

**Newsletter Numero 61 – Aprile 2014**

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

Sommario**⇒ Oncologia**

- Il *next generation sequencing* identifica una variante germinale di MRE11A come marker dell'*outcome* di radioterapia nel cancro alla vescica muscolo-invasivo
- Polimorfismo C677T del gene MTHFR: associazione con i tumori linfoidi ed effetto sulla terapia con il metotressato
- Variazioni genetiche dell'*UGT* modificano l'associazione tra l'uso di FANS ed il rischio di carcinoma coloretale: registro familiare del carcinoma del colon
- Uno studio gene-candidato sulla tossicità correlata a terapia con capecitabina del cancro del colon retto identifica nuove varianti nel gene DPYD e suggerisce un ruolo per il locus ENOSF1 piuttosto che per TYMS

⇒ Infettivologia

- Studio di associazione *genome-wide* di farmacocinetica di atazanavir e iperbilirubinemia (AIDS *clinical trials group protocol* A5202)
- Associazione dei polimorfismi di NAT2, GST e CYP2E1 con epatotossicità indotta da farmaci antitubercolari

⇒ Autoimmunità

- Mancata validazione di varianti geniche associate alla risposta terapeutica con inibitori del fattore di necrosi tumorale in pazienti affetti da artrite reumatoide: replicazione di uno studio *genome-wide* e meta-analisi

⇒ La metanalisi del mese

- Polimorfismi delle proteine di trasferimento del colesterolo esterificato, uso delle statine e il loro impatto sui livelli di colesterolo ed eventi cardiovascolari

ONCOLOGIA

IL NEXT GENERATION SEQUENCING IDENTIFICA UNA VARIANTE GERMINALE DI MRE11A COME MARKER DELL'OUTCOME DI RADIOTERAPIA NEL CANCRO ALLA VESCICA MUSCOLO-INVASIVO

A cura della Dott.ssa Gloria Ravegnini

Il cancro alla vescica muscolo-invasivo (MIBC) è la sesta causa di morte degli uomini in UK. La radioterapia (RT) e la chemioterapia (CRT) hanno il vantaggio, rispetto alla cistectomia, di preservare la vescica con tassi di cura simili. MRE11, facente parte del complesso MRE11-RAD50-NBS1, è in grado di riconoscere e legare le rotture a doppio filamento del DNA (DSB), lesione dalla RT. Recentemente è stato osservato che in MIBC l'espressione di MRE11 è predittiva per pazienti trattati con RT ma non con cistectