



SIF - FARMACOGENETICA



Newsletter Numero 58 – Gennaio 2014

Attenzione: le informazioni riportate hanno solo un fine illustrativo
e non sono riferibili né a prescrizioni né a consigli medici

Sommario

- Le varianti genetiche di ABCB1 e ABCC1 associate al fallimento virologico della terapia antiretrovirale di prima linea con inibitori della proteasi in pazienti del nordest del Brasile
- La variante del gene per l'enzima semialdeide succinico deidrogenasi, ALDH5A1, può influenzare la risposta al trattamento con metadone nei pazienti affetti da dipendenza da oppiacei
- Polimorfismi genetici di SLC28A3, SLC29A1 e RRM1 predicono l'outcome in pazienti con cancro al seno metastatico in trattamento chemioterapico gemcitabina più paclitaxel
- Influenza dei Polimorfismi del gene della Vitamina D (CYP27B and VDR) sulla risposta alla terapia con Interferone/Ribavirina nell'Epatite C Cronica
- L'analisi combinata dei polimorfismi rs6051702/rs1127354 del gene ITPA predice l'insorgenza di anemia indotta da ribavirina in pazienti affetti da epatite C cronica
- Polimorfismi dei geni CYP3A4, PPAR- e ARNT e risposta al clopidogrel
- Uno studio di farmacogenetica in pazienti con maculopatia senile in trattamento con anti-VEGF
- Differenze genetiche degli enzimi del citocromo P450 e risposta al trattamento con antidepressivi
- Risultati incoerenti in studi farmacogenomici su vasta scala
- Valutazione di pattern farmacogenetici predittivi di eventi avversi in pazienti con cancro del colon-retto trattati con fluoropirimidine

LE VARIANTI GENETICHE DI ABCB1 E ABCC1 ASSOCIATE AL FALLIMENTO VIROLOGICO DELLA TERAPIA ANTIRETROVIRALE DI PRIMA LINEA CON INIBITORI DELLA PROTEASI IN PAZIENTI DEL NORDEST DEL BRASILE

A cura della Dott.ssa Stefania Cheli

Il virus dell'immunodeficienza umana di tipo 1 (HIV-1) è pandemico, infetta oltre 60 milioni di persone e causa 30 milioni di morti per complicanze dovute alla sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS). Attualmente, la prima linea del regime HAART include due inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa (NRTI) e un inibitore non nucleosidico della trascrittasi inversa (NNRTI) o un inibitore della proteasi (PI). L'effetto antiretrovirale dipende dalla farmacocinetica di questi farmaci. Evidenze suggeriscono che

polimorfismi funzionali nei geni coinvolti nel *pathway* di assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione (ADME) potrebbero, infatti, influenzare la concentrazione del farmaco, l'efficienza e l'esito complessivo della terapia antiretrovirali. Gli autori sottolineano l'importanza delle informazioni farmacogenetiche per poter sviluppare test di screening che ottimizzino e personalizzino la terapia HAART. Scopo del presente studio è la valutazione di possibili associazioni tra SNPs in cinque geni candidati e il fallimento virologico nei pazienti del nord-est del Brasile, che hanno ricevuto la terapia di prima linea HAART, stratificati per fattori clinici e aderenza al trattamento.

Duecento novantaquattro pazienti HIV-1 positivi (212 femmine e 82 maschi, età media di 30 anni all'inizio della terapia) sono stati arruolati per uno studio retrospettivo di coorte presso *Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira* (IMIP), dopo consenso informato scritto. Tutti i soggetti provengono dalla regione metropolitana di Recife (Nordest del Brasile). Il Comitato Etico locale ha approvato lo studio. Tutti i pazienti arruolati presso IMIP hanno soddisfatto i criteri d'inclusione, che consistevano in: età superiore a 18 anni, HAART da almeno un anno, senza co-infezione (epatite o tubercolosi) e nessuna storia di uso di droghe per via endovenosa. 107 pazienti, sono stati poi esclusi dalla coorte iniziale per mancata carica virale e/o conta di cellule CD4+, uno o più episodi di tossicità correlata al trattamento o mancata aderenza al trattamento. La prima linea della terapia HAART consisteva di Zidovudina (AZT) + Lamivudina (3TC) (300mg+150 mg di pillola combinata, due volte al giorno) in associazione con un NNRTI (efavirenz 600 mg una volta al giorno o 200 mg di nevirapina due volte al giorno) o un PI (lopinavir potenziato con ritonavir, 400mg+50 mg di combinazione in pillola, due volte al giorno), come previsto dalle linee guida nazionali brasiliane. Il fallimento virologico è stato definito sulla base delle linee guida del trattamento del HIV definito dal Dipartimento della Salute e dei Servizi Umani degli Stati Uniti (HHS), ovvero, come la carica virale rilevabile nonostante un anno (48 settimane) di terapia HAART. Al contrario, il successo è stato definito come la soppressione virale (<50 copie/mL) durante il primo anno di HAART. A seguito di questa classificazione, 27 pazienti sono stati ritenuti in fallimento virologico (*non-responders*, 13 femmine e 14 maschi), mentre i restanti 160 individui hanno raggiunto la soppressione virologica (*responders*, 116 femmine e 44 maschi). I geni candidati sono stati selezionati, sulla base delle precedenti evidenze presenti in letteratura, riguardo al loro coinvolgimento nei *pathways* ADME dei farmaci antiretrovirali di prima linea, come ABCB1, ABCC1, e CYP2B6. Sono stati scelti anche due nuovi geni candidati, SLC22A1 e SLCO3A1, poiché codificano per i trasportatori di membrana coinvolti nell'influsso di NRTI, come lamivudina e zidovudina. Sono stati quindi scelti gli SNPs *missense*, 3'-UTR e variazioni sinonime nel *coding*, dal momento che possono influenzare l'uso corretto del codone, la velocità di traduzione e la stabilità della struttura secondaria dell'mRNA. Sono stati inclusi, inoltre, gli alleli con precedenti associazioni con fallimento della prima linea HAART. Tutti gli SNPs hanno una frequenza dell'allele minore (MAF) superiore al 5% (HapMap Consortium CEPH e YRI). Seguendo questi criteri, sono stati selezionati sette SNPs: rs3842 (4036A>G; 3'-UTR) e rs1045642 (3435C>T, Ile1145Ile) in ABCB1, rs212091 (198217T>C; 3'-UTR) e rs3743527 (197248C>T, 3'-UTR) in ABCC1, rs3745274 (516G>T, Gln172His) in CYP2B6, rs628031 (1222A>G, Met408Val) in SLC22A1 e rs1517618 (882G>C, Glu294Asp) in SLCO3A1. Tutti gli SNPs sono stati genotipizzati utilizzando i saggi TaqMan SNPs Genotyping su piattaforma di real-time PCR ABI 7500, seguendo le istruzioni del produttore (Life Technologies, Carlsbad, CA). Le frequenze degli SNPs e l'equilibrio di Hardy-Weinberg sono stati valutati mediante conteggio diretto e test chi quadrato. Il test esatto di Fisher, il test per il trend di Cochran-Armitage e il test t di Welch sono stati utilizzati per analizzare l'associazione al fallimento virologico. Le variabili, la cui analisi singola ha raggiunto un p-value minore o uguale a 0,20 dopo il confronto multiplo e correzione con il metodo di Holm, sono state incluse nell'analisi di regressione logistica. Inoltre, sono state incluse le variabili con un'importanza clinica, anche se il loro p-value era superiore a 0.20 nelle analisi a singolo fattore. La soglia di significatività statistica per le variabili incluse nel modello finale è stata scelta di 0,05 e la bontà di adattamento del modello finale è stata valutata mediante il test di Cessie-van Houwelingen e Copas-Hosmer.

Analisi univariata: dati clinici e demografici. Non sono state osservate differenze statisticamente significative nelle variabili cliniche e demografiche di base tra *non-responders* e *responders*.

Analisi univariata: SNPs. Tutte le frequenze genotipiche rispettano l'equilibrio di Hardy-Weinberg. Non sono state osservate differenze statisticamente significative per quanto riguarda le frequenze alleliche e genotipiche degli SNPs rs3842 (ABCB1), rs3743527 (ABCC1), rs3745274 (CYP2B6), rs628031 (SLC22A1), rs1517618 (SLCO3A1) tra *non-responders* e *responders*, anche dopo stratificazione per farmaco del regime di prima linea. Tuttavia, un *trend* di associazione è stato osservato tra l'allele T del SNP

rs1045642 (ABCB1) e il fallimento virologico nei pazienti trattati con regimi farmacologici PI (OR 2.42, 95%, CI=0,99-6,02, senza correzione $p=0,05$, corretto $p=0,20$). L'allele C del polimorfismo ABCC1 rs212091 risulta associato al fallimento virologico nei pazienti trattati con regimi contenenti PI, essendo più frequente nei *non-responders* rispetto ai *responders* (28,6% vs 8,2%, rispettivamente; OR 4,4, 95%, CI=1,39-13,53; corretto $p=0,04$). I genotipi T/C e C/C sono più frequenti nei *non-responders* rispetto ai *responders* (28,6% e 14,3% vs 13,7% e 1,4%, rispettivamente, corretto $p=0,08$). Gli alleli minori di ABCB1 e ABCC1 presentano un effetto dominante, supportato dal test per il trend di Cochran-Armitage (per i genotipi rs1045642: test statistico=2,01, $p=0,04$; per i genotipi rs212091: test statistico=2,40; $p=0,02$). Così, solo gli SNPs rs1045642 e rs212091 sono stati inclusi nell'analisi di regressione logistica in accordo con il modello di rischio genetico dominante. **Analisi di regressione logistica.** I risultati delle analisi di regressione logistica hanno mostrato un'associazione tra i polimorfismi rs1045642 (ABCB1) e rs212091 (ABCC1) con il fallimento virologico. Secondo i modelli statistici qui utilizzati, la presenza dei genotipi C/T o T/T del SNP rs1045642 (ABCB1) è stata associata ad un rischio cinque volte maggiore di fallimento virologico nel regime terapeutico contenente PI, anche se è solo una tendenza (OR 5.01; 95%, CI=1,04-24,23; $p=0,045$). Per quanto riguarda il polimorfismo rs212091 (ABCC1), sia i genotipi T/C che C/C, sono risultati significativamente associati ad un aumento del rischio di fallimento virologico, più di sei volte, quando si considera un regime contenente PI (OR 6,50, 95%, CI=1.33; $p=0,02$). Quando si considerano i fattori clinici per un tipico soggetto del campione qui in esame (30 anni, afro-discendente, femmina di 70 kg di peso), il log-odds previsto dal modello è di -2,1067, quando non sono presenti genotipi di rischio per entrambi i geni. Pertanto, la probabilità di fallimento terapeutico di questa persona è $[\exp(-2,1067)=0,1216]$ che indica una riduzione del rischio di fallimento di circa 88%. Se la stessa persona presenta un genotipo di rischio per entrambi i geni, gli stessi calcoli produrrebbero una probabilità di 3,96, ovvero di un fallimento virologico di circa quattro volte maggiore. Quando vi è un genotipo di rischio solo per ABCB1, il rischio di fallimento è pari a circa 21% mentre, in presenza di un genotipo di rischio solo per ABCC1, è del 39%.

Questi risultati suggeriscono che la presenza dei genotipi di rischio di ABCB1 (rs1045642, allele A) e ABCC1 (rs212091, allele T), insieme o separatamente, risulta associata ad una minor probabilità di soppressione virologica. È possibile che questi polimorfismi influenzino l'attività o l'espressione della proteina, contribuendo anche ad un maggiore efflusso dei PIs, con conseguente concentrazione sub-ottimale dei farmaci nelle cellule bersaglio, riducendo così l'efficacia del trattamento (cioè, l'incapacità di sopprimere la replicazione virale). Un limite di questo studio è che non sono disponibili i dati riguardanti la farmaco resistenza primaria di HIV-1. Il disegno di questo studio è di fatto retrospettivo e le linee guida nazionali brasiliane per la salute non consigliano la genotipizzazione pretrattamento, dal momento che la resistenza primaria di HIV-1 ai farmaci non ha un'alta prevalenza nella popolazione brasiliana. Così gli autori, considerando questa coorte retrospettiva di 187 soggetti, stimano che all'incirca sette persone ($187 \times 3,6\% \sim 7$) avrebbero potuto essere infettate con ceppi resistenti ai farmaci.

