

Studio farmacogenetico nel trattamento del tabagismo: prospettive future verso un approccio terapeutico sempre più personalizzato

Pharmacogenetic study in smoking-cessation therapies: future perspectives toward a personalized therapeutic approach

Giulia Pintarelli, Antonella Galvan, Paolo Pozzi, Sara Noci, Giovanna Pasetti, Francesca Sala, Ugo Pastorino, Roberto Boffi, Francesca Colombo

Riassunto

Introduzione: Il fumo di sigaretta è, in tutto il mondo, la principale causa evitabile di mortalità. Tuttavia, smettere di fumare è difficile a causa della dipendenza dalla nicotina che si sviluppa nei fumatori. Diversi studi genetici hanno dimostrato che la dipendenza dalla nicotina è geneticamente determinata. Tra i diversi loci cromosomici che sono stati associati a questo fenotipo, alcuni contengono i geni codificanti per le subunità dei recettori nicotinici dell'acetilcolina (nAChR). Alcuni polimorfismi in questi geni sono stati associati anche alla risposta alle terapie antifumo.

Metodi: In questo studio, abbiamo genotipizzato sette polimorfismi in 3 subunità dei recettori nicotinici (*CHRNA4*, *CHRNA5*, *CHRN2*) in 337 fumatori adulti, sottoposti a terapia antitabagica. Abbiamo valutato la possibile associazione tra queste varianti genetiche e la dipendenza dalla nicotina (misurata in termini di numero di sigarette fumate quotidianamente o di livelli di monossido di carbonio espirato) o la risposta alla terapia farmacologica.

Risultati: Quattro polimorfismi nel locus del gene *CHRNA5* (rs503464, rs55853698, rs55781567 e rs16969968) sono risultati significativamente associati a entrambi i fenotipi di dipendenza dalla nicotina e rs503464, in particolare, è risultato associato anche alla risposta alla terapia. I nostri risultati supportano il ruolo della costituzione genetica individuale nella capacità di smettere di fumare.

Conclusioni: Ulteriori studi che coinvolgano un più ampio numero di soggetti sono necessari per validare i risultati ottenuti. Questi studi permetteranno di dimostrare l'utilità clinica della genotipizzazione del polimorfismo rs503464, nell'ottica di una terapia personalizzata di disassuefazione dal fumo, in cui si potrà scegliere il trattamento farmacologico migliore in base alla costituzione genetica dell'individuo.

Parole chiave: Fumo di tabacco, terapie per disassuefazione, farmacogenetica, SNPs, *CHRNA5*.

Abstract

Background: Cigarette smoke is the main preventable cause of mortality. However, quitting smoking is difficult because of nicotine addiction. Several genetic studies have shown that nicotine addiction is genetically determined. Among the different loci that have been associated with this phenotype, some contain the genes coding for the subunits of the nicotinic acetylcholine receptors (nAChR). Some polymorphisms in these genes have also been associated with the response to smoking cessation therapies.

Methods: We genotyped seven polymorphisms in three nAChR genes (*CHRNA4*, *CHRNA5*, *CHRN2*) in 337 adult smokers, undergoing smoking cessation therapy with varenicline, bupropion, nicotine replacement therapy (NRT) alone, or NRT plus bupropion. We carried out an association

study between these genetic variants and smoking habit (measured as the number of cigarettes smoked per day (CPD) or levels of exhaled CO (eCO)) and abstinence at three time points.

Results: Four polymorphisms in the *CHRNA5* gene locus (rs503464, rs55853698, rs55781567 and rs16969968) were significantly associated with both CPD and eCO ($P < 0.01$). rs503464 was also associated with the response to therapy at short-, mid- and long-term ($P = 0.011$, $P = 0.0043$, $P = 0.020$, respectively), although after correction for multiple testing only the association at the mid-term assessment remained significant ($FDR = 0.03$).

Conclusion: These data support the role of individual genetic makeup in the ability to quit smoking. Further studies involving a larger number of subjects are needed to validate the obtained results and to demonstrate the clinical utility of rs503464 genotyping. Pharmacogenetic studies for the identification of germline polymorphisms affecting the response to smoking cessation drugs will allow a more personalized management of patients who want to quit smoking, thanks to a tailored selection of the best pharmacological treatment for each patient, chosen on the basis of its individual genetic constitution.

Keywords: Tobacco smoking, smoking cessation therapy, pharmacogenetics, SNPs, *CHRNA5*.

Introduzione

Il fumo di sigaretta è la principale causa di morbilità e mortalità in tutto il mondo [1]. Il consumo di tabacco aumenta il rischio di morte per molte patologie, tra cui quelle cardiovascolari, quelle dell'apparato respiratorio e quelle neoplastiche [2,3]. Smettere di fumare prima dei 40 anni riduce il rischio di morte per malattie correlate al fumo di circa il 90% [3,4]. Tuttavia, smettere di fumare è molto difficile, basti pensare che, annualmente, solo il 6% circa dei fumatori riesce a smettere di fumare di sua propria volontà [5].

La propensione a smettere di fumare è influenzata negativamente dalla dipendenza dalla nicotina: infatti, i forti fumatori hanno una maggior probabilità di fallire il loro percorso di disassuefazione rispetto a chi fuma poco [6]. Diversi studi genetici hanno ampiamente dimostrato che la dipendenza dalla nicotina e la capacità di smettere di fumare sono geneticamente determinati [7], e diversi loci cromosomici sono stati associati a questi fenotipi [8-12]. In particolare, tre di questi loci contengono geni codificanti sei subunità del recettore nicotinico dell'acetilcolina (nAChR): *CHRNA3-CHRNB3* sul cromosoma 8p11, *CHRNA5-CHRNA3-CHRNB4* sul cromosoma 15q25 e *CHRNA4* sul cromosoma 20q13. Varianti genetiche a singolo nucleotide (SNPs) in questi loci so-

no state ripetutamente riportate associate alla dipendenza dalla nicotina [13]. Si ritiene che anche altri SNPs in altre subunità del recettore nAChR (es. *CHRNA2* sul cromosoma 1), siano associati alla dipendenza dalla nicotina [14].

I recettori nAChR sono canali cationici attivati dall'acetilcolina, espressi nel sistema nervoso, nei muscoli e nei polmoni. Questi recettori sono composti da cinque subunità che si assemblano in varie combinazioni. Esistono molte diverse subunità chiamate $\alpha 1-10$, $\beta 1-4$, γ , δ ed ϵ . I recettori nAChR sono responsabili della dipendenza dalla nicotina [15], in quanto sono anche attivati dalla nicotina stessa, che è la sostanza biologicamente attiva maggiormente presente nelle sigarette [16]. Pertanto, i recettori nAChR costituiscono un bersaglio delle terapie farmacologiche di disassuefazione dal fumo. Attualmente, i farmaci utilizzati per questo scopo in clinica sono: la terapia sostitutiva della nicotina (NRT), la vareniclina, e il bupropione [17]. La vareniclina lega i recettori nAChR costituiti dalle subunità $\alpha 4\beta 2$, come un'agonista parziale [18], mentre il bupropione è un antagonista non competitivo dei recettori nAChR [19]. L'efficacia di questi trattamenti, purtroppo, è ancora limitata e molto variabile tra i pazienti [20]. Tale variabilità potrebbe essere dovuta a differenze genetiche

nei recettori nAChR: infatti, diversi studi farmacogenetici hanno trovato associazioni significative tra polimorfismi nei geni che codificano le varie subunità dei recettori nAChR e il tasso di successo del trattamento farmacologico per la disassuefazione dal fumo [12,21]; tuttavia i risultati dei diversi studi sono spesso contrastanti.

