e alla copia che produrrà in seduta d'esame finale. Di conseguenza va esclusa qualsiasi responsabilità dell'Ateneo stesso per quanto riguarda eventuali errori, imprecisioni o omissioni nei contenuti della tesi; (2) di prendere atto che la tesi in formato cartaceo è l'unica alla quale farà riferimento l'Università per rilasciare, a mia richiesta, la dichiarazione di conformità di eventuali copie. PER ACCETTAZIONE DI QUANTO SOPRA RIPORTATO

Dichiarazione per embargo

12 mesi

Richiesta motivata embargo

1. Tesi in corso di pubblicazione

Liberatoria consultazione dati Eprints

Consapevole del fatto che attraverso l'Archivio istituzionale ad accesso aperto "EPRINTS.unife.it" saranno comunque accessibili i metadati relativi alla tesi (titolo, autore, abstract, ecc.)

Firma del dottorando

Ferrara, li 09/03/2015 (data) Firma del Dottorando

Ella Bonomo Raveri

Firma del Tutore

Visto: Il Tutore Si approva Firma del Tutore

Alfredo Raveri