Gli autori suggeriscono che i polimorfismi in geni coinvolti nei *pathway* farmacocinetici sono associati al fallimento virologico delle terapie farmacologiche anti-HIV contenenti PI, quando corretti per i fattori clinici quali l'età, massa corporea, razza e sesso.

Parole chiave: HIV-1, AIDS, HAART, NNRTI, NRTI, SNPs

Riferimento bibliografico

Coelho AV et al. *J Clin Pharmacol* 2013, 53(12):1286-93.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=23996099>

LA VARIANTE DEL GENE PER L'ENZIMA SEMIALDEIDE SUCCINICO DEIDROGENASI, ALDH5A1, PUO' INFLUENZARE LA RISPOSTA AL TRATTAMENTO CON METADONE NEI PAZIENTI AFFETTI DA DIPENDENZA DA OPIACEI

A cura della Dr.ssa Donatella Carretta

Il metadone è il farmaco più utilizzato per la terapia della dipendenza da oppiacei; tuttavia, il 30-80% dei pazienti in trattamento con metadone va incontro a recidive o abbandona la terapia. Recentemente la

variabilità della risposta terapeutica al metadone è stata messa in relazione a differenze genetiche degli enzimi coinvolti nella farmacocinetica del metadone o nei target terapeutici, quali i recettori per la dopamina. L'enzima semialdeide succinico deidrogenasi (ALDH5A1) trasforma la semialdeide succinica ad acido succinico. La semialdeide succinica è il metabolita dell'acido gamma aminobutirrico (GABA) ed è il precursore e il metabolita dell'acido gamma idrossi butirrico (GHB). Nell'uomo, il deficit di ALDH5A1 porta ad un aumento di GHB e GABA che causa un'encefalopatia non progressiva, disabilità cognitiva, problemi comportamentali, psicosi e disfunzioni motorie. L'attività dell'ALDH5A1 ha una significativa variabilità genetica che determina differenze di attività di circa 5 volte tra gli estremi. Il GHB agisce a basse concentrazioni su specifici recettori per il GHB e ad alte concentrazioni sui recettori GABA-B. A basse dosi i GHB inibisce la sintesi ed il rilascio presinaptico di dopamina (DA), mentre ad alte dosi ne promuove il rilascio. E' stato osservato che il GHB è in grado di sopprimere i sintomi di astinenza da oppiacei probabilmente attraverso una disinibizione della DA ed un aumento dell'attività dopaminergica nel circuito mesocorticolimbico del sistema di rewarding. Sulla base di questo uso potenziale del GHB nella sindrome astinenziale da oppiacei e vista l'alta variabilità interindividuale dei livelli di ALDH5A1 che a sua volta determina alterazione dei livelli di GHB e GABA, gli autori del presente studio ipotizzano che una variazione del gene *ALDH5A1* possa influenzare la risposta alla terapia con metadone.

Nel presente studio sono stati reclutati 169 pazienti dipendenti da oppiacei; i criteri di inclusione prevedevano etnia caucasica, trattamento con metadone da almeno 6 mesi e una dose stabile di metadone da almeno 2 mesi. I disturbi correlati all'uso di sostanze e altri disturbi psichiatrici sono stati diagnosticati con i criteri del DSM-IV, usando la scala Psychiatric Research Interview for Substance and Mental Disorders (PRISM-IV) per l'asse I e II (disturbi di personalità borderline e antisociale). Il grado di compromissione correlata alla dipendenza è stato valutato usando l'Addiction Severity Index. Le analisi delle urine per la rilevazione di eroina sono state effettuate random ogni 1 o 2 settimane; in base ai risultati, i pazienti sono stati classificati Responders o Nonresponders, i Responders erano coloro che risultavano negativi agli ultimi 4 test. I pazienti sono stati genotipizzati per un polimorfismo a singolo nucleotide (SNP) nell'esone 3 del gene *ALDH5A1*, c.538C>T, che causa la sostituzione di un aminoacido e che risulta in una riduzione dell'attività dell'enzima dell'83%. La variante allelica T ha una frequenza nella popolazione europea del 30%. Lo SNP è stato genotipizzato usando SNPLex platform (Applied Biosystem).

Dei 169 pazienti iniziali, 37 sono stati esclusi dallo studio; 89 erano Responders al metadone e 43 Nonresponders. Il dosaggio medio del metadone era significativamente più alto nei Responders, così come il numero di mesi di trattamento. I soggetti con la variante allelica T sono risultati avere un rischio significativamente più elevato di essere Nonresponders (OR=3.16; 95% CI [1.48-6.73], p=0.0024). Il dosaggio di metadone e la durata di trattamento non erano invece associati allo SNP. Il GHB oltre ad avere un effetto sulla DA aumenta anche il turnover della serotonina in molte aree cerebrali, inibisce il rilascio di noradrenalina nell'ipotalamo e aumenta il rilascio degli oppioidi endogeni. Gli effetti del GHB nell'astinenza da oppiacei sono correlati all'inibizione del burst firing dei neuroni noradrenergici del locus coeruleus, che è aumentato durante l'astinenza da oppiacei.

In questo studio è stato riportato che i pazienti portatori dell'allele T di una variante funzionale dell'ALDH5A1 (che è associato ad una ridotta attività dell'enzima che a sua volta determina un aumento dei livelli endogeni di GHB e GABA) hanno un rischio maggiore di essere Nonresponders al metadone. Una spiegazione di questi risultati apparentemente contraddittori risiede nel fatto che l'aumento del GHB e del GABA può indurre disturbi neuropsichiatrici simili a quelli osservati nel deficit ereditario dell'enzima, quali iperattività, inattenzione, sonnolenza e ansia. Inoltre, basse dosi di GHB possono indurre un pattern di effetti misto, stimolante e sedativo. Pertanto, è possibile che i pazienti con elevati livelli di GHB e GABA sperimentino in misura maggiore gli effetti negativi, quali sedazione e compromissione delle performance motorie, fenomeno che spiegherebbe la riluttanza di tali pazienti ad aumentare le dosi di metadone ed una maggiore probabilità di recidive. La limitazione del presente studio risiede nel piccolo campione di soggetti esaminato; lo studio dovrebbe pertanto essere replicato in una popolazione più numerosa.

In conclusione, i risultati di questo studio suggeriscono che la variante allelica T del gene *ALDH5A1* sia correlata ad un maggiore rischio di non-responsività alla terapia con metadone in pazienti con dipendenza da oppiacei.

Parole chiave: ALDH5A1, metadone, dipendenza da oppiacei, acido gamma aminobutirrico (GABA), acido gamma idrossi butirrico (GHB)

Riferimento bibliografico

Fonseca F et al. *Eur Neuropsychopharmacol* 2013 Oct 18 [Epub ahead of print]

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=24230997>

POLIMORFISMI GENETICI DI SLC28A3, SLC29A1 E RRM1 PREDICONO L'OUTCOME IN PAZIENTI CON CANCRO AL SENO METASTATICO IN TRATTAMENTO CHEMIOTERAPICO GEMCITABINA PIÙ PACLITAXEL

A cura della Dott.ssa Gloria Ravegnini

Recentemente sono stati pubblicati i risultati di un trial multicentrico di fase III, durante il quale sono stati comparati pazienti trattati con chemioterapia di mantenimento paclitaxel + gemcitabina (PG) con un gruppo di controllo (Park YH et al. *J Clin Oncol*. 2013, 31:1732-9). Da questo studio è emerso che la chemioterapia PG è efficace come terapia di mantenimento in pazienti con cancro al seno metastatico. Da sempre, le differenze inter-individuali e inter-popolazione nella risposta ai trattamenti farmacologici sono uno delle problematiche meglio note e più serie in chemioterapia. Numerosi sono stati gli studi di associazione con polimorfismi di geni coinvolti nei pathways farmaco-biologici di gemcitabina e paclitaxel. Tuttavia, fino ad oggi, non sempre l'uso del genotyping ha prodotto risultati consistenti nel predire la risposta ad agenti chemioterapici e la sopravvivenza. Considerando le suddette premesse, lo scopo di questo studio è stato quello di investigare estensivamente polimorfismi genetici associati con il metabolismo di gemcitabina e paclitaxel in una coorte prospettica di pazienti arruolati in un trial clinico di fase III in chemioterapia PG.

L'analisi ha coinvolto un totale di 324 pazienti affetti da cancro al seno metastatico, tutti di origine coreana. Di questi, 85 sono stati genotipizzati per 26 polimorfismi a singolo nucleotide in 15 geni coinvolti nel pathway della gemcitabina e dei taxani (ABCB1 rs2032528, rs1045642, rs1128503, CDA rs1048977, rs2072671, rs60369023, rs818194, CMPK1 rs11211524, rs4492666, CYP1B1 rs1056836, CYP2C8 475delA, CYP3A4 rs28371759, CYP3A5 rs776746, DAPK1 rs11141915, DCK rs12648166, rs4694362, IL17F rs763780, PDE4B rs12046844, RRM1 rs1042927, rs11030918, rs9937, rs720106, SLC28A1 rs2242046, SLC29A1 rs747199, rs760370, SLC28A3 rs7867504). Il gruppo di pazienti aveva un'età media di 49 anni (range 29-76); 63 soggetti (42%) mostravano un unico sito metastatico, e 22 (26%) avevano 3 o più organi metastatici. In 49 pazienti il fegato (58%) era l'organo più colpito ed in 51 (60%) sono state ritrovate metastasi viscerali.

Le frequenze alleliche e le distribuzioni genotipiche degli SNP analizzati, sono risultate in accordo con quelle delle popolazioni asiatiche come quella giapponese o cinese; i dati ottenuti sono stati analizzati per l'associazione con PFS (progression free survival) ed OS (overall survival). In un'analisi univariata, il gene SLC28A3 è risultato associato con OS; in particolare i genotipi rs7867504 CC e CT erano associati con un'OS maggiore se comparati con TT ($p=0.027$, HR 2.646, 95% CI: 1.12-6.28). L'analisi degli aplotipi per valutare l'effetto combinato degli SNPs, ha evidenziato che l'aplotipo GA, tra i quattro aplotipi di SLC29A1 (tra rs747199 e rs760370), mostrava un'OS significativamente inferiore ($p=0.030$, HR 3.391, 95% CI: 1.13-10.19). Inoltre l'OS è risultata significativamente più lunga nei pazienti con CYP3A4*18 (rs28372759) rispetto a quelli con CYP3A4*1 (OS media: 37 mesi vs 19 mesi, $p=0.021$, HR 5.8, 95% CI: 1.3-25.7). per quanto riguarda la comparsa di neurotossicità durante il trattamento, i pazienti con RRM1 rs9937 AA avevano una più alta incidenza di svilupparla rispetto a quelli con genotipo AG e GG (64.1% per AA, 35.7% per AG e 38.9% per GG; $p=0.014$, odds ratio=0.328, 95% CI: 0.135-0.797); l'analisi degli aplotipi per RRM1 ha evidenziato che gli aplotipi ATAA e ATGA avevano un'incidenza di neurotossicità statisticamente significativa ($p=0.018$ per ATAA, $p=0.014$ per ATGA). Nell'analisi multivariata di Cox, nessuno dei polimorfismi analizzati è risultato essere un fattore di rischio indipendente. Tra i parametri clinici, la giovane età ($p=0.047$, HR 1.03, 95% CI: 1-1.07), lo stato recettoriale ormone positivo ($p=0.0004$, HR 0.26, 95% CI: 0.12-0.54) e le metastasi epatiche ($p=0.046$, HR 2.30, 95% CI: 1.02-5.18) sono stati identificati come fattori predittivi per OS.

In conclusione, questo è il primo studio ad aver estensivamente analizzato l'associazione di SNPs con chemioterapia gemcitabina più paclitaxel in una coorte di pazienti affetti da cancro al seno metastatico, randomizzati in uno studio prospettico. I dati hanno messo in evidenza che i geni SLC sono potenziali markers farmacogenetici per la chemioterapia PG. La relazione tra RRM1 e neurotossicità necessita di essere confermata in ulteriori studi

Parole chiave: cancro al seno metastatico, chemioterapia gemcitabina + paclitaxel, SLC28A3, SLC29A1

Riferimento Bibliografico

Lee SY et al. *Eur J Cancer* 2013 Dec 18 [Epub ahead of print].

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=24361227>

INFLUENZA DEI POLIMORFISMI DEL GENE DELLA VITAMINA D (CYP27B AND VDR) SULLA RISPOSTA ALLA TERAPIA CON INTERFERONE/RIBAVIRINA NELL'EPATITE C CRONICA

A cura della Dott.ssa Giusy Russomanno

Il tasso di successo della terapia per l'epatite C cronica (CHC), che combina interferone pegilato (Peg-IFN) e ribavirina (RBV), è connesso a diversi fattori predittivi che possono essere utilizzati come markers di risposta. Alcuni di questi sono relativi al virus dell'epatite C (HCV), ossia genotipo virale, cambiamenti nelle regioni critiche del genoma virale e carica virale. Altri fattori, invece, sono relativi al paziente, e sono sia genetici (polimorfismi di *IL28B*, sesso e razza) che acquisiti (insulino-resistenza, obesità, steatosi epatica, sovraccarico di ferro e stadio della fibrosi epatica). Combinando tutti questi fattori è possibile calcolare la probabilità di raggiungere una risposta virologica sostenuta (SVR, definita come non detectabilità di RNA di HCV nel siero del paziente dopo 6 mesi dalla fine della terapia). L'introduzione di nuovi farmaci anti-HCV sta cambiando l'approccio terapeutico della CHC, ma attualmente un numero ancora significativo di pazienti viene trattato con l'approccio classico a due farmaci. L'individuazione di nuovi biomarcatori predittivi di risposta clinica all'associazione Peg-IFN+RBV potrebbe rivelarsi utile nella scelta della terapia più appropriata per il singolo paziente.

Il calcitriolo - $1,25(\text{OH})_2$ Vitamina D - è un componente del sistema ormonale deputato al mantenimento dell'omeostasi del calcio e del fosforo. Esso esercita, inoltre, effetti immunomodulatori, in quanto riduce i livelli di citochine pro-infiammatorie e promuove la risposta immunitaria innata. La carenza di vitamina D è molto frequente in pazienti con CHC ed è stata correlata a riduzione del tasso di successo della terapia combinata Peg-IFN+RBV, anche se due recenti studi (*Kitson MT et al. J Hepatol* 2013; 58: 467-472; *Bitetto D et al. Hepatology* 2013; 57: 925-933) hanno contestato l'esistenza di tale relazione. La sintesi del calcitriolo viene catalizzata da diversi enzimi coinvolti nella doppia idrossilazione del calciferolo. Il citocromo P-450 CYP27B1 sintetizza calcitriolo principalmente nel rene. La vitamina D attiva, per esercitare le sue funzioni fisiologiche, deve interagire con il suo specifico recettore transmembrana (VDR). Polimorfismi dei geni CYP27B1 e VDR potrebbero influenzare l'efficacia della terapia antivirale, come è stato recentemente suggerito da due gruppi di ricerca indipendenti (*Baur K et al. Antiviral Ther* 2012; 17: 541-547; *Lange CM et al. J Hepatol* 2011; 54: 887-893; *Lange CM et al. PloS ONE* 2012; 7: e40159). In un precedente studio, gli autori avevano dimostrato che la carenza di vitamina D è molto frequente nei pazienti spagnoli con CHC (*Ladero JM et al. Ann Hepatol* 2013; 12: 199-204), tuttavia non vi erano differenze significative rispetto alla popolazione generale spagnola (*González-Molero I et al. Eur J Clin Nutr* 2011; 65: 321-328).

Nel presente studio gli autori si propongono di valutare l'influenza dei polimorfismi dei geni vitamina D correlati sulla risposta alla terapia antivirale in pazienti con epatite C cronica (CHC).

Sono stati reclutati, a partire da giugno 2003, presso l'ambulatorio del Dipartimento di Gastroenterologia, San Carlos University Hospital, Madrid (Spagna), 238 pazienti caucasici (221 spagnoli) con CHC selezionati a ricevere doppia terapia combinata con interferone pegilato e ribavirina, in accordo con le attuali linee guida. Sono stati arruolati solo i pazienti che avevano portato a termine un ciclo completo di terapia o che avevano interrotto la terapia per fallimento terapeutico. Sono stati esclusi pazienti che avevano interrotto il

trattamento per intolleranza al farmaco, co-infettati con HIV o HBV o con carcinoma epatocellulare. I prelievi ematici per le analisi biochimiche, virologiche e genetiche sono stati effettuati nel corso del mese precedente l'inizio della terapia.

Nella coorte di pazienti sono stati analizzati i polimorfismi nel promotore del gene CYP27B-1260 (rs10877012AC) e del gene per il recettore della vitamina D (VDR) rs2228570TC, rs1544410CT, rs7975232AC e rs731236AT. La genotipizzazione è stata effettuata mediante l'uso di sonde TaqMan per i diversi SNPs. Il genotipo virale di HCV, classificato in 6 gruppi, è stato determinato per ibridazione inversa. Sulla base della risposta alla terapia, i pazienti sono stati suddivisi in due gruppi: pazienti "responder", nei quali si è avuta una risposta virologica sostenuta, e pazienti "non-responder", in cui si è osservata non risposta, risposta parziale o recidiva alla sospensione della terapia.

Tre dei quattro SNPs del gene VDR (rs1544410, rs7975232 e rs731236) erano in forte linkage disequilibrium; per tale ragione, i pazienti sono stati classificati in "non carriers" o "carriers" della combinazione allelica rs1544410C - rs7975232C - rs731236A, considerato, secondo la letteratura, aplotipo a rischio. Il polimorfismo rs2228570TC, che non risultava in linkage disequilibrium, è stato incluso nell'analisi come variabile indipendente.

Nell'analisi univariata, le variabili significativamente correlate a fallimento terapeutico erano l'età avanzata, l'allele rs12979870T del gene *IL28B*, l'alta carica virale, il genotipo virale 1 o 4, alti livelli di GGT e bassi livelli sierici di colesterolo. Queste variabili sono state incluse nell'analisi multivariata insieme agli SNPs *CYP27B* e *VDR* e l'aplotipo a rischio, e per tutte è stata confermata la correlazione con il fallimento terapeutico ($p < 0,05$), tranne che per l'età avanzata. Inoltre, è stato confermato che l'aplotipo CCA (combinazione allelica rs1544410C - rs7975232C - rs731236A) è un fattore di rischio di mancata risposta terapeutica (Odds ratio = 2,743; IC 95% = 1,313-5,731; $p = 0,007$). Al contrario, nei portatori dell'allele T su rs2228570 del *VDR* si osservava maggiore probabilità di risposta virale sostenuta in seguito alla terapia (Odds ratio = 0,438; IC 95% = 0,204-0,882; $p = 0,021$).

La probabilità di fallimento terapeutico (P) è stata stimata con la formula: $P = 1 / [1 + e^{-(1,65 + 0,83 \times a + 1,01 \times b + 2,17 \times c + 1,84 \times d + 1,46 \times 7 + 0,01 \times f - 0,02 \times g)}]$, in cui i valori da sostituire erano: a) *VDR* rs10877012T, non carrier = 1; carrier = 0; b) aplotipo *VDR* rs1544410BsmIC/rs7975232ApaIC/rs731236TaqIA, non carrier = 0; carrier = 1; c) *IL28B* rs12979870T: non carrier = 0; carrier = 1; d) genotipo virale, 1 o 4 = 1; 2 o 3 = 0; e) carica virale, <400.000 IU/mL = 0; 400.000 IU/mL = 1; f) GGT (U/L); g) colesterolo sierico (mg/dL). Il modello proposto ha una sensibilità del 78,3% e una specificità del 79,2%.

Nel sottogruppo di analisi di 208 pazienti con infezione virale di genotipo 1, l'analisi multivariata ha confermato le stesse associazioni significative (portatori dell'allele T su rs2228570 del *VDR*, Odds ratio per SVR = 0,469; IC 95% = 0,223-0,990, $p = 0,042$; aplotipo CCA del *VDR*, Odds ratio per il fallimento della terapia = 2,179; IC 95% 1,000-4,762); $p = 0,044$).

Lo studio in esame rivela che il polimorfismo del gene *VDR* (rs2228570 T/C), valutato per la prima volta in pazienti con epatite C cronica, è un predittore di esito clinico per la terapia combinata Peg-IFN+RBV. Nei portatori dell'allele T sia in omo- che in eterozigosi si osservava un tasso di risposta virologica sostenuta superiore rispetto ai pazienti con genotipo CC rs2228570 ($p = 0,015$).

In conclusione, gli autori dimostrano che due siti polimorfici del gene *VDR* influenzano il tasso di risposta alla terapia con interferone-ribavirina nell'epatite cronica C. L'associazione di questi polimorfismi con la risposta al trattamento è indipendente da altri predittori di risposta ben noti (genotipo HCV e carica virale, genotipo *IL28B*, età, GGT e colesterolo sierico).

I polimorfismi del gene *VDR* sono indipendentemente correlati alla risposta alla terapia Peg-IFN+RBV nell'epatite C cronica e potrebbero essere utilizzati come biomarcatori complementari di risposta quando inseriti in un algoritmo che tiene conto anche delle caratteristiche demografiche, virologiche, biochimiche e genetiche del paziente.

Conflitto d'interesse: Gli autori dichiarano di non avere conflitti di interesse

Parole chiave: CYP27B, VDR, Vitamina D, epatite C cronica, interferone pegilato, ribavirina

Riferimento bibliografico

García-Martín E et al. *PLoS One* 2013 ;8(9):e74764. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=24073221>

L'ANALISI COMBINATA DEI POLIMORFISMI RS6051702/RS1127354 DEL GENE ITPA PREDICE L'INSORGENZA DI ANEMIA INDOTTA DA RIBAVIRINA IN PAZIENTI AFFETTI DA EPATITE C CRONICA

A cura della Dott.ssa Sarah Cargnin

L'infezione cronica da virus dell'epatite C (HCV) è uno dei principali fattori di rischio per l'insorgenza di cirrosi epatica e di carcinoma epatocellulare. L'attuale terapia standard dell'infezione cronica da HCV si basa sulla somministrazione in regime duale di interferone pegilato (PEG/IFN) e ribavirina (RBV). Nei pazienti affetti da HCV di genotipo 1 in terapia standard, il tasso di risposta sostenuta (negatività dell'HCV-RNA 24 settimane dopo la sospensione della terapia) è del 50% circa. L'effetto collaterale più frequente indotto dal trattamento cronico con PEG/IFN e RBV è l'insorgenza di anemia, principalmente attribuibile alla somministrazione di ribavirina. Il dosaggio di RBV nonché l'esposizione farmacocinetica allo stesso sono stati riconosciuti come i principali determinanti dell'insorgenza di anemia associata all'assunzione di RBV. Numerosi studi di associazione genome-wide (*Fellay et al, 2010; Suzuki et al, 2011; Thompson et al, 2010; Ochi et al, 2010*) hanno evidenziato l'effetto protettivo di tre varianti (rs1127354, rs7270101 ed rs6051702) del gene ITPA, codificante per l'enzima inosina trifosfato pirofosfatasi, sull'insorgenza di anemia indotta da RBV in pazienti affetti da HCV di genotipo 1. La variante rs1127354, localizzata nell'esone 2, e la variante di splicing rs7270101 nell'introne 2, sono noti influenzare l'attività enzimatica di ITPA e conseguentemente la farmacocinetica di RBV, mentre non è stato ancora chiarito come la variante non funzionale rs6051702, localizzata in una regione non codificante del cromosoma 20 adiacente al gene ITPA, possa modificare l'attività enzimatica. Obiettivo dello studio è quello di confermare il ruolo delle tre varianti del gene ITPA (rs1127354, rs7270101 ed rs6051702), analizzate singolarmente od in combinazione tra loro, nel predire l'insorgenza di anemia indotta da RBV in pazienti affetti da HCV dopo 4 settimane di trattamento con PEG/IFN e RBV.

Questo studio retrospettivo è stato condotto su una coorte di 379 pazienti affetti da infezione cronica da HCV, reclutati tra marzo 2005 e novembre 2012 in due Ospedali Universitari della città di Torino ("Amedeo di Savoia" e "San Giovanni Battista"). Il trattamento terapeutico prevedeva l'assunzione di PEG/IFN-2b (1.5 ug una volta a settimana per iniezione sub cutanea) ovvero PEG/IFN-2a (180 ug una volta a settimana per iniezione sub cutanea) in associazione a RBV (600-1400 mg ab/die per os). *Criteri di inclusione:* età superiore ai 18 anni; aderenza alla terapia *self-reported* >95%; assenza di modificazioni del dosaggio di RBV e/o PEG/IFN entro la quarta settimana di trattamento; assenza di trattamento con fattori di crescita entro la quarta settimana dall'inizio della terapia. *Criteri di esclusione:* pazienti affetti da altre patologie epatiche, epatite A e B, infezione da HIV, scompenso epatico, carcinoma epatocellulare, depressione severa o altri disturbi psichiatrici, patologie cardiache e renali, gravidanza. I pazienti sono stati classificati sulla base di due cut-off clinici: a) concentrazione di emoglobina (Hb) < 10 g/dL; b) riduzione di Hb > 3g/dL alla settimana 4. Il grado di anemia è stato definito in accordo ai criteri di tossicità WHO (World Health Organization toxicity criteria) come segue: grado 0 (>11 g/dL); grado 1 (<11-9.5 g/dL), grado 2 (<9.5-8 g/dL), grado 3 (<8-6.5 g/dL), grado 4 (<6.5 g/dL). La genotipizzazione dei pazienti per le varianti rs1127354, rs7270101 ed rs6051702 è avvenuta tramite Real Time PCR.

Dei 379 pazienti inclusi nell'analisi (231 di sesso maschile, età media 46 anni), 233 (61.5%) sono in trattamento con PEG/IFN-2a mentre i restanti 146 (38.5%) sono in terapia con PEG/IFN-2b. La dose media di RBV è di 13.88 mg/kg. La riduzione media di Hb è di -2.3 g/dL alla quarta settimana di trattamento. Il 34% dei pazienti (N=129) presenta anemia dopo un mese di terapia (riduzione di Hb > 3 g/dL o Hb<10 g/dL). Le frequenze delle varianti alleliche per gli SNPs rs1127354 C/A, rs7270101A/C ed rs6051702 A/C sono rispettivamente di 5.5%, 10.0% e 14.5%. Gli SNPs analizzati sono in equilibrio di Hardy-Weinberg e risultano in basso linkage disequilibrium tra loro ($D' = 0.65$ per rs6051702/rs7270101; $D' = 0.53$ per rs6051702/rs1127354). Le due varianti funzionali (rs1127354, rs7270101) di ITPA e la variante non funzionale (rs6051702) sono associate alla riduzione dei livelli di Hb dopo un mese di trattamento. I pazienti con genotipo rs1127354CC (N=377) presentano una maggior riduzione dei livelli di Hb (-2.4 g/dL, scarto interquartile (IQR): da -3.5 a -1.5) rispetto ai pazienti con genotipo CA/AA (-0.9 g/dL, IQR: da -1.6 a -0.2, $P = 1.28 \times 10^{-11}$). Analogamente, i pazienti con genotipo rs7270101AA (N=309) hanno un decremento di

emoglobina maggiore (-2.4 g/dL, IQR: da -3.6 a -1.3) rispetto ai pazienti con genotipo AC/CC (-1.7 g/dL, IQR: da -2.5 a -0.9, $P = 0.001$). I pazienti con genotipo rs6051702AA (N=282) presentano una maggiore riduzione dei livelli di Hb (-2.5 g/dL, IQR: da -3.6 a -1.6) rispetto ai pazienti con genotipo AC/CC (-1.4 g/dL, IQR: da -2.3 a -0.7, $P = 2.35 \times 10^{-10}$). Dall'analisi logistica multivariata emerge che i livelli basali di emoglobina (OR: 1.51; $p=1.21 \times 10^{-4}$) e la combinazione dei polimorfismi rs6051702/rs1127354 ($P = 1.75 \times 10^{-5}$), ma non di rs1127354/rs7270101 oppure rs1127354/ rs7270101, risultano gli unici fattori predittivi del rischio di insorgenza di anemia farmaco-indotta. Infine, il *likelihood ratio* positivo e negativo (LR+ e LR-) tra la presenza di almeno una variante allelica protettiva degli SNPs rs6051702/rs1127354 e l'assenza di anemia è, rispettivamente di 1.44 e 0.30, con l'88.4% di sensibilità ed il 38.8% di specificità.

L'insorgenza di anemia emolitica come effetto collaterale del trattamento antivirale standard è dovuta, primariamente, all'emolisi indotta da RBV e, secondariamente, alla tossicità midollare associata alla somministrazione di IFN. Il meccanismo tramite il quale RBV induca anemia è tuttora scarsamente compreso. L'emolisi farmaco-indotta sembra essere dovuta ad un accumulo negli eritrociti delle forme attive di RBV, tra cui la ribavirina trifosfato (RBV-RT), un composto dotato di attività litica. Dalla letteratura emerge come gli alleli minori delle varianti funzionali rs1127354 e rs7270101 del gene ITPA riducano l'attività dell'enzima ITPA, provocando un consistente accumulo di ITP negli eritrociti. E' quindi plausibile che ITP competa con RBV-TP a livello dei processi cellulari risultanti nella lisi eritrocitaria e che quindi svolga un'azione protettiva nei riguardi degli effetti litici associati a RBV-TP. Inoltre, è possibile che l'attività enzimatica di ITPA e/o i livelli stessi di ITP possano influenzare, direttamente od indirettamente, la farmacocinetica di RBV (Fellay et al 2010). E' rilevante sottolineare l'entità dell'impatto dell'insorgenza di anemia sull'esito della terapia antivirale: infatti, una riduzione del dosaggio di RBV od una precoce interruzione della terapia risultano spesso in un trattamento terapeutico subottimale ed in un maggior rischio di fallimento terapeutico. I risultati di questo studio mostrano che l'analisi combinata della variante non funzionale rs6051702 e di quella funzionale rs1127354 è l'unica combinazione in grado di predire il rischio di anemia indotta da ribavirina. Sono tuttavia necessari ulteriori studi finalizzati a confermare la correlazione tra anemia, polimorfismi di ITPA e farmacocinetica della ribavirina.

Le varianti genetiche rs1127354, rs7270101 ed rs6051702 nel gene ITPA sono significativamente associate all'insorgenza di anemia emolitica farmaco-indotta in pazienti affetti da HCV dopo quattro settimane di trattamento con PEG/IFN e RBV. Unicamente la combinazione delle varianti rs6051702/ rs1127354 predice l'insorgenza di tossicità ematica conseguente al trattamento antivirale.

Parole chiave: PEG/IFN, RBV, anemia emolitica, ITPA

Riferimento bibliografico

D'Avolio A et al. *Antiviral Res* 2013, 100(1):114-9.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=23933495>

POLIMORFISMI DEI GENI CYP3A4, PPAR- E ARNT E RISPOSTA AL CLOPIDOGREL

A cura della Dott.ssa Lucia Gozzo

Il clopidogrel è un antiaggregante che subisce una bioattivazione in un processo bifasico regolato da diverse isoforme del citocromo P450 (CYP2C19, CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4, CYP3A5 e CYP2B6). L'inattivazione dei precursori e dei metaboliti dipende per lo più dall'enzima epatico carbossilesterasi-1. La ridotta attività del CYP2C19, a causa di interazioni farmacologiche o della presenza di varianti, risulta in una ridotta formazione di metaboliti attivi ed in una più elevata reattività piastrinica durante la terapia. Ad ogni modo, l'attività del CYP2C19 da sola rende conto del 12% della variabilità di risposta al clopidogrel. Diversi studi indicano che anche il CYP3A4 ed il CYP3A5 potrebbero avere un ruolo nell'attivazione del clopidogrel. È stata documentata una grande variabilità nell'attività del CYP3A4, ma le basi genetiche di questa variabilità sono poco note. Il polimorfismo CYP3A5*3 non è stato associato significativamente alle variazioni farmacocinetiche del clopidogrel. Recentemente Klein et al. hanno identificato polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) associati con l'attività del CYP3A4, tra cui la variante intronica CYP3A4*22

caratterizzata da una sostituzione C>T e ridotta espressione dell'mRNA con conseguente ridotta attività enzimatica. Altre varianti identificate sono localizzate a livello dei geni *peroxisome proliferator-activated receptor-* (*PPAR-*) e *Ah-receptor nuclear translocator* (*ARNT*). L'idrossilazione dell'atorvastatina, espressa in vivo dal rapporto tra 2-OH-atorvastatina ed atorvastatina, è risultata ridotta del 35% nei portatori dell'allele *CYP3A4*22*. Alcuni studi hanno dimostrato, inoltre, un contributo dell'inibizione di questo isoenzima, da parte di statine o Ca^{2+} antagonisti, nella variabilità della risposta al clopidogrel. Pertanto, le varianti descritte da Klein et al. potrebbero essere associate anche con una alterata risposta al clopidogrel, per ridotta formazione di metaboliti attivi.

In questo studio è stata valutata l'ipotesi che la reattività piastrinica indotta dall'adenosina difosfato (ADP), una misura farmacodinamica della risposta al clopidogrel, sia aumentata nei portatori del *CYP3A4*22* e delle varianti *PPAR-* e *ARNT*, che in studi precedenti sono stati associati ad una ridotta attività del *CYP3A4*.

Il protocollo di studio è stato approvato dall'*Indiana University Institutional Review Board for research*. Sono stati considerati eleggibili i pazienti con malattia coronarica sottoposti a doppia antiaggregazione a base di clopidogrel ed aspirina (81-325 mg/die). La terapia con clopidogrel (75 mg) doveva essere stata iniziata almeno 5 giorni prima dell'arruolamento o doveva essere stata somministrata una dose da carico di 600 mg durante un intervento coronarico percutaneo (PCI) almeno 6 ore prima del prelievo ematico per lo studio. Sono stati esclusi i pazienti con conta piastrinica inferiore a $100.000/\text{mm}^3$, in terapia con warfarin o in caso di utilizzo di un antagonista della glicoproteina IIb/IIIa durante PCI.

Sono stati arruolati 106 pazienti in terapia di mantenimento con clopidogrel da più di 5 giorni e 105 che avevano ricevuto una dose da carico del farmaco. Il 72% dei soggetti arruolati era di origine caucasica, il 27% afro-americani e l'1% asiatici. I campioni dei 211 pazienti sono stati utilizzati per l'analisi del genotipo, da cui è emerso che il 4% dei pazienti afro-americani (n=12) era portatore dell'allele *CYP3A4*22*. È stata riscontrata durante la terapia con clopidogrel un'ampia variabilità interindividuale nell'aggregazione piastrinica indotta dall'ADP. Solo 2 dei 211 pazienti sono risultati *non-responder* all'aspirina, in quanto presentavano una percentuale >20% di aggregazione stimolata da acido arachidonico (AA). Non è stata riscontrata differenza nell'aggregazione piastrinica tra i soggetti in terapia di mantenimento con clopidogrel ed i pazienti che avevano ricevuto una dose da carico (ADP 5 μM : $31\pm 14\%$ versus $34\pm 18\%$; $P=0.33$), e neppure tra i soggetti di origine caucasica e gli afro-americani (ADP 10 μM : $40\pm 16\%$ vs $39\pm 19\%$; $P=0.8$). I portatori dell'allele *CYP2C19*2* presentavano un livello di aggregazione piastrinica superiore rispetto ai pazienti senza questo allele (ADP 5 μM : $36\pm 15\%$ vs $31\pm 15\%$; $P=0.09$; ADP 10 μM : $44\pm 16\%$ vs $39\pm 17\%$; $P=0.034$; ADP 20 μM : $50\pm 16\%$ vs $44\pm 17\%$; $P=0.02$). I portatori delle varianti *CYP3A4*22* e *PPAR-* (rs4253728, rs4823613) hanno mostrato un livello di aggregazione minore rispetto ai *wild type*, mentre i portatori della variante *ARNT* hanno mostrato un livello di aggregazione superiore rispetto ai *wild type*, anche se in entrambi i casi la differenza non era significativa. Tra i portatori della variante *CYP3A4*22*, 4 su 12 erano anche eterozigoti per il *CYP2C19*2*, senza un effetto additivo sull'aggregazione indotta da ADP rispetto ai portatori del solo *CYP2C19*2* (ADP 10 μM : $33\pm 23\%$ vs $45\pm 15\%$; $P=0.16$). Escludendo i portatori della variante *CYP2C19*2* l'aggregazione nei portatori del *CYP3A4*22* rimaneva non significativa rispetto ai *wild type* (ADP 10 μM : $40\pm 17\%$ vs $39\pm 15\%$; $P=0.6$). Effettuando l'analisi di regressione lineare univariata, solo il genotipo *CYP2C19*2* (ADP 20 μM ; $P=0.025$), il fumo (ADP 10 μM ; $P=0.01$) ed il diabete mellito (ADP 10 μM ; $P=0.004$) sono stati associati significativamente con i livelli di aggregazione piastrinica indotta da ADP. L'uso di inibitori di pompa e Ca^{2+} antagonisti non è stato associato con variazioni nella reattività piastrinica (ADP 10 μM ; $P=0.38$ and $P=0.3$, rispettivamente). La presenza dei genotipi *CYP3A4*22*, *PPAR-* e *ARNT* non è stata associata con differenze significative nell'aggregazione ADP-indotta, né nell'analisi univariata né nella multivariata. Restringendo l'analisi per origine etnica non sono state trovate differenze tra i portatori dell'allele *CYP3A4*22* ed i *wild type* (soggetti di origine caucasica ADP 10 μM : $37\pm 20\%$ vs $40\pm 16\%$; $P=0.6$; soggetti afro-americani ADP 10 μM : $35\pm 6\%$ vs $40\pm 20\%$; $P=0.72$). Tra i soggetti caucasici, inoltre, non è stata riscontrata una differenza significativa tra i *wild type*, gli eterozigoti e gli omozigoti per il genotipo *PPAR-* (rs4253728 ADP 10 μM : $42\pm 15\%$ vs $37\pm 16\%$ vs $41\pm 19\%$; $P=0.16$; rs4823613 ADP 10 μM : $42\pm 15\%$ vs $38\pm 16\%$ vs $40\pm 19\%$; $P=0.24$) e per le varianti *ARNT* (ADP 10 μM : $40\pm 16\%$ vs $42\pm 18\%$ vs $40\pm 16\%$; $P=0.68$). Tra gli afro-americani non è stata riscontrata una differenza significativa tra i *wild type*, gli eterozigoti e gli omozigoti per il genotipo *PPAR-* (rs4253728 ADP 10 μM : $39\pm 19\%$ vs $39\pm 25\%$ vs 60% ; $P=0.6$; rs4823613 ADP 10 μM : $37\pm 17\%$ vs $39\pm 22\%$ vs $44\pm 14\%$; $P=0.67$) ma è stata riscontrata una differenza significativa tra i *wild type*, gli eterozigoti e gli omozigoti per le varianti