Allo scopo di valutare la possibilità che variazioni genetiche nelle subunità del recettore nAChR possano influenzare l'abitudine al fumo e l'efficacia delle terapie di disassuefazione dal fumo, abbiamo studiato una coorte di fumatori adulti che si sono sottoposti alle terapie farmacologiche antifumo presso il nostro Istituto. In particolare, abbiamo genotipizzato sette polimorfismi in tre subunità del recettore nAChR: rs2236196, in *CHRNA4*, un polimorfismo precedentemente riportato associato alla disassuefazione dal fumo durante il trattamento con vareniclina [12], ma non durante la terapia NRT [22]; rs16969968, un polimorfismo codificante in *CHRNA5* che si ritiene sia in grado di influenzare la dipendenza dalla nicotina alterando la funzione dei recettori nAChR contenenti la subunità $\alpha 5$ [23]; tre SNP nel 5'-UTR (rs503464, rs55853698, and rs55781567) e un'inserzione/delezione di 22 paia di basi (rs3841324) nel promotore di *CHRNA5*, tutte varianti coinvolte

nella dipendenza dalla nicotina attraverso un meccanismo di modulazione dei livelli di mRNA della subunità $\alpha 5$ [24-29]; e, infine, rs2072661 in *CHRNA5* precedentemente associato alla dipendenza da nicotina [14] ma non alla risposta al trattamento farmacologico o alla terapia comportamentale per la disassuefazione dal fumo [30]. L'obiettivo di questo studio è stato quello di identificare varianti genetiche che potessero predire l'intensità dell'abitudine al fumo e l'efficacia delle terapie farmacologiche antifumo.

Metodi

Reclutamento dei pazienti, trattamento farmacologico e raccolta dati

Questo studio è stato condotto presso la Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori (Milano, Italia), in seguito all'approvazione del protocollo di studio da parte del Comitato Etico dell'Istituto e in accordo con i principi della Dichiarazione di Helsinki. Sono stati inclusi nello studio 337 fumatori adulti intenzionati a smettere di fumare. Di questi, 214 avevano seguito, tra il 2009 e il 2012, un percorso di disassuefazione dal fumo proposto dal Centro Antifumo dell'Istituto stesso. I restanti 123 soggetti avevano invece partecipato a un programma di disassuefazione dal fumo incluso nello studio clinico Multicentric Italian Lung Detection (MILD) durante il 2009-2010 [31]. Tutti i pazienti avevano firmato il modulo di consenso informato per la raccolta di materiale biologico e l'utilizzo di dati clinici e personali a scopi di ricerca.

I pazienti reclutati, indipendentemente dalla loro età e da quanto fumassero, presso il Centro Antifumo sono stati trattati, in base alle loro caratteristiche, con vareniclina, bupropione, NRT, o una combinazione di NRT e bupropione. I pazienti inclusi nello studio MILD erano tutti forti fumatori (> 20 pacchetti di sigarette all'anno) e con un'età compresa tra 49 e 75 anni,

e sono stati trattati tutti con vareniclina, seguendo il seguente schema di trattamento: 0,5 mg/die per i primi tre giorni, 0,5 mg due volte al giorno per i successivi quattro giorni e 1 mg due volte al giorno dall'ottavo giorno fino alla fine del terzo mese. Tutti i 337 pazienti hanno ricevuto un supporto psicologico, come descritto in Pozzi e coll. [31].

Per tutti i pazienti coinvolti nello studio, abbiamo raccolto informazioni riguardanti l'età, il sesso e l'abitudine al fumo in quattro punti temporali (prima dell'inizio del trattamento e alle visite di controllo dopo 1, 3 e 12 mesi dall'inizio della terapia). In ciascuna visita i pazienti dichiaravano se fumavano (e il numero di sigarette fumate al giorno, CPD) o se avevano smesso. Inoltre, erano sottoposti a una misurazione del monossido di carbonio esalato (eCO), parametro usato per monitorare la cessazione dell'abitudine al fumo [32]. I valori di CPD ed eCO prima dell'inizio della terapia sono state considerate come misure di dipendenza dalla nicotina. I pazienti, durante il follow-up, sono stati definiti come pazienti che avevano smesso di fumare se dichiaravano di aver smesso e avevano misurazioni di eCO < 6 ppm. Per tutti i pazienti abbiamo raccolto un campione di sangue periferico per gli studi genetici.

Estrazione DNA e genotipizzazione

Il DNA genomico è stato estratto dal sangue con il kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) e quantificato con metodo spettrofotometrico (ND-2000c, NanoDrop Products, Wilmington, DE, USA). Frammenti contenenti i polimorfismi sono stati amplificati tramite PCR, utilizzando specifici primer (le cui sequenze sono disponibili su richiesta).

Sei SNP sono stati genotipizzati mediante pirosequenziamento (con sistema PSQ96MA, Biotage, Svezia, e software PyroMark Q96 ID, Qiagen): rs2072661 in *CHRNA5*, 4 SNP in *CHRNA5* (rs503464, rs55853698, rs55781567 e rs16969968) e

rs2236196 in *CHRNA4*. Un polimorfismo del tipo inserzione/delezione di 22-bp (ins/del, rs3841324), 71 bp a monte del sito di inizio di trascrizione del gene *CHRNA5*, è stato genotipizzato mediante elettroforesi su gel di agarosio al 3%.

Analisi statistiche

L'associazione tra le terapie e il tasso di successo della disassuefazione dal fumo, in ciascun punto temporale studiato, è stata analizzata con il test di Cochran-Armitage.

Per ciascun polimorfismo è stato valutato che le frequenze genotipiche rispettassero l'equilibrio di Hardy-Weinberg.

Sono state condotte analisi di regressione lineare con i dati raccolti ai tre tempi durante il protocollo di trattamento. La prima valutazione era un mese dopo l'inizio della terapia: riflette la capacità dei pazienti di smettere di fumare entro il quattordicesimo giorno del trattamento (risposta a breve termine). La seconda valutazione era tre mesi dopo l'inizio della terapia: corrisponde alla conclusione della terapia standard (risposta a medio termine). L'ultima valutazione era 12 mesi dopo l'inizio della terapia: indica se gli effetti delle terapie di disassuefazione dal fumo sono mantenuti nel tempo (risposta a lungo termine). Le associazioni tra i genotipi e i valori prima dell'inizio della terapia di CPD ed eCO sono state analizzate mediante analisi di regressione lineare, usando la variabile sesso come covariata e considerando un modello additivo dell'effetto del genotipo sul fenotipo. Le associazioni tra i genotipi e la risposta alla terapia sono state analizzate mediante analisi di regressione logistica (covariate: sesso, farmaco somministrato, ed eCO) considerando un modello additivo dell'effetto del genotipo sul fenotipo. La significatività di queste analisi è stata aggiustata per test multipli utilizzando la procedura di Benjamini-Hochberg per calcolare il *false discovery rate* (FDR). Abbiamo anche valutato un modello di

dominanza dell'allele minore dello SNP rs503464, confrontando il gruppo di individui omozigoti e omozigoti per l'allele minore con gli individui omozigoti per l'allele maggiore. Anche in questo caso abbiamo condotto un'analisi di regressione logistica, considerando sesso del paziente e farmaco somministrato come covariate. Tutte le analisi sono state condotte con il software PLINK e la soglia di significatività è stata fissata a $p < 0,05$.