ARNT (ADP 10 μ M: 35% \pm 18% vs 51% \pm 18% vs 33% \pm 21%; P=0.014). Tuttavia, dopo aggiustamento per i fattori di confondimento (diabete mellito, fumo genotipo *CYP2C19**2) l'associazione è risultata non significativa (ADP 10 μ M: $X_1=6$; P=0.22).

In questo studio è stato misurato il livello di aggregazione piastrinica indotta da ADP per misurare la risposta al clopidogrel in caso di ridotta attività del CYP3A4, enzima che partecipa all'attivazione del farmaco. I dati ottenuti, tuttavia, escludono che l'allele *CYP3A4**22 possa essere associato con una ridotta risposta al clopidogrel. Inoltre nessuna delle varianti dei geni *PPAR*- e *ARNT* è stata associata con un aumento della reattività piastrinica in pazienti in terapia con clopidogrel. Possono essere diverse le ragioni della mancata associazione: prima di tutto è possibile che il CYP3A5 ed il CYP1A2 riescano a compensare la ridotta attività del CYP3A4 associata alla presenza di queste varianti; in secondo luogo non è stato stabilito se le varianti *PPAR*- e *ARNT*, che sono recettori nucleari ligando-dipendenti, possano essere associati con una diversa espressione di altri isoenzimi epatici, che possano bilanciare la ridotta formazione di metaboliti attivi del clopidogrel da parte del CYP3A4.

In conclusione, questo studio suggerisce che le varianti del *CYP3A4**22, *PPAR*- e *ARNT* non sono associate ad una alterata inibizione piastrinica in corso di terapia con clopidogrel. Tuttavia, a causa della bassa frequenza di queste varianti, sono necessari studi più ampi per supportare questi dati.

Limiti dello studio potrebbero essere rappresentati dalla piccola dimensione del campione e dalla mancanza di analisi farmacocinetiche per valutare differenze nelle concentrazioni dei metaboliti attivi.

Conflitto d'interesse: Yan Jin è attualmente dipendente della Eli Lilly and Co, Indianapolis, IN, USA. Non sono stati dichiarati conflitti di interesse dagli altri autori.

Parole chiave: malattia coronarica, clopidogrel, CYP3A4, *PPAR*- e *ARNT*

Riferimento bibliografico

Kreutz RP et al. *Clin Pharmacol* 2013, 5:185-92.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=24353446>

UNO STUDIO DI FARMACOGENETICA IN PAZIENTI CON MACULOPATIA SENILE IN TRATTAMENTO CON ANTI-VEGF

A cura della Dott.ssa Valeria Conti

La maculopatia essudativa associata all'invecchiamento [Exudative ("wet") Age related Macular Degeneration (AMD)] è una causa rilevante di perdita della visione negli over sessantacinque. Negli Stati Uniti si stima che nel 2020 questa patologia colpirà circa 2,95 milioni di persone. La terapia d'elezione consiste nell'inibizione del fattore di crescita vascolare endoteliale [Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA)] mediante iniezioni intraoculari di bevacizumab o ranibizumab. Questi farmaci sono efficaci ma è stata riscontrata una grande variabilità nella risposta alla terapia sia in termini d'intensità, che di durata.

Uno studio precedente aveva proposto un polimorfismo a singolo nucleotide (SNP) nel gene LOC387715 come marcatore predittivo della prognosi dell'AMD. Questo SNP era stato, infatti, correlato con la progressione dell'AMD da non-essudativa a essudativa. Inoltre, era stata dimostrata l'esistenza di un'associazione tra gli SNPs nei geni *CHF* e *VEGF*, oltre che nel gene LOC387715 e la risposta al trattamento con anti-VEGF. Prima di eseguire lo studio qui revisionato, gli stessi autori avevano identificato alcuni polimorfismi nel gene *VEGFA* in grado di predire efficacia e tossicità del bevacizumab in donne con cancro alla mammella in stadio avanzato. In questo studio, essi hanno cercato di determinare se le varianti genetiche potessero prevedere gli esiti clinici nell'AMD diagnosticata allo stesso tempo con tomografia ottica a coerenza di fase (Optical Coherence Tomography, OCT) e test di valutazione dell'acutezza visiva (Visual Acuity, VA) e servire a identificare un sottogruppo d'individui particolarmente responsivi tra pazienti in terapia con anti VEGF.

I pazienti sono stati identificati tra il 2001 e il 2010 attraverso revisione delle cartelle cliniche. I criteri d'inclusione erano: 1) la diagnosi effettuata mediante OCT e test VA, 2) almeno tre precedenti iniezioni intraoculari consecutive di bevacizumab o ranibizumab e 3) almeno sei mesi di follow-up successivi alla terza iniezione. I criteri di esclusione erano: 1) precedente vitrectomia, oppure altra terapia come il laser, o l'iniezione di steroidi, 2) precedente distacco dell'epitelio pigmentato, 3) fibrosi, o 4) emorragia vitreale.

Un consenso informato è stato ottenuto da ciascun paziente e lo studio è stato approvato dallo "Sterling Institutional Review Board" e dall'Università dell'Indiana. Per le analisi genetiche, sono stati prelevati campioni di saliva da cui è stato estratto il DNA. La tipizzazione degli SNPs candidati è stata fatta mediante TaqMan®-based real time-PCR. In particolare, saggi TaqMan predefiniti sono stati utilizzati per lo screening dei seguenti polimorfismi: LOC387715 A69S, VEGFA -3818G/T, -1498C/T, -2578C/A, -634C/G, -7C/T e 1154G/A; saggi TaqMan custom sono stati disegnati per la tipizzazione degli SNP: CFHY402H, VEGFA -2305G/T, and -1210C/A. Campioni tipizzati mediante sequenziamento sono stati utilizzati come controllo positivo.

Considerati i criteri d'inclusione e di esclusione, sono stati inclusi nello studio 101 pazienti. Gli outcome clinici sono stati valutati con scadenza mensile per 6 mesi dopo 3 mesi di iniezioni intraoculari di bevacizumab o ranibizumab. Gli individui sono stati divisi in "responders" e "non responders" sulla base dei risultati del test di acutezza visiva e della tomografia e la correlazione genotipo-fenotipo (responder versus non-responder) è stata valutata sulla base dei risultati forniti dalle due metodiche diagnostiche. I pazienti che erano responsivi in base ai risultati dell'OCT non lo erano necessariamente per il test VA e viceversa. Con riferimento ai dati di OCT, il 79% dei pazienti erano responsivi alla terapia e il 21% no. I dati riguardanti il test VA sono stati recuperati per 100 individui. Il 30% dei pazienti erano responsivi mentre il 70%, non rispondeva al trattamento. Non è stata riscontrata alcuna associazione tra variabili come l'età, genere, tabagismo e gruppo etnico e la risposta clinica alla terapia. Su 101 pazienti inclusi nello studio 99 sono stati analizzati per i polimorfismi VEGFA -2578C/A, -1154G/A, -3818G/T, -1498C/T, -7C/T e -634G/C SNPs. Tutti i pazienti sono stati genotipizzati per gli SNPs LOC387715 A69S e VEGFA -2305G/T. Su 101 pazienti 97 sono stati analizzati per la variante CFHY402H. Infine, gli SNPs VEGFA-1210C/A e VEGFA-2305G/T sono stati esclusi dall'analisi perché non erano polimorfici nella popolazione presa in esame. Gli individui portatori delle varianti VEGFA-2578CC, VEGFA -1498TT oppure VEGFA-1154GG sono stati riconosciuti come non responsivi sulla base della diagnosi con test VA e nessuna associazione è stata trovata per CFH e LOC387715. Con riferimento alla diagnosi con OCT, i pazienti portatori del genotipo LOC387715 A69S TT sono stati classificati come non responsivi (9/16) rispetto a quelli con genotipo -GG e -GT (12/84); ($P = 0.00071$; odds ratio: 7.69; 95% intervallo di confidenza: 2.38–25). Infine non è stata riscontrata alcuna correlazione tra i genotipi VEGFA and CFH diagnosticati con OCT.

In questo studio retrospettivo è stata valutata l'utilità di alcune varianti genetiche dei geni VEGFA, LOC387715 e CFH come possibili marcatori di predizione degli outcome clinici in pazienti con maculopatia essudativa in trattamento con bevacizumab or ranibizumab. Gli autori hanno mostrato una correlazione tra gli SNPs del gene VEGFA (-2578CC, -1498TT e -1154) e la diagnosi eseguita con il test di acutezza visiva (VA) che, però, non è stata confermata dopo analisi di multivariata.

Altri ricercatori hanno studiato l'influenza degli stessi polimorfismi nell'ADM. Imai e coll., ad esempio, avevano trovato una correlazione tra VEGFA -2578C/A e i cambi dei livelli di acutezza visiva in risposta al trattamento con anti VEGF, evidenziando, in linea con i risultati di questo studio, che i pazienti portatori di VEGFA-2578 C erano più soggetti alla mancanza di un'adeguata risposta alla terapia. Sebbene i risultati di questo studio supportino questo ritrovamento, suggeriscono anche che il contributo potrebbe essere modesto. Un altro studio eseguito da Boltz e coll. ha riportato un dato di influenza sugli esiti della terapia da parte dei polimorfismi VEGFA-634 e VEGFA IVS -99 (rs3024997), ma, anche in questo caso, i risultati non sono stati significativi dopo analisi di multivariata.

In questo studio è stato utilizzato, come secondo outcome, il fenotipo stabilito tramite OCT. Al tempo di questo trial, l'OCT era una diagnosi utilizzata comunemente come surrogato per stabilire l'intensità e la durata della terapia indipendentemente dal test VA. La scelta di aggiungere i dati di OCT come endpoint è stata fatta per cercare un modo di predire la durata e l'intensità della terapia per guadagnare un buon grado di visione. Questo è molto differente dalle indicazioni ricavabili dal test VA che può prevedere gli esiti clinici indipendentemente dall'intensità e durata della terapia e che è influenzato da altre variabili.

Gli autori di questo studio hanno trovato una correlazione tra il genotipo LOC387715 A69S TT e il fenotipo "non responder" sulla base della diagnosi con OCT. I pazienti con due alleli varianti avevano un rischio nettamente superiore di non rispondere alla terapia (effetto dominante recessivo) e ciascun allele variante esercitava un effetto in questa direzione (effetto allele-dose).