Risultati

Nello studio sono stati inclusi 337 adulti (**Tabella 1**) che avevano partecipato a due programmi di disassuefazione dal fumo presso la Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori di Milano, al Centro Antifumo oppure nel contesto del *trial* clinico Multicentric Italian Lung Detection (MILD). Prima di iniziare il trattamento farmacologico, i soggetti studiati consumavano mediamente 20 sigarette al giorno (CPD) e avevano un livello mediano di monossido di carbonio esalato (eCO) pari a 20 parti per milione (ppm). Due terzi dei partecipanti hanno ricevuto un trattamento farmacologico con vareniclina, mentre gli altri sono stati trattati con bupropione, NRT, o una combinazione di questi due.

Un mese dopo l'inizio della terapia farmacologica (valutazione a breve termine) la maggior parte dei pazienti (76,3%) aveva smesso di fumare (**Figura 1**). Alle valutazioni a medio e lungo termine (tre e 12 mesi dopo l'inizio del trattamento), la percentuale di pazienti che non fumava era inferiore, rispettivamente il 64,4% e 47,2%, a causa delle ricadute. Infatti, 92 pazienti che avevano smesso di fumare alla visita di controllo a breve termine hanno ricominciato a fumare entro l'anno dall'inizio della terapia. Non è stata osservata alcuna associazione significativa tra il tipo di terapia e il tasso di successo della disassuefazione da fumo, in nessun punto temporale analizzato (**Tabella 2**).

Tabella 1 Caratteristiche dei 337 soggetti sottoposti alle terapie antifumo.

Caratteristiche	N (%) o mediana (intervallo)
Sesso, n (%)	
Maschi	197 (58)
Femmine	140 (42)
Età all'inizio della terapia, anni	
	55 (19 – 75)
Numero di sigarette fumate al giorno *	
	20 (1 – 70)
eCO, ppm *	
	20 (0 – 75)
Terapia, n (%)	
Vareniclina	225 (66,7)
Bupropione	34 (10,2)
NRT	67 (19,8)
Bupropione + NRT	11 (3,3)

* prima dell'inizio della terapia.

eCO = monossido di carbonio esalato; NRT = terapia sostitutiva della nicotina.

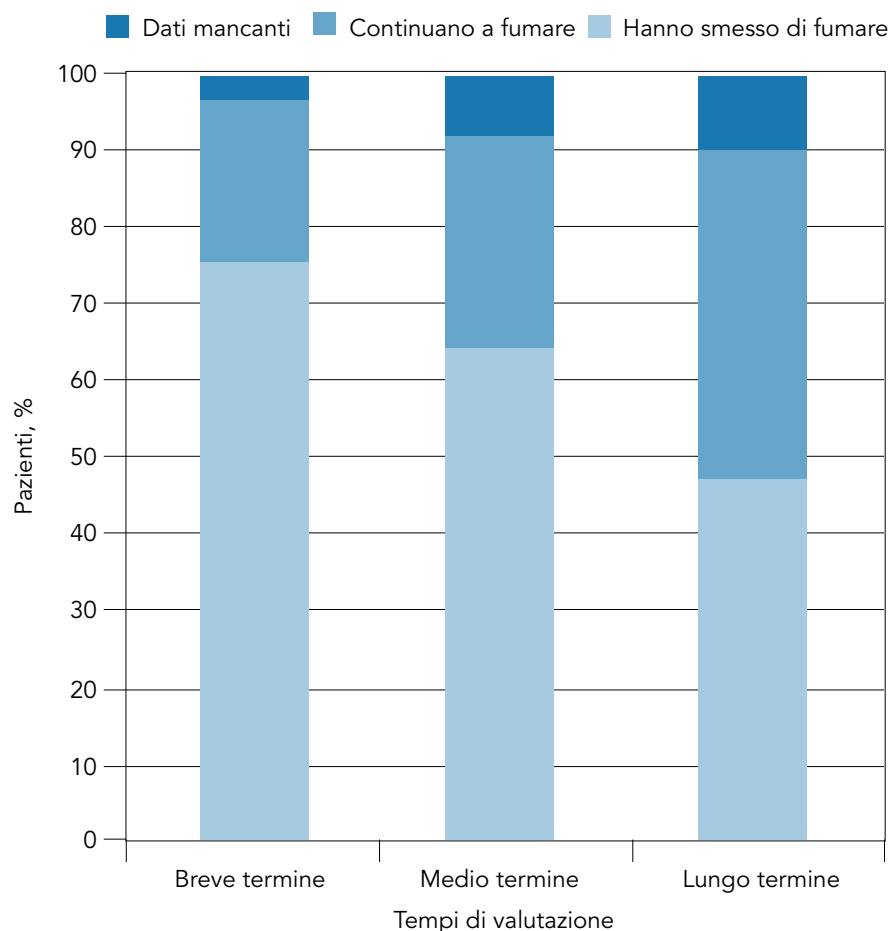


Figura 1 Risposta alla terapia di disassuefazione dal fumo per 337 fumatori, alle valutazioni a breve, medio e lungo termine (rispettivamente 1, 3, e 12 mesi dopo l'inizio del trattamento).

Tabella 2 Efficacia delle terapie di disassuefazione dal fumo alle visite a breve, medio e lungo termine.

	Vareniclina	Bupropione	NRT	Bupropione + NRT
Numero di soggetti trattati	225	34	67	11
Soggetti che hanno smesso di fumare, n (%)				
1 mese	170 (76)	30 (88)	47 (70)	10 (91)
3 mesi	143 (64)	28 (82)	38 (57)	8 (73)
12 mesi	94 (42)	23 (68)	37 (55)	5 (46)

NRT = terapia sostitutiva della nicotina.

Nessuna associazione significativa è stata osservata tra il tipo di terapia e l'efficacia della terapia stessa, in tutti e tre i tempi analizzati (test di Cochran-Armitage, $p > 0,05$).

I polimorfismi nel gene *CHRNA5* sono associati alla dipendenza dalla nicotina

Abbiamo valutato l'associazione di questi polimorfismi con due diverse misure (fenotipi) di dipendenza dalla nicotina: CPD ed eCO misurati prima dell'inizio della terapia. Quattro SNP nel locus del gene *CHRNA5* (rs503464, rs55853698, rs55781567 e rs16969968) sono risultati significativamente associati a entrambi i fenotipi (**Tabella 3**). In particolare, le associazioni di questi quattro SNP con CPD ed eCO risultavano

statisticamente significative anche dopo la correzione per test multipli ($FDR < 0,05$). Non sono state trovate associazioni significative, invece, tra gli SNP rs3841324 in *CHRNA5*, rs2072661 in *CHRNA5*, e rs2236196 in *CHRNA4*, con entrambi i fenotipi.

In dettaglio, per i quattro SNP significativamente associati a CPD ed eCO, l'analisi di regressione lineare ha mostrato due diversi tipi di effetto dell'allele minore (**Figura 2**, **Tabella 3**). Lo SNP rs503464 aveva un valore negativo di β nell'asso-

ciamento con CPD ($p = 0,6 \times 10^{-3}$), indicando che all'aumentare del numero di alleli minori (A), si è osservato un numero inferiore di sigarette fumate al giorno.

Al contrario, gli altri tre SNP significativi (rs55853698, rs55781567 e rs16969968) avevano $\beta > 0$, che significava che un maggior numero di alleli minori era associato a un maggiore numero di sigarette fumate giornalmente. Per quanto riguarda l'eCO, i valori di β per ciascuno SNP significativamente associato erano concordi con quanto osservato nell'analisi di associazione

Tabella 3 Associazione tra le variabili di dipendenza dalla nicotina e gli SNP nei geni codificanti per le subunità del recettore nicotinico dell'acetilcolina, in 337 soggetti (analisi di regressione lineare).

Polimorfismo	Chr.	Gene ¹	Posizione (bp) ²	Allele minore	CPD			eCO		
					β	P^3	FDR ⁴	β	P^3	FDR ⁴
rs2072661	1	<i>CHRNA5</i>	154.576.404	T	-0,97	0,30	0,35	0,068	0,95	0,95
rs3841324	15	<i>CHRNA5</i>	78.565.480	D ⁵	-0,16	0,85	0,85	-0,58	0,55	0,64
rs503464	15	<i>CHRNA5</i>	78.565.554	A	-3,5	$0,6 \times 10^{-3}$	$3,9 \times 10^{-3}$	-3,9	$0,80 \times 10^{-3}$	$3,7 \times 10^{-3}$
rs55853698	15	<i>CHRNA5</i>	78.565.597	G	2,0	$8,1 \times 10^{-3}$	0,014	2,8	$2,1 \times 10^{-3}$	$3,7 \times 10^{-3}$
rs55781567	15	<i>CHRNA5</i>	78.565.644	G	2,1	$5,6 \times 10^{-3}$	0,013	2,9	$1,7 \times 10^{-3}$	$3,7 \times 10^{-3}$
rs16969968	15	<i>CHRNA5</i>	78.590.583	T	2,2	$4,4 \times 10^{-3}$	0,013	2,8	$2,1 \times 10^{-3}$	$3,7 \times 10^{-3}$
rs2236196	20	<i>CHRNA4</i>	63.346.204	C	-1,0	0,19	0,27	-0,95	0,32	0,45

Chr. = cromosoma; bp = paia di basi; CPD = sigarette fumate al giorno; eCO = monossido di carbonio esalato.

¹ Gene più vicino allo SNP o in cui lo SNP mappa.

² La posizione genomica è basata sulla versione GRCh38.p5 del genoma di riferimento.

³ Regressione lineare corretta per sesso e che suppone un effetto additivo degli alleli degli SNP; $\beta > 0$ indica una proporzionalità diretta tra il numero di alleli minori e le variabili correlate al fumo.

⁴ False discovery rate ottenuto usando la procedura di Benjamini-Hochberg per l'aggiustamento per test multipli.

⁵ Il polimorfismo rs3841324 (anche chiamato rs67624739 o rs142774214) è un'inserzione/delezione di 22 bp; D = delezione.

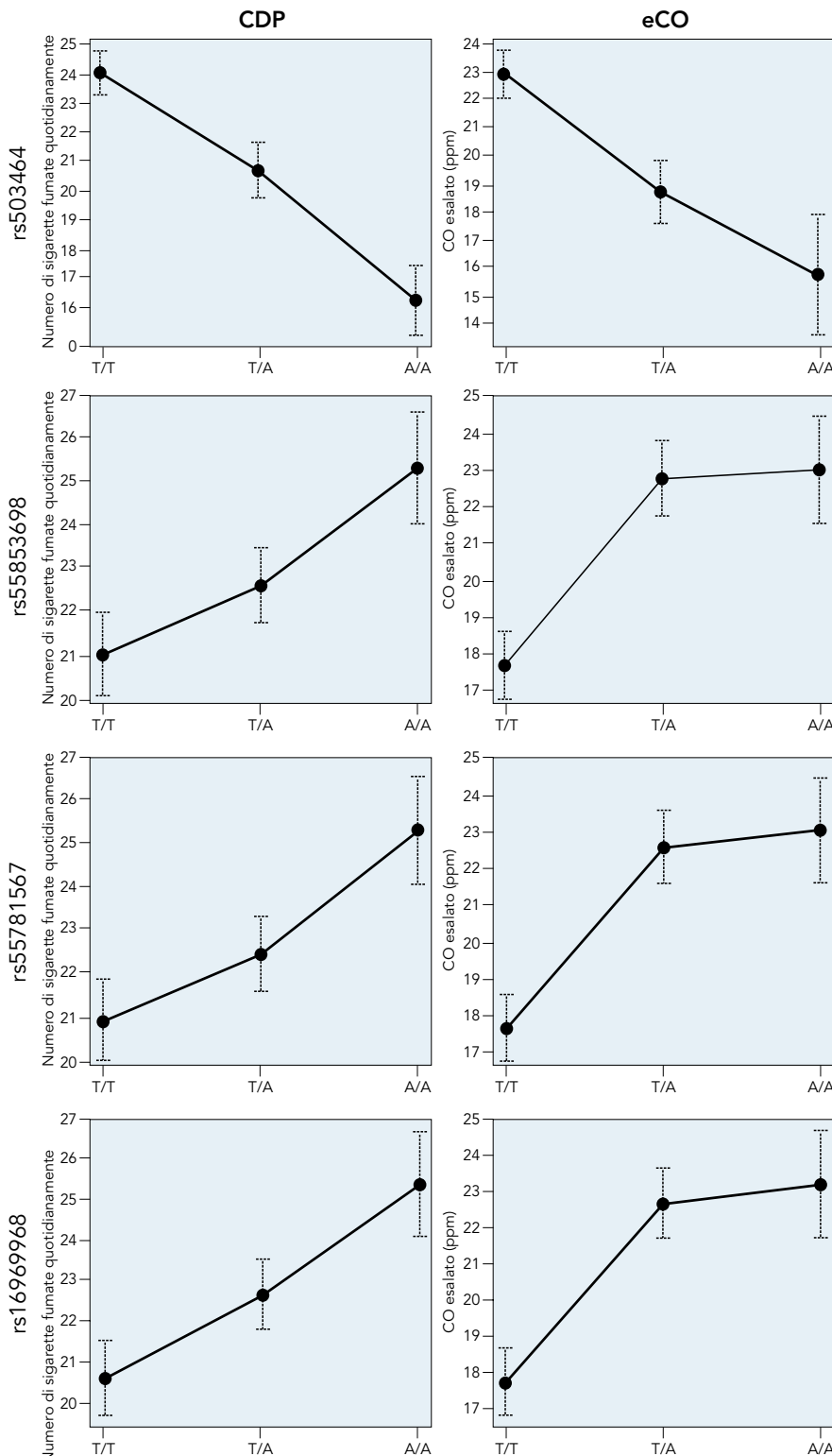


Figura 2 Numero di sigarette fumate al giorno (CPD) e livelli di CO esalato (eCO) in base al genotipo dei quattro SNP nel locus *CHRNA5*. I punti rappresentano i valori medi e le barre verticali i rispettivi errori standard (SE).

con il fenotipo CPD, ovvero, a seconda del numero di alleli minori, la variazione dei livelli di eCO an-

dava nella stessa direzione della variazione osservata nel numero di sigarette fumate al giorno.