Il ruolo dello SNP LOC387715 A69S nella patogenesi dell'AMD rimane da chiarire, ma lo stesso vale per la funzione del gene LOC387715. Studi precedenti avevano però chiaramente dimostrato un'associazione tra questo polimorfismo e gli outcome clinici indipendentemente dalla terapia candidandolo come ottimo marker prognostico. I risultati qui esposti suggeriscono che questa variante possa essere considerata un indicatore altrettanto valido per predire gli esiti della terapia con anti VEGF nei pazienti con AMD.

In accordo con i risultati sull'associazione tra LOC387715 A69S e la risposta alla terapia, un altro studio recente ha mostrato una correlazione tra il genotipo LOC387715 A69S e la scarsa risposta al ranibizumab e nessuna associazione tra i genotipi CFH e la risposta al trattamento farmacologico. La novità più interessante è che mentre i precedenti lavori hanno utilizzato come endpoint i cambi derivati dal test VA, in questo studio l'associazione è stata stabilita tra il genotipo e, insieme, i dati di OCT e i risultati del test VA.

Questo trial dimostra l'esistenza di un'associazione tra il genotipo LOC387715 A69S e la risposta alla terapia contro la maculopatia essudativa con iniezioni intraoculari di bevacizumab o ranibizumab, evidenziando che questo tipo di terapia potrebbe essere inefficace in pazienti omozigoti LOC387715 A69S TT. Questi risultati suggeriscono l'importanza di candidare tali individui alla scelta di trattamenti farmacologici alternativi. Inoltre, la coorte di pazienti esaminata in questo studio potrebbe rappresentare una popolazione ideale di candidati per trial che sperimentino dosi più elevate d'inibitori del VEGF.

Come spesso avviene, una delle limitazioni di questa ricerca è rappresentata dal suo basso potere statistico. Nuovi studi dovranno essere realizzati per confermare l'associazione genotipo-fenotipo mostrata in questo lavoro.

Parole chiave: Maculopatia essudativa senile, anti VEGF, tomografia ottica a coerenza di fase, test di acutezza visiva, LOC387715 A69S.

Riferimento bibliografico

Kitchens JW et al. *Clin Ophthalmol* 2013, 7:1987-93.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=24143065>

DIFFERENZE GENETICHE DEGLI ENZIMI DEL CITOCROMO P450 E RISPOSTA AL TRATTAMENTO CON ANTIDEPRESSIVI

A cura della Dott.ssa Paola Niola e del Dott. Alessio Squassina

Gli enzimi della famiglia del citocromo P450 (CYP450) sono coinvolti nel metabolismo del 75% dei farmaci commercializzati. È ormai noto che i polimorfismi a carico dei geni che codificano gli enzimi del CYP450 sono responsabili di differenze significative nell'attività enzimatica. Poiché la variabilità nella velocità di metabolizzazione di un farmaco può alterare la concentrazione del composto attivo, genotipizzare gli enzimi del CYP450 potrebbe essere utile al fine di migliorare l'efficacia di molte terapie farmacologiche, consentendo di stabilire la dose del farmaco in relazione al profilo genetico del paziente. I farmaci antidepressivi sono per la maggior parte metabolizzati dai CYP450. Fra questi la nortriptilina, antidepressivo triciclico, è metabolizzato a 10-idrossinortriptilina (nelle forme -cis e -trans) dall'enzima CYP2D6. È stato riportato che in pazienti trattati con nortriptilina le concentrazioni sieriche del farmaco sono associate a polimorfismi del gene CYP2D6. L'escitalopram, un altro farmaco antidepressivo appartenente alla categoria degli inibitori selettivi del reuptake della serotonina (SSRI), è metabolizzato a S-demetil-citalopram da tre enzimi, il CYP3A4, il CYP2C19 e, in forma minore, dal CYP2D6. Di questi tre enzimi, solo i polimorfismi nel CYP2C19 e nel CYP2D6 sono associati a differenze nella concentrazione sierica di antidepressivo attivo. Per quanto numerose evidenze mostrino una chiara relazione tra i genotipi dei CYP450 e la concentrazione sierica degli antidepressivi, non è ancora certo se vi sia una relazione diretta tra tali genotipi e la differente risposta alla terapia. D'altra parte, diversi studi riportano associazione tra la risposta al trattamento e la

concentrazione sierica degli antidepressivi. Per esempio, per quanto riguarda la terapia con nortriptilina, i dati pubblicati mostrano una relazione non lineare (curvilinea) tra la concentrazione periferica di farmaco circolante e la risposta al trattamento. Per quanto riguarda la terapia con citalopram, uno studio recente ha riportato un miglioramento dei sintomi nei pazienti con livelli sierici di farmaco superiori a 50µg/L rispetto ai pazienti con livelli sierici più bassi. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per chiarire il ruolo dei genotipi dei CYP450 e dei livelli sierici nella risposta agli antidepressivi. Pertanto, lo scopo di questo studio è stato quello di: 1) replicare i risultati di precedenti lavori che hanno mostrato un'influenza significativa dei genotipi dei CYP450 sulla concentrazione sierica di antidepressivi; 2) valutare se i genotipi dei CYP450 predicono la risposta al trattamento antidepressivo; 3) esplorare la relazione tra la concentrazione sierica di antidepressivi e la risposta terapeutica.

Questo studio è stato condotto su pazienti inclusi nel progetto European pharmacogenetic Genome-Based Therapeutic Drugs for Depression (GENDEP). La coorte del progetto GENDEP comprendeva 868 pazienti di origine Europea con diagnosi di depressione unipolare secondo i criteri del ICD-10/DSM-IV, di cui 498 erano trattati con escitalopram (10-30 mg/die) e 368 con nortriptilina (50-150 mg/die) per una durata di 8 settimane. Alcuni pazienti (5.81%) erano trattati in co-mediazione con farmaci con azione inibitoria sull'attività dei CYP450. Settantasette pazienti trattati con escitalopram e 79 trattati con nortriptilina hanno abbandonato lo studio prima delle 8 settimane. I campioni di sangue sono stati raccolti per 457 pazienti (266 trattati con escitalopram e 191 con nortriptilina). Ventitré pazienti trattati con escitalopram sono stati esclusi a causa di livelli sierici inferiori a 10µg/L (limite di accuratezza). I pazienti sono stati genotipizzati per 33 varianti nel gene CYP2D6 e per 2 varianti nel gene CYP2C19, usando il Roche AmpliChip CYP450. Inoltre, è stato genotipizzato anche l'allele *17 del gene CYP2C19 utilizzando il metodo TaqMan SNP genotyping assay. Gli autori hanno utilizzato il modello misto lineare per valutare se: 1) i genotipi dei CYP450 potessero predire le tre misure sieriche standard: i livelli sierici del farmaco; i livelli sierici del primo metabolita; il rapporto metabolita/farmaco; 2) i genotipi dei CYP450 potessero predire la risposta al trattamento farmacologico; 3) la concentrazione sierica del farmaco potesse predire la risposta alla terapia. Quest'ultima analisi è stata svolta in tre stadi: al primo stadio è stato considerato il metabolita come predittore; al secondo stadio è stata valutata la relazione tra concentrazione sierica e risposta al farmaco indipendentemente dalla dose del farmaco, utilizzando quindi la dose come covariata; al terzo stadio è stata considerata la relazione curvilinea tra concentrazione sierica e risposta alla terapia.

I risultati ottenuti dalla prima analisi (punto 1) mostrano che i genotipi di CYP2C19 predicono significativamente le concentrazioni sieriche di escitalopram ($n=223$, $p=9.35 \cdot 10^{-9}$) e che i genotipi che codificano per le forme più attive dell'enzima sono associati a minori livelli sierici del farmaco. I genotipi di CYP2C19 non sono tuttavia associati con le concentrazioni di S-demetil-citalopram ($n=183$, $p=0.065$), ma sono significativamente associati con il rapporto di S-demetil-citalopram/escitalopram ($n=182$, $p=4.93 \cdot 10^{-7}$). Infine, alti livelli di attività enzimatica sono associati a un alto rapporto metabolita/farmaco. Similmente, i genotipi di CYP2D6 predicono significativamente i livelli di nortriptilina ($n=161$, $p=1.90 \cdot 10^{-4}$) e di 10-idrossinortriptilina ($n=158$, $p=0.0026$) corretti per posologia. Anche in questo caso, i genotipi che codificano per le forme più attive dell'enzima CYP2D6 sono associati a una minore concentrazione sierica di nortriptilina e a una maggiore concentrazione di 10-idrossinortriptilina. Le varianti più attive dell'enzima sono inoltre associate a un più alto rapporto di 10-idrossinortriptilina/nortriptilina ($n=157$, $p=3.57 \cdot 10^{-5}$). I risultati riguardanti la seconda analisi (punto 2) mostrano che i genotipi di CYP450 non sono significativamente associati alla risposta all'escitalopram ($n=443$, $p=0.478$) o alla nortriptilina ($n=334$, $p=0.807$). Infine, l'ultima analisi (punto 3) mostra una lieve associazione tra la concentrazione sierica di escitalopram e la risposta al trattamento ($n=266$, $p=0.012$). Tuttavia questa associazione è nella direzione opposta a quanto atteso dagli autori, in quanto i risultati mostrano che alte concentrazioni sieriche di escitalopram predicono una minore risposta alla terapia. I livelli di S-demetil-citalopram e il rapporto metabolita/farmaco non predicono in maniera significativa la risposta alla terapia. Nei pazienti trattati con nortriptilina, un'alta concentrazione sierica di 10-idrossinortriptilina è significativamente associata a una minore risposta al farmaco ($n=188$, $p=0.002$). Inoltre, non vi è associazione tra i livelli di nortriptilina o il rapporto 10-idrossinortriptilina/nortriptilina e l'outcome terapeutico. Considerando la dose terapeutica come covariata, nessuna delle variabili è risultata significativamente associata alla risposta farmacologica. Non è stata inoltre evidenziata una relazione curvilinea tra la risposta al trattamento e la concentrazione sierica di farmaco, la concentrazione di metabolita o il rapporto farmaco/metabolita per nessuno dei due farmaci, con o senza correzione per posologia.

In questo studio è stata quindi dimostrata una stretta relazione tra i genotipi degli enzimi CYP2D6 e CYP2C19 e i livelli sierici degli antidepressivi nortriptilina o escitalopram. Tuttavia, i risultati non permettono di spiegare le differenze tra pazienti nella risposta al trattamento. Data la mancanza di associazione tra concentrazione sierica e risposta al trattamento, e l'assenza di relazione tra i genotipi dei CYP450 e la dose del farmaco, i dati riportati suggeriscono che le differenze nella concentrazione sierica non sono utili a predire la variabilità nella risposta.

La dimensione del campione di questo studio può considerarsi uno dei punti di forza, in quanto possiede un potere statistico sufficiente per identificare associazioni clinicamente rilevanti tra livelli sierici dei farmaci studiati e risposta alla terapia. Tra le principali limitazioni dello studio è necessario considerare che i livelli sierici presentavano differenze significative tra pazienti reclutati nei diversi centri coinvolti nello studio. Considerando che i genotipi dei CYP450 non differivano significativamente tra i centri, le differenze nei livelli sierici potrebbero essere determinate da differenze ambientali. Un'altra limitazione è rappresentata dal fatto che la variabilità nel metabolismo e nelle concentrazioni sieriche dei farmaci studiati potrebbe giocare un ruolo fondamentale negli effetti avversi, che costituiscono un fattore rilevante nell'influenzare il numero di drop out.

I risultati di questo studio mostrano che le varianti geniche nei CYP450 hanno una relazione significativa con i livelli sierici dei farmaci antidepressivi escitalopram e nortriptilina. Tuttavia, in base alle evidenze mostrate, i genotipi dei CYP450 e le concentrazioni sieriche dei farmaci studiati non sembrano predire le differenze nella risposta al trattamento farmacologico.

Conflitti d'interesse: Gli autori Henigsberg e Souery hanno partecipato a trial clinici sponsorizzati da diverse aziende farmaceutiche tra cui GlaxoSmithKline e Lundbeck. Maier, Aitchison, Farmer e McGuffin hanno ricevuto compensi per consulenze e onorari per aver preso parte a pannelli di esperti da aziende farmaceutiche tra cui Lundbeck, GlaxoSmithKline e Roche Diagnostics

Parole chiave: nortriptilina e escitalopram, depressione, CYP2C19, CYP2D6

Riferimento bibliografico

Hodgson K et al. *J Psychopharmacol* 2013 Nov 20. [Epub ahead of print].
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=24257813>

RISULTATI INCOERENTI IN STUDI FARMACOGENOMICI SU VASTA SCALA

A cura del Dott. Marco Pelin e del Dott. Gabriele Stocco

I pazienti con cancro spesso presentano una risposta eterogenea al trattamento terapeutico ed esistono evidenze che indicano che la risposta è determinata in parte da alterazioni specifiche nel genoma delle cellule somatiche cancerose e da cambiamenti nell'espressione genica. Studi su linee cellulari derivate da tumori sono stati ampiamente impiegati per testare l'efficacia degli agenti terapeutici e per esplorare fattori genomici associati alla risposta ai farmaci. Diversi studi hanno cercato di identificare "signatures" predittive della risposta; tuttavia, la maggior parte di questi studi hanno testato solamente un numero limitato di geni, un numero limitato di farmaci oppure hanno valutato la risposta farmacologica in un piccolo numero di linee cellulari. Risultati di due studi farmacogenomici su vasta scala – "Cancer Genome Project" (CGP) e "Cancer Cell Line Encyclopedia" (CCLE) - sono stati pubblicati di recente (*Garnett, M. J. et al. Nature* 2012; 483: 570–575; *Barretina, J. et al. Nature* 2012; 483: 603–607). CGP ha testato l'attività di 138 agenti antitumorali in 727 linee cellulari, mentre CCLE ha considerato 24 farmaci testati in 1036 linee cellulari. Fra questi, 15 farmaci e 471 linee cellulari sono stati esaminati in entrambi gli studi. Inoltre in entrambi gli studi sono stati confermati risultati relativi a mutazioni di 64 geni e all'espressione di 12.153 geni. Tali sovrapposizioni consentono di valutare la coerenza fra questi set di dati indipendenti e dei modelli genomici predittivi di risposta ai farmaci da essi derivati: tali valutazioni costituiscono lo scopo del presente articolo.

Inizialmente gli autori hanno confrontato i profili di espressione genica nei 61 replicati biologici dello studio CGP, osservando una correlazione molto elevata (coefficiente di correlazione di Spearman 0,97), indicativa di una riproducibilità eccellente all'interno dello stesso studio. Sono stati quindi confrontati i profili di

espressione genica di 471 linee cellulari condivise fra i due studi. Nonostante siano state impiegate diverse piattaforme per la valutazione dell'espressione genica (Affymetrix GeneChip HG-U133A nello studio CGP e Affymetrix HG-U133PLUS2 in CCLE), i profili di espressione di linee cellulari identiche sono risultati meglio correlati in modo significativo rispetto a quelli di linee cellulari diverse (coefficiente di correlazione rispettivamente 0,85 e 0,34).

Anche confrontando le mutazioni per i 64 geni caratterizzati nelle 471 linee cellulari condivise fra i due studi è stata registrata una maggiore concordanza fra linee cellulari identiche che linee cellulari diverse, sebbene la concordanza non fosse perfetta (κ di Cohen pari a 0,65) e ciò potrebbe essere dovuto a differenze nelle piattaforme di sequenziamento utilizzate o al software impiegato per identificare le varianti genomiche nei due studi.

Sono stati quindi confrontati i fenotipi di sensibilità ai farmaci. Gli autori hanno confrontato le misurazioni di sensibilità ai farmaci nei due studi per i 15 farmaci testati sulle 471 linee cellulari in comune. Sia lo studio CGP che CCLE hanno misurato la sensibilità ai farmaci utilizzando come parametri di riferimento l'IC50 e l'AUC (area sottostante la curva concentrazione risposta); tuttavia i due studi hanno impiegato protocolli sperimentali diversi. Le differenze comprendono il saggio farmacologico impiegato, il range di concentrazioni di farmaci testate e la scelta dell'estimatore che descrive la curva concentrazione risposta. Inoltre, in entrambi gli studi, per molti farmaci non è stato possibile determinare l'IC50, in quanto la concentrazione necessaria a ridurre la crescita del 50% non è stata raggiunta. Nello studio CGP, l'IC50 è stata stimata in ogni caso utilizzando un modello bayesiano di sigmoide per la curva concentrazione risposta. Invece, lo studio CCLE nei casi in cui non si è raggiunta l'IC50 ha riportato la concentrazione massima testata invece di un'IC50 estrapolata.

Per ciascuno dei 15 farmaci testati sia nello studio CGP che CCLE, gli autori hanno classificato la risposta nelle 471 linee cellulari condivise e calcolato il coefficiente di correlazione di Spearman per l'IC50 riportata. Solo per un farmaco, 17AAG (inibitore di HSP90) è stata identificata una correlazione moderata ($\rho = 0,61$) e per un altro, PD0325901 (inibitore di MEK), una correlazione più modesta; complessivamente la mediana dei coefficienti di correlazione delle IC50 è risultata pari solo a 0,28. La stessa analisi eseguita sui valori di AUC ha dimostrato una concordanza migliore (ρ mediano = 0,35), tuttavia la differenza non è risultata statisticamente significativa. Anche valutando se la correlazione dei parametri di risposta ai farmaci potesse dipendere dal tessuto da cui le linee cellulari hanno avuto origine, le concordanze sono risultate scarse. I valori di IC50 e di AUC hanno presentato una tendenza verso una maggiore concordanza solo in linee cellulari derivate dal tratto urinario. Tuttavia, visto il piccolo numero di linee cellulari originarie di questo tessuto (10), solo tre farmaci (PD0325901, nutlin-3 e 17AAG) hanno dimostrato una correlazione statisticamente significativa, seppure in modo moderato. Questa scarsa concordanza osservata nella maggior parte dei farmaci potrebbe essere dovuta ai diversi saggi farmacologici impiegati nei due studi (saggio metabolico basato sui livelli di ATP per CGP e per l'attività delle reduttasi per CCLE). Alterati livelli energetici intracellulari dovuti a differenze nei livelli di ATP, infatti, non sempre implicano un'alterata attività metabolica a carico delle reduttasi, essendo esse un endpoint piuttosto aspecifico per la valutazione di una risposta farmacologica.

Nonostante la discordanza riscontrata nelle misure di sensibilità ai farmaci fra CGP e CCLE, gli autori hanno testato se l'associazione fra la risposta ai farmaci e le caratteristiche genomiche esaminate potesse essere consistente fra i due studi. Questo è un aspetto importante in quanto l'identificazione di predittori genomici della risposta ai farmaci è stato lo scopo primario degli studi CGP e CCLE.

L'associazione fra i geni e la risposta ai farmaci è stata valutata calcolando per ciascun farmaco un modello di regressione lineare che ha incluso l'espressione genica come un predittore della sensibilità ai farmaci, controllato per il tessuto di origine della linea cellulare. I modelli lineari sono stati calcolati sia per l'IC50 che per l'AUC. Anche queste analisi hanno indicato una bassa corrispondenza fra i due studi; le correlazioni migliori con l'IC50 sono state osservate per PD0325901 e 17AAG (ρ rispettivamente pari a 0,36 e 0,38). Sebbene le correlazioni siano risultate influenzate in maniera significativa dal tessuto di origine della linea cellulare (p-value test di Kruskal-Wallis = 0,006), solo i farmaci testati nelle linee derivate dal tessuto ematopoietico/linfoma o dal tratto urinario hanno dimostrato correlazioni leggermente superiori a quelle registrate in tutti gli altri tessuti combinati, sia in termini di IC50 che AUC. Gli autori hanno quindi considerato se la correlazione scarsa potesse essere dovuta a geni non associati alla risposta ai farmaci, focalizzando l'analisi esclusivamente in geni che fossero risultati associati alla sensibilità ai farmaci (false discovery rate < 20%) in almeno uno degli studi. Complessivamente, le correlazioni, sebbene migliori di

quelle calcolate utilizzando tutti i geni (e.g., per l'IC50 di AAG, $\rho = 0,63$), sono risultate comunque ancora basse.

Considerato che per la risposta ai farmaci, specifiche classi funzionali di geni ("pathway") potrebbero essere più predittive rispetto ai geni individuali, gli autori hanno utilizzato i geni la cui espressione è risultata associata alla risposta ai farmaci per individuare "pathway" di GeneOntology sovra-rappresentati mediante analisi "gene set enrichment". Queste analisi basate sulle "pathway" di geni hanno fornito i risultati migliori in termini di coerenza fra i due studi, in quanto quasi la metà dei farmaci ha dimostrato un coefficiente di correlazione superiore a 0,5. Il risultato di correlazione più elevato è stato quello di PD0325901, per cui le "pathways" identificate come significativamente associate all'AUC sono risultate coerenti fra i due studi in maniera sostanziale, con un coefficiente di correlazione pari a 0,76.

Per quanto riguarda i dati sulle mutazioni presenti in 64 geni sequenziati sia nello studio CGP che CCLE, poche mutazioni sono risultate associate con la risposta ai farmaci, che in parte spiega la scarsa coerenza delle correlazioni fra mutazioni e risposta ai farmaci osservata ($\rho < 0,50$).

Per testare se i dati genomici oppure le misurazioni di sensibilità ai farmaci sono risultate la fonte della scarsa coerenza fra i due studi, gli autori hanno confrontato i risultati ottenuti utilizzando i dati di espressione genica identici (quindi perfettamente correlati) per le 471 linee cellulari, mantenendo i dati originali di sensibilità ai farmaci, non riscontrando un miglioramento nella correlazione dei risultati fra i due studi. Tuttavia, utilizzando identici fenotipi, mantenendo invece i dati di espressione genica originali, la correlazione dei risultati ottenuta dai due studi è risultata aumentata in tutti i casi, dimostrando chiaramente che la discordanza fra gli studi origina dalle misurazioni di sensibilità ai farmaci.

Due studi farmacogenomici su vasta scala sono stati pubblicati di recente. I dati genomici sono risultati ben correlati fra i due studi; tuttavia, la misurazione di risposta ai farmaci è risultata per lo più discordante. Sebbene la causa delle differenze non sia chiara, è da escludere che possa trattarsi di scarsa qualità di uno dei due lavori. "Tutti i modelli sono sbagliati, alcuni modelli sono utili". Se lo scopo è di predire l'efficacia clinica, ci sono troppe differenze fra le cellule in cultura ed i pazienti, in particolare considerando il delicato bilanciamento fra gli effetti benefici e tossici dei farmaci antitumorali. L'uso più appropriato dei dati farmacologici ottenuti su linee cellulari è la generazione o elaborazione di ipotesi, piuttosto che la predizione statistica formale.

Parole chiave: pharmacogenomics, cancer cell lines, anticancer drugs

Riferimento bibliografico

Haibe-Kains B et al. *Nature* 2013, 504(7480):389-93
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=24284626>

VALUTAZIONE DI PATTERN FARMACOGENETICI PREDITTIVI DI EVENTI AVVERSI IN PAZIENTI CON CANCRO DEL COLON-RETTO TRATTATI CON FLUOROPIRIMIDINE

A cura del Dott. Vittorio Simeon

Il 5-fluorouracile (5-FU) e la capecitabina sono le opzioni terapeutiche principali nella cura del cancro del colon-retto in fase avanzata ed in terapia adiuvante, e vengono utilizzati in monoterapia od in combinazione con altri agenti chemioterapici e biologici. Sia il metabolismo che il catabolismo del 5-FU e della capecitabina possono essere influenzati da numerosi enzimi con alterazioni polimorfiche funzionali. È stato dimostrato in trial clinici randomizzati di chemioterapia adiuvante per il cancro del colon-retto che la terapia a base di 5-FU in combinazione con leucovorin è in grado di migliorare sia la sopravvivenza generale che quella libera da malattia se comparata con la sola chirurgia. In sperimentazioni cliniche successive i partecipanti ai trial sottoposti a terapia con 5-FU/leucovorin in combinazione con oxaliplatino avevano un miglioramento statisticamente significativo della sopravvivenza libera da progressione. Nonostante una buona efficacia del trattamento, la safety rimaneva a rischio, infatti la neutropenia e la diarrea erano eventi avversi molto importanti emersi in questo trial. La necessità di rendere un trattamento ampiamente maneggevole e di ridurre la tossicità è evidente poiché effetti avversi non intenzionali possono presentarsi anche in pazienti che hanno ricevuto basse dosi o brevi cicli di chemioterapia, con conseguenze gravi sul

rapporto rischio/beneficio. Di conseguenza, possono essere molto importanti i vantaggi clinici provenienti dall'utilizzo di marker predittivi genetici per la selezione dei pazienti che avranno benefici dalla terapia o che saranno a rischio di eventi avversi.