Lo SNP rs503464 nel 5'-UTR di *CHRNA5* è associato alla disassuefazione dal fumo

Abbiamo poi valutato l'associazione degli SNP nel recettore nAChR con la risposta alla terapia farmacologica per la disassuefazione dal fumo (**Tabella 4**). Solo lo SNP rs503464, una variante nel 5' UTR di *CHRNA5*, è risultata associata alla risposta ($p < 0,05$), a tutti e tre i tempi valutati, con un odds ratio (OR) < 1 , che indica che un maggior numero di alleli minori (A) conferisce una minore probabilità di continuare a fumare. Poiché tale associazione è stata osservata con un modello di regressione logistica, che includeva i livelli di eCO come covariata, possiamo affermare che essa sia indipendente dal possibile effetto confondente della variabile dipendenza dalla nicotina. Dopo correzione per test multipli, tuttavia, è risultata statisticamente significativa solo l'associazione con la risposta a medio termine alla terapia antifumo (FDR $< 0,05$). Alla visita di controllo dopo tre mesi dall'inizio della terapia, il numero di pazienti che non fumavano più era aumentato proporzionalmente al numero di alleli minori dello SNP rs503464: infatti, 10 su 11 soggetti con il genotipo AA (91%) avevano smesso di fumare dopo tre mesi dall'inizio della terapia antitabagica (**Figura 3**).

Abbiamo, infine, ripetuto l'analisi di regressione logistica per lo SNP rs503464 raggruppando i soggetti in base al loro genotipo, in accordo con un modello genetico di dominanza dell'allele minore (confrontando, cioè, gli individui portatori di almeno un allele minore con gli individui omozigoti per l'allele più frequente nella popolazione).

Anche in quest'analisi, l'OR per lo SNP rs503464 era inferiore a uno in tutti e tre i tempi analizzati, indicando che i soggetti con almeno un allele minore (A) hanno una probabilità minore di continuare a fumare, dopo terapia farmacologica per la disassuefazione dal fumo, rispetto agli individui omozigoti per l'allele maggiore (**Figura 4**).

Tabella 4 Associazione tra la risposta alle terapie di disassuefazione dal fumo e gli SNP nei geni codificanti per le subunità del recettore nicotinico dell'acetilcolina, ai tre tempi analizzati, in 337 soggetti (analisi di regressione logistica).

Polimorfismo	Allele maggiore/ minore	MAF	Breve termine ¹			Medio termine ¹			Lungo termine ¹		
			OR (95% CI)	P ²	FDR ³	OR (95% CI)	P ²	FDR ³	OR (95% CI)	P ²	FDR ³
rs2072661	C/T	0,22	0,77 (0,48-1,2)	0,28	0,39	0,68 (0,44-1,1)	0,08	0,14	0,90 (0,61-1,3)	0,59	0,98
rs3841324	I/D ⁴	0,33	1,1 (0,73-1,7)	0,67	0,67	1,1 (0,78-1,6)	0,51	0,60	1,4 (0,96-2,0)	0,082	0,22
rs503464	T/A	0,19	0,46 (0,25-0,84)	0,011	0,077	0,46 (0,27-0,78)	4,3x10 ⁻³	0,030	0,59 (0,38-0,92)	0,020	0,14
rs55853698	T/G	0,47	1,4 (0,92-2,0)	0,12	0,26	1,4 (0,97-2,0)	0,077	0,14	1,0 (0,73-1,4)	0,94	0,98
rs55781567	C/G	0,47	1,3 (0,90-1,9)	0,15	0,26	1,3 (0,94-1,9)	0,10	0,14	1,0 (0,73-1,4)	0,98	0,98
rs16969968	C/T	0,47	1,3 (0,91-2,0)	0,14	0,26	1,4 (0,96-2,0)	0,080	0,14	1,1 (0,76-1,5)	0,75	0,98
rs2236196	T/C	0,35	1,1 (0,76-1,7)	0,56	0,65	0,95 (0,66-1,3)	0,75	0,75	0,75 (0,54-1,1)	0,094	0,22

MAF = frequenza dell'allele minore; OR = odds ratio; CI = intervallo di confidenza.

¹ I tempi si riferiscono alle visite di controllo un mese (breve termine), tre mesi (medio termine) e dodici mesi (lungo termine) dopo l'inizio della terapia.

² Regressione logistica aggiustata per sesso, tipo di terapia ed eCO, supponendo un effetto *additive* degli alleli degli SNP; un OR > 1 indica che il rischio di continuare a fumare aumenta all'aumentare del numero di alleli minori.

³ *False discovery rate* ottenuto usando la procedura di Benjamini-Hochberg per l'aggiustamento per test multipli.

⁴ Il polimorfismo rs3841324 (anche chiamato rs67624739 o rs142774214) è un'inserzione/delezione di 22 bp; D = delezione; I = inserzione.

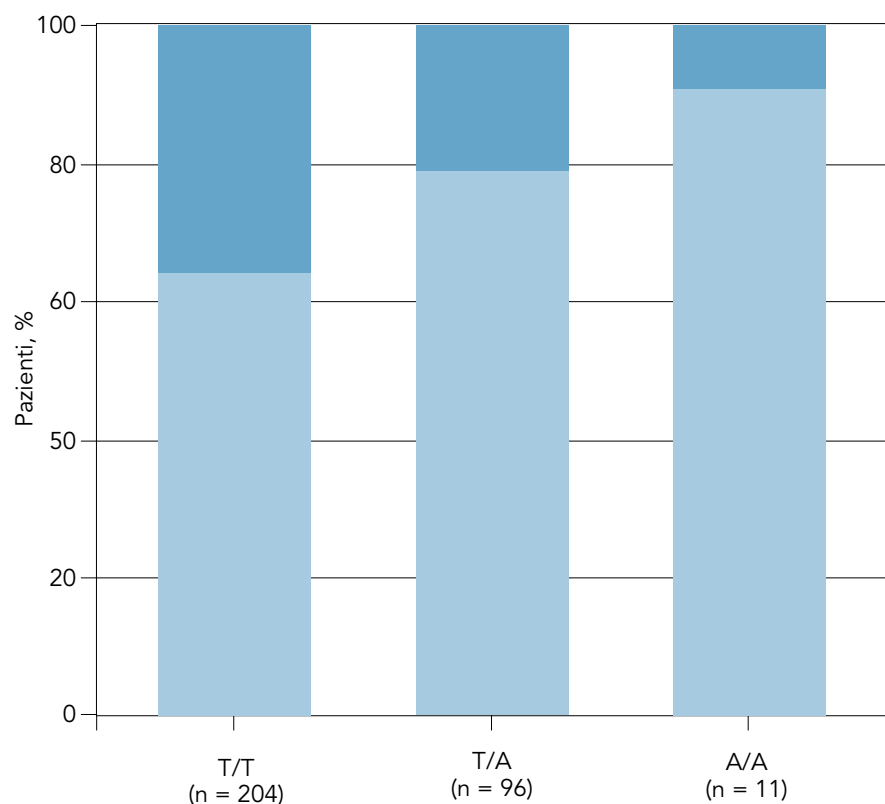


Figura 3 Status di fumatore o non fumatore dei pazienti, tre mesi dopo l'inizio della terapia, in base al genotipo dello SNP rs503464 (il numero di pazienti appartenenti a ciascun gruppo genotipico è indicato in parentesi). Le barre azzurre rappresentano la porzione di pazienti che hanno smesso di fumare, mentre in blu è rappresentata la percentuale di pazienti che continuano a fumare dopo tre mesi di trattamento.

Discussione

In questo studio, abbiamo valutato il coinvolgimento di alcuni polimorfismi, nelle subunità del recettore nAChR, nella dipendenza dalla nicotina e nella risposta alla terapia farmacologica antifumo, e abbiamo trovato un'associazione significativa tra entrambi questi fenotipi e alcuni SNP nel gene *CHRNA5*. In particolare, lo SNP codificante rs16969968 e tre SNP nel 5'-UTR (rs503464, rs55853698, rs55781567) sono risultati significativamente associati ai livelli, misurati prima dell'inizio del trattamento, sia di CPD che di eCO, utilizzati come misure quantitative della dipendenza dalla nicotina. Lo SNP rs503464 era anche associato con la risposta alle terapie antitabagiche, a tutti e tre i punti temporali presi in considerazione. Non abbiamo invece trovato alcuna associazione significativa tra la dipendenza dalla nicotina o il successo delle terapie antifumo e i due SNP scelti nei geni *CHRNA4* e *CHRN2*.

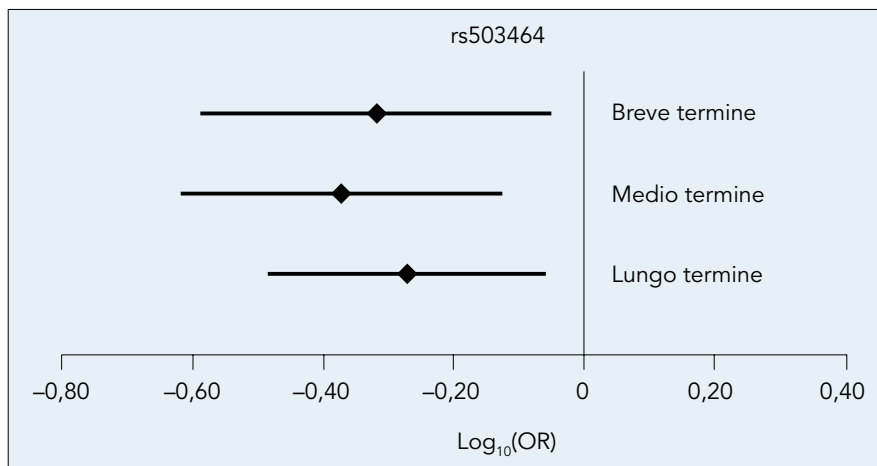


Figura 4 Gli individui portatori di almeno un allele minore (A) dello SNP rs503464 hanno una minore probabilità di continuare a fumare rispetto ai soggetti omozigoti per l'allele maggiore ($OR < 1$). Rappresentazione grafica del valore di OR trasformato in Log_{10} e dell'intervallo di confidenza al 95%, alle visite a breve, medio e lungo termine dopo l'inizio della terapia antitabagica (rispettivamente, $p = 0,020$, $p = 0,0030$, e $p = 0,012$). Un'analisi di regressione logistica è stata condotta usando sesso e tipo di terapia come covariate e supponendo un modello di dominanza dell'allele minore.

I nostri risultati sono in accordo con quelli riportati in letteratura, per quanto riguarda l'associazione tra lo SNP rs16969968 e la dipendenza dalla nicotina [33] e anche tra lo SNP rs55853698 e la quantità di fumo [34]. In aggiunta, il nostro studio ha rilevato un'associazione significativa, mai riportata finora, tra 2 polimorfismi nel 5'-UTR del gene *CHRNA5* (rs503464 e rs55781567) e la dipendenza dalla nicotina. Lo SNP rs503464 era stato già precedentemente valutato per una possibile associazione con la dipendenza dalla nicotina da Bierut e coll. [23], ma non era stata trovata alcuna significatività statistica. Invece, finora, lo SNP rs55781567 era stato solo associato ai livelli di espressione del gene *CHRNA5*. I risultati ottenuti nel nostro studio supportano l'ipotesi che la costituzione genetica individuale abbia un ruolo nell'influenzare l'abitudine al fumo. Infatti, abbiamo mostrato che sia il polimorfismo codificante rs16969968, che altera la struttura proteica della subunità $\alpha 5$, sia le varianti regolatorie (rs503464, rs55853698 e rs55781567) a mon-

te del sito di inizio della traduzione della stessa subunità, hanno un ruolo nella predisposizione genetica alla dipendenza dalla nicotina. Un'associazione significativa tra gli ultimi tre SNP (valutati come aplo-tipo insieme all'inserzione/delezione rs3841324 nel promotore del gene *CHRNA5*) e i livelli di espressione del gene *CHRNA5* nel tessuto polmonare era stata precedentemente riportata [26] e, inoltre, era stato descritto anche un ruolo funzionale *in vitro* di queste varianti, nella modulazione dell'attività trascrizionale del promotore del gene *CHRNA5* in cellule di neuroblastoma [24]. Questi risultati suggeriscono che questi polimorfismi giochino un ruolo importante nei meccanismi di dipendenza dalla nicotina, attraverso la modulazione dei livelli di mRNA della subunità $\alpha 5$ nei polmoni e probabilmente nel cervello.

Abbiamo poi trovato un'associazione, mai riportata prima d'ora, tra lo SNP regolatorio rs503464 e l'efficacia della terapia farmacologica antifumo, consistente nel tempo e indipendente dai valori basali di

CPD ed eCO dei pazienti, usati come parametri in grado di stimare la dipendenza dalla nicotina. Quest'associazione suggerisce che la disassuefazione dal fumo è associata ad alterazioni nei livelli di mRNA del gene *CHRNA5*, piuttosto che a variazioni nella sequenza amminoacidica della subunità $\alpha 5$. Ulteriori indagini saranno necessarie per comprendere meglio il meccanismo attraverso cui le alterazioni dei livelli di mRNA di *CHRNA5* modificano la capacità di un individuo di smettere di fumare in seguito a un trattamento farmacologico di disassuefazione dal fumo. La nostra osservazione, che una modulazione dei livelli di *CHRNA5* possa alterare la capacità di un individuo di smettere di fumare, è supportata da un precedente studio che ha riportato un'associazione tra l'aumento dei livelli di recettori nAChR nel cervello e il tasso di successo nello smettere di fumare [35]. Dato che, dopo la correzione per test multipli dei risultati delle analisi statistiche, solo l'associazione del polimorfismo rs503464 con la risposta a medio termine alla terapia farmacologica risultava statisticamente significativa, risulta utile una validazione del risultato ottenuto in casistiche indipendenti e più ampie di quella analizzata nel presente studio. Tutti e quattro i polimorfismi regolatori di *CHRNA5* (rs3841324, rs503464, rs55853698, e rs55781567) e anche lo SNP codificante rs16969968, analizzati in questo studio, erano stati precedentemente associati al rischio di sviluppare cancro polmonare [26,36]. Perciò, i nostri risultati supportano l'ipotesi che l'abitudine al fumo medi l'associazione tra il locus 15q25 e il rischio di sviluppare un tumore al polmone [37,38]. Complessivamente, i nostri risultati rafforzano le evidenze a favore dell'importanza della subunità $\alpha 5$ del recettore nAChR sui fenotipi correlati al fumo. La definizione dello status di fumatore mediante la misurazione del

parametro quantitativo eCO è stato sicuramente un punto di forza del nostro studio e ha reso più robusti i risultati delle analisi di associazione, rispetto all'utilizzo del parametro CPD, riportato dal fumatore stesso e, per questo, a volte non oggettivo [32], soprattutto nei casi in cui i fumatori non vogliono ammettere di aver fallito nel loro percorso di disassuefazione dal fumo. Infatti, è stato riportato che l'eCO è un biomarcatore migliore del CPD negli studi genetici di associazione [39].