In un precedente lavoro del 2012 Jennings BA e colleghi (*Pharmacogenet Genomics* 2012; 22: 290-304) hanno effettuato una meta-analisi sull'impatto clinico della timidilato sintasi (TYMS) e della metilentetraidrofolato reduttasi (MTHFR). È emersa la difficoltà predittiva di singoli marcatori che in un calcolo del rapporto rischio/beneficio in una malattia così complessa rimane sicuramente marginale, e dunque è chiara la necessità di ampliare il discorso ad un numero più ampio di polimorfismi adattando il rapporto rischio/beneficio ad un modello poligenico più complesso. L'analisi di più polimorfismi permetterebbe di valutare le varianti che hanno caratteristiche additive, sinergiche e compensatorie nel metabolismo e nel catabolismo dei folati e dei farmaci anticchemioterapici.

Nell'ultimo lavoro pubblicato da Jennings BA e colleghi su Plos One è stata analizzata l'associazione con gli eventi avversi di numerose varianti polimorfiche del metabolismo dei folati e degli enzimi presenti nel pathway farmacodinamico e farmacocinetico di questi composti.

L'associazione è stata valutata in uno studio osservazionale di una coorte di pazienti con cancro del colon retto trattati con 5-FU e capecitabina. Sono stati reclutati 254 pazienti presso l'ospedale universitario di Norfolk (UK) tra il 2008 e il 2011. I pazienti, tutti con un performance status tra 0 e 2, erano trattati in terapia neo-adiuvante, adjuvante e palliativa sia con 5-FU che con capecitabina in monoterapia o in combinazione con altri farmaci. Sono stati raccolti dai registri clinici e di laboratorio per 12 settimane dall'inizio della terapia chemioterapica i dati rilevanti sugli eventi avversi. Gli eventi avversi sono stati classificati in accordo con la CTCAE (versione 4.0) e comprendevano sintomi gastrointestinali, mucosite/stomatite, tossicità cardiaca, neutropenia, anemia, trombocitopenia e anormale funzionalità epatica. Ogni ritardo o riduzione nella somministrazione delle fluropirimidine dovuto ad evento avverso è stato registrato come outcome primario per le successive analisi. Eventi avversi di grado 3, 4 o 5 sono stati analizzati come outcome secondario. Dopo l'estrazione del DNA da sangue periferico sono state analizzate le varianti polimorfiche con maggiore impatto funzionale dei geni MTHFR (metilentetraidrofolato reduttasi), TYMS (timidilato sintasi), DHFR (diidrofolato reduttasi), MTHFD (metilentetraidrofolato deidrogenasi), SHMT (idrometiltrasferasi), DPYP (diidropirimidina deidrogenasi), UMPS (uridina monofosfato sintetasi), CDA (citidina deaminasi) e TYMP (timidina fosforilasi).

L'analisi di associazione è stata effettuata utilizzando un test per il trend (genetico additivo) o un modello dominante/recessivo della variante polimorfica. Sono stati calcolati gli odds ratios (ORs) per ogni polimorfismo in analisi nei confronti dell'outcome primario (rischio di ritardo o modificazione della dose) e dell'outcome secondario (rischio di tossicità di grado 3, 4 o 5). Gli alleli omozigoti con maggiore frequenza sono stati utilizzati come categoria di riferimento e confronto.

L'età mediana dei partecipanti era di 67 anni ed il rapporto maschi/donne era di 1.34 a 1. La maggior parte dei pazienti (209, 82.6%) era in prima linea di terapia. Il 43.08% (109 su 254) dei pazienti aveva avuto un ritardo o una modificazione della terapia, ed il 17.39% (44 pazienti) aveva manifestato un evento avverso di grado 3 o 4. Nella prima analisi dei dati genetici non si osservava alcuna deviazione dall'equilibrio di Hardy-Weinberg.

Dopo analisi statistica è emersa un'associazione statisticamente significativa per il polimorfismo rs11479 di TYMP e la modificazione della terapia o outcome primario (OR = 2.02 [1.03, 4.00], p = 0.042) e l'evento avverso grave o outcome secondario (OR = 2.70 [1.23, 5.92], p = 0.013); in entrambe le associazioni è stato utilizzato un modello genetico dominante. Inoltre c'era un'associazione significativa tra i due outcome ed un pattern di varianti di DPYP (outcome primario OR = 3.96 [1.17, 13.33], p = 0.03; outcome secondario OR = 6.76 [1.99, 22.96], p = 0.002).

Diciannove dei quarantaquattro partecipanti con un evento avverso severo era portatore di almeno uno dei marcatori emersi dall'analisi precedente e candidati quindi come predittivi. Se l'utilizzo di questi SNP combinati fosse utilizzato come procedura diagnostica per identificare i pazienti che potrebbero soffrire di eventi avversi gravi, la sensibilità sarebbe del 45.5% con un valore predittivo positivo del 33.9%. Da questa analisi emerge come la capacità diagnostica dei marker genetici sia attualmente ancora bassa e come sia necessario colmare con ulteriori dati e varianti questa insufficienza. Ognuna delle varianti farmacocinetiche prese in considerazione in questo studio è sicuramente un candidato convincente come marker predittivo poiché ha un impatto funzionale noto sugli enzimi chiave del catabolismo del farmaco o della sua attivazione metabolica. Al contrario invece nessun marcatore farmacodinamico è risultato significativo o convincente

nell'associazione con la tossicità. Questo può riflettere sicuramente la complessità dei fattori intrinseci ed estrinseci che possono condizionare la risposta alle fluoropirimidine, inclusa la dieta a base di folati e la variabilità dell'uptake di questi ultimi.

In conclusione, questi dati identificano e confermano marker genetici in grado di predire la tossicità ma di limitata utilità e validità clinica. Sono pochi gli studi farmacogenetici che hanno considerato il ruolo dell'epistasi e dell'interazione tra polimorfismi ed è proprio in questo campo che servirebbero maggiori sforzi con studi ben costruiti e con un'adeguata potenza. Questo potrebbe sicuramente avere delle implicazioni cliniche importanti con la possibilità di guidare le decisioni dei medici basate su evidenze certe e di valutare i pro e i contro dell'utilizzo di test genetici commerciali per la predizione della tossicità del 5-FU durante il trattamento del cancro del colon-retto.

Un pattern di varianti del gene DPYD e il polimorfismo rs11479 di TYMP sono marker genetici potenziali di eventi avversi (ritardo o modificazione della terapia – effetto avverso di grado 3, 4) in pazienti con cancro del colon-retto trattati con fluoropirimidine.

Conflitto d'interesse: gli Autori non dichiarano alcun conflitto d'interesse

Parole chiave: fluoropirimidine, cancro del colon-retto, TYMP, DPYD

Riferimento bibliografico

Jennings BA et al. *PLoS One* 2013, 8(10): e78053.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24167597>



Sostieni la Società Italiana di Farmacologia

La Società Italiana di Farmacologia è tra i beneficiari dei proventi del 5 per mille dell'IRPEF.

È sufficiente apporre la propria firma ed indicare, sulla dichiarazione dei redditi, nel riquadro associazioni di volontariato, onlus, associazioni di promozione sociale e da altre fondazioni e associazioni riconosciute, il Codice Fiscale della SIF che è 97053420150, per destinare tali fondi a Borse di studio SIF per giovani ricercatori.

Per maggiori informazioni, contattare la segreteria SIF: tel. 02-29520311.

sif.farmacologia@sigr.it; sif.informazione@sigr.it; sifcese@comm2000.it.

SIF – FARMACOGENETICA

Newsletter del Gruppo di lavoro sulla Farmacogenetica della Società Italiana di Farmacologia

Registrazione del Tribunale di Milano n° 180 data 31/03/2010

http://www.sifweb.org/gruppilavoro/sif_gruppo_farmacogen.php

Direttore	Prof. Emilio Clementi (Università di Milano)
Coordinatore	Dott.ssa Valentina Boscaro (Università di Torino)
Web Editor	Dott. Federico Casale (Università di Torino)
Hanno contribuito a questo numero:	Dott.ssa Sarah Cargin (Università del Piemonte Orientale) Dott.ssa Lucia Gozzo (Università di Catania) Dott.ssa Gloria Ravegnini (Università di Bologna) Dott.ssa Donatella Carretta (Università di Bologna)

Dott. Vittorio Simeon (IRCCS – CROB)
Dott. Marco Pelin (Università di Trieste)
Dott. Gabriele Stocco (Università di Trieste)
Dott.ssa Valeria Conti (Università di Salerno)
Dott.ssa Giusy Russomanno (Università di Salerno)
Dott.ssa Paola Niola (Università di Cagliari)
Dott. Alessio Squassina (Università di Cagliari)
Dott.ssa Stefania Cheli (Azienda Ospedaliera Polo Universitario "L. Sacco" di Milano)

Supervisione

Prof. Diego Fornasari (Università di Milano)
Prof. Armando Genazzani (Università del Piemonte Orientale)

Archivio SIF-Farmacogenetica Edicola Virtuale SIF

<http://edicola.sifweb.org/edicola/farmacogenetica/pagina/archivio>

Contatti: webmaster@sifweb.org

DISCLAIMER – Leggere attentamente

SIF, Società Italiana di Farmacologia, si propone di pubblicare sul proprio sito internet www.sifweb.org informazioni precise ed aggiornate, ma non si assume alcuna responsabilità né garantisce la completezza ed esaustività delle informazioni messe a disposizione. In particolare, SIF precisa che le risposte fornite ai quesiti medico / tossicologici sono fornite sulla base della raccolta di fonti bibliografiche esistenti (rispetto alle quali non si garantisce la esaustività). Pertanto, dalle risposte ai quesiti non devono essere tratte conclusioni se non un mero richiamo alle fonti presenti in letteratura. La SIF, inoltre, avvisa gli utenti che le informazioni contenute nel proprio sito e le risposte ai quesiti hanno finalità meramente divulgative, informative ed educative e non possono in alcun modo sostituire la necessità di consultare il Ministero della Salute, l'Istituto Superiore di Sanità e più in generale le Istituzioni nazionali ed internazionali attive in materia. IL SITO INTERNET DI SIF E LE RISPOSTE AI QUESITI NON DEVONO IN ALCUN MODO ESSERE CONSIDERATI PARERI MEDICI. SIF, quindi, declina ogni responsabilità circa l'utilizzo del proprio sito, delle informazioni in esso contenute e delle risposte ai quesiti ed avverte l'utente che ogni e qualsiasi contenuto ed informazione del sito (comprese le risposte ai quesiti) sarà utilizzata sotto diretta e totale responsabilità dell'utente stesso. Né SIF, né alcuna altra parte implicata nella creazione, realizzazione e pubblicazione del sito internet di SIF e nelle redazioni delle risposte ai quesiti possono essere ritenute responsabili in alcun modo, né per alcun danno diretto, incidentale, conseguente o indiretto che deriva dall'accesso, uso o mancato uso di questo sito o di ogni altro ad esso collegato, o di qualunque errore od omissione nel loro contenuto. Le informazioni fornite nelle newsletters, le eventuali nozioni su procedure mediche, posologie, descrizioni di farmaci o prodotti d'uso sono da intendersi come di natura generale ed a scopo puramente divulgativo ed illustrativo. Non possono, pertanto, sostituire in nessun modo il consiglio del medico o di altri operatori sanitari. Nulla su <http://www.sifweb.org>, sulle relative newsletters, e-mails, o qualsiasi dei progetti della SIF, può essere interpretato come un tentativo di offrire o rendere un'opinione medica o in altro modo coinvolta nella pratica della Medicina. La Società Italiana di Farmacologia, i suoi Soci od altre parti ed essa connesse non possono, quindi, essere ritenuti responsabili circa risultati o conseguenze di qualunque utilizzo o tentato utilizzo di una qualsiasi delle informazioni riportate. Non sono ammesse la divulgazione e la diffusione di "SIF-Farmacogenetica" senza precedente autorizzazione scritta della Società Italiana di Farmacologia.

RICEZIONE NEWSLETTER

Nella consapevolezza che le e-mail indesiderate sono oggetto di disturbo, vi informiamo che il vostro indirizzo viene conservato e trattato nel rispetto del DL 196/03 ed in qualsiasi momento potrà esserne richiesta la modifica o cancellazione come previsto dall'articolo 13. Tutti i destinatari della e-mail sono in copia nascosta (Privacy L. 75/96). Qualora non intendeste ricevere ulteriori comunicazioni vi preghiamo di inviare una risposta all'indirizzo sif.farmacologia@sigr.it con oggetto: CANCELLA.