In conclusione, i nostri risultati supportano il ruolo della costituzione genetica individuale nella capacità di smettere di fumare. Inoltre, è da sottolineare come essi mettano in luce l'importanza dello SNP regolatorio rs503464 di *CHRNA5* sia nella dipendenza dalla nicotina che nel riuscire a smettere di fumare. Ulteriori studi che coinvolgono un più ampio numero di soggetti sono necessari per validare l'associazione dello SNP rs503464 con la cessazione dell'abitudine al fumo grazie alle terapie antitabagiche. Questi studi permetteranno di dimostrare l'utilità clinica di questo SNP nell'ottica di una terapia personalizzata di disassuefazione dal fumo, in cui si potrà scegliere il trattamento farmacologico migliore in base alla costituzione genetica dell'individuo.

Tuttavia la strada verso questa applicazione clinica è ancora lunga. Prima di poter introdurre nella pratica clinica un test di farmacogenomica è fondamentale valutare attentamente la sua validità analitica (determinazione del genotipo accurata e riproducibile), la validità clinica (sensibilità e specificità del test), l'utilità clinica (impatto del risultato del test sulle scelte terapeutiche per il paziente e i costi dell'implementazione del test nella pratica clinica) e le possibili implicazioni etiche, legali e sociali [40]. Ad oggi, la validità analitica della genotipizzazione delle varianti nel

gene *CHRNA5* è indubbia e la validità clinica è adeguatamente supportata dalle evidenze riportate in letteratura [41]. Tuttavia ulteriori studi sono necessari per stabilirne le implicazioni etiche, legali e sociali e l'utilità clinica, in quanto ad oggi non ci sono ancora evidenze adeguate (non ci sono *trial* clinici di efficacia o studi volti a valutare i possibili costi), ma esistono delle buone premesse, come ad esempio la possibilità di tradurre l'esito del test genetico in un'azione clinica precisa (es. ottimizzare le strategie terapeutiche, motivare maggiormente i pazienti a smettere di fumare, etc.). Il potenziale impatto sulla salute, dell'implementazione dei test farmacogenomici nella terapia antifumo, è indubbiamente elevato: consentirà di aumentare il tasso di disassuefazione dal fumo e di ridurre gli effetti collaterali dei farmaci in uso, e potrà anche motivare cambiamenti nel comportamento dei fumatori, incoraggiandoli a smettere di fumare.

In conclusione, visti i risultati incoraggianti finora ottenuti e la potenziale ricaduta clinica, è necessario avviare dei *trial* clinici randomizzati, prospettici, per valutare se l'informazione genetica (sia per il polimorfismo identificato in questo studio sia per altre varianti genetiche riportate in letteratura, come ad esempio le varianti nei geni coinvolti nel metabolismo della nicotina) possa davvero essere utile nel predire la risposta alla terapia farmacologica antifumo e implementabile nella pratica clinica.

Conflitto di interessi

Tutti gli autori dichiarano di non avere conflitto di interessi.

Fonti di finanziamento

Questo studio è stato in parte supportato dai fondi ricevuti mediante i contributi del 5x1000 destinati alla ricerca sanitaria della Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei

Tumori di Milano. Francesca Colombo è assegnataria di una borsa di ricerca erogata dalla Fondazione Umberto Veronesi.

[*Tabaccologia* 2019; 1:23-33]

Giulia Pintarelli, Sara Noci, Francesca Colombo

Dipartimento di Ricerca, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milano

Antonella Galvan

Precedentemente, Dipartimento di Medicina Predittiva e Preventiva, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milano

Paolo Pozzi

Tobacco Control Unit, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milano
Unità di Riabilitazione Cardiopolmonare, Azienda Sociosanitaria Territoriale Lariana, Ospedale Sant'Antonio Abate, Cantù (CO)

Giovanna Pasetti, Francesca Sala

Unità di Riabilitazione Cardiopolmonare, Azienda Sociosanitaria Territoriale Lariana, Ospedale Sant'Antonio Abate, Cantù (CO)

Ugo Pastorino

Dipartimento di Chirurgia, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milano

Roberto Boffi

Tobacco Control Unit, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milano

Corresponding author:

Francesca Colombo

Dipartimento di Ricerca, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori

✉ francesca.colombo@istitutotumori.mi.it

► *Disclosure: gli autori dichiarano l'assenza di conflitto d'interessi.*

Bibliografia

1. Wipfli H, Samet JM. Global economic and health benefits of tobacco control: part 1. *Clin Pharmacol Ther* 2009;86:263-71.
2. Patel RR, Ryu JH, Vassallo R. Cigarette smoking and diffuse lung disease. *Drugs* 2008;68:1511-27.
3. Pirie K, Peto R, Reeves GK, Green J, Beral V, Million Women Study Collaborators. The 21st century hazards of smoking and benefits of stopping: a prospective study of one million women in the UK. *Lancet* 2013;381:133-41.
4. Jha P, Ramasundarahettige C, Landsman V, Rostron B, Thun M, Anderson RN, et al. 21st-century hazards of smoking and benefits of cessation in the United States. *N Engl J Med* 2013;368:341-50.
5. Malarcher A, Dube S, Shaw L, Babb S, Kaufmann R. Quitting Smoking Among Adults --- United States, 2001--2010. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)* 2011;60:1513-9.
6. Bierut LJ, Johnson EO, Saccone NL. A glimpse into the future - Personalized medicine for smoking cessation. *Neuropharmacology* 2014;76 Pt B:592-9.
7. Lessov-Schlaggar CN, Pergadia ML, Khroyan TV, Swan GE. Genetics of nicotine dependence and pharmacotherapy. *Biochem Pharmacol* 2008;75:178-95.
8. Gelernter J, Kranzler HR, Sherva R, Almasy L, Herman AI, Koesterer R, et al. Genome-wide association study of nicotine dependence in American populations: identification of novel risk loci in both African-Americans and European-Americans. *Biol Psychiatry* 2015;77:493-503.
9. Hancock DB, Reginsson GW, Gaddis NC, Chen X, Saccone NL, Lutz SM, et al. Genome-wide meta-analysis reveals common splice site acceptor variant in CHRNA4 associated with nicotine dependence. *Transl Psychiatry* 2015;5:e651.
10. Thorgeirsson TE, Gudbjartsson DF, Surakka I, Vink JM, Amin N, Geller F, et al. Sequence variants at CHRN3-CHRNA6 and CYP2A6 affect smoking behavior. *Nat Genet* 2010;42:448-53.
11. Tobacco and Genetics Consortium. Genome-wide meta-analyses identify multiple loci associated with smoking behavior. *Nat Genet* 2010;42:441-7.
12. King DP, Paciga S, Pickering E, Benowitz NL, Bierut LJ, Conti DV, et al. Smoking cessation pharmacogenetics: analysis of varenicline and bupropion in placebo-controlled clinical trials. *Neuropsychopharmacology* 2012;37:641-50.
13. Zuo L, Garcia-Milian R, Guo X, Zhong C, Tan Y, Wang Z, et al. Replicated risk nicotinic cholinergic receptor genes for nicotine dependence. *Genes (Basel)* 2016;7:E95.
14. Wessel J, McDonald SM, Hinds DA, Stokowski RP, Javitz HS, Kennemer M, et al. Resequencing of nicotinic acetylcholine receptor genes and association of common and rare variants with the Fagerstrom test for nicotine dependence. *Neuropsychopharmacology* 2010;35:2392-402.
15. Wu J. Understanding of nicotinic acetylcholine receptors. *Acta Pharmacol Sin* 2009;30:653-5.
16. Benowitz NL. Nicotine addiction. *N Engl J Med* 2010;362:2295-303.
17. Cahill K, Stevens S, Perera R, Lancaster T. Pharmacological interventions for smoking cessation: an overview and network meta-analysis. *Cochrane Database Syst Rev* 2013;(5):CD009329.
18. Rollema H, Chambers LK, Coe JW, Glowa J, Hurst RS, Lebel LA, et al. Pharmacological profile of the alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor partial agonist varenicline, an effective smoking cessation aid. *Neuropharmacology* 2007;52:985-94.
19. Fryer JD, Lukas RJ. Noncompetitive functional inhibition at diverse, human nicotinic acetylcholine receptor subtypes by bupropion, phencyclidine, and ibogaine. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;288:88-92.
20. Cahill K, Lindson-Hawley N, Thomas KH, Fanshawe TR, Lancaster T. Nicotine receptor partial agonists for smoking cessation. *Cochrane Database Syst Rev* 2016;(5):CD006103.
21. Kortmann GL, Dobler CJ, Bizarro L, Bau CH. Pharmacogenetics of smoking cessation therapy. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2010;153B:17-28.
22. Spruell T, Colavita G, Donegan T, Egawhary M, Hurley M, Aveyard P, et al. Association between nicotinic acetylcholine receptor single nucleotide polymorphisms and smoking cessation. *Nicotine Tob Res* 2012;14:993-7.
23. Bierut LJ, Stitzel JA, Wang JC, Hinrichs AL, Gruzca RA, Xuei X, et al. Variants in nicotinic receptors and risk for nicotine dependence. *Am J Psychiatry* 2008;165:1163-71.
24. Doyle GA, Wang MJ, Chou AD, Oleynick JU, Arnold SE, Buono RJ, et al. In vitro and ex vivo analysis of CHRNA3 and CHRNA5 haplotype expression. *PLoS One* 2011;6:e23373.
25. Falvella FS, Galvan A, Frullanti E, Dragani TA. Re: Variants weakly correlated with CHRNA5 D398N polymorphism should be considered in transcriptional deregulation at the 15q25 locus associated with lung cancer risk. *Clin Cancer Res* 2009;15(17).
26. Falvella FS, Galvan A, Colombo F, Frullanti E, Pastorino U, Dragani TA. Promoter polymorphisms and transcript levels of nicotinic receptor CHRNA5. *J Natl Cancer Inst* 2010;102:1366-70.
27. Smith RM, Alachkar H, Papp AC, Wang D, Mash DC, Wang JC, et al. Nicotinic $\alpha 5$ receptor subunit mRNA expression is associated with distant 5' upstream polymorphisms. *Eur J Hum Genet* 2010;19:76-83.
28. Wang JC, Gruzca R, Cruchaga C, Hinrichs AL, Bertelsen S, Budde JP, et al. Genetic variation in the CHRNA5 gene affects mRNA levels and is associated with risk for alcohol dependence. *Mol Psychiatry* 2009;14:501-10.
29. Wang JC, Bierut LJ, Goate AM. Variants weakly correlated with CHRNA5 D398N polymorphism should be considered in transcriptional deregulation at the 15q25 locus associated with lung cancer risk. *Clin Cancer Res* 2009;15:5599.
30. Bergen AW, Javitz HS, Krasnow R, Nishita D, Michel M, Conti DV, et al. Nicotinic acetylcholine receptor variation and response to smoking cessation therapies. *Pharmacogenet Genomics* 2013;23:94-103.

31. Pozzi P, Munarini E, Bravi F, Rossi M, La Vecchia C, Boffi R, et al. A combined smoking cessation intervention within a lung cancer screening trial: a pilot observational study. *Tumori* 2015;101:306-11.
32. Middleton ET, Morice AH. Breath carbon monoxide as an indication of smoking habit. *Chest* 2000;117:758-63.
33. Bierut LJ. Convergence of genetic findings for nicotine dependence and smoking related diseases with chromosome 15q24-25. *Trends Pharmacol Sci* 2010;31:46-51.
34. Liu JZ, Tozzi F, Waterworth DM, Pillai SG, Muglia P, Middleton L, et al. Meta-analysis and imputation refines the association of 15q25 with smoking quantity. *Nat Genet* 2010;42:436-40.
35. Brody AL, Mukhin AG, Mamoun MS, Luu T, Neary M, Liang L, et al. Brain nicotinic acetylcholine receptor availability and response to smoking cessation treatment: a randomized trial. *JAMA Psychiatry* 2014;71:797-805.
36. Shen B, Zhu Q, Zheng MQ, Chen J, Shi MQ, Feng JF. CHRNA5 polymorphism and susceptibility to lung cancer in a Chinese population. *Braz J Med Biol Res* 2013;46:79-84.
37. Galvan A, Dragani TA. Nicotine dependence may link the 15q25 locus to lung cancer risk. *Carcinogenesis* 2009;31:331-3.
38. Macqueen DA, Heckman BW, Blank MD, Janse Van Rensburg K, Park JY, Drobles DJ, et al. Variation in the alpha 5 nicotinic acetylcholine receptor subunit gene predicts cigarette smoking intensity as a function of nicotine content. *Pharmacogenomics J* 2014;14:70-6.
39. Bloom AJ, Hartz SM, Baker TB, Chen LS, Piper ME, Fox L, et al. Beyond cigarettes per day. A genome-wide association study of the biomarker carbon monoxide. *Ann Am Thorac Soc* 2014;11:1003-10.
40. Teutsch SM, Bradley LA, Palomaki GE, Haddow JE, Piper M, Calonge N, et al. The Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention (EGAPP) initiative: methods of the EGAPP Working Group. *Genet Med* 2009;11:3-14.
41. Ramsey AT, Chen LS, Hartz SM, Saccone NL, Fisher SL, Proctor EK, et al. Toward the implementation of genomic applications for smoking cessation and smoking-related diseases. *Transl Behav Med* 2018;8:7-17.



SITAB
Società Italiana di Tabaccologia

20 ANNI
SITAB

XV CONGRESSO NAZIONALE

NAPOLI
24-25 OTTOBRE 2019
Starhotels Terminus

T A B A G I S M O

PRIORITÀ ATTUALI E STRATEGIE FUTURE

SEGRETERIA SCIENTIFICA
SITAB - Società Italiana di Tabaccologia
via G. Scialoja, 39 - 00136 Roma
Tel. +39 06 39722649
Fax +39 06 233297645 - +39 06 178 2215462

SEGRETERIA ORGANIZZATIVA
E PROVIDER ECM 4921
sintex
Un modo nuovo di comunicare in Sanità

Sintex Servizi s.r.l.
Via Antonio da Recanate, 2 - 20124 Milano
Tel. +39 02 667 036 40
info@sintexservizi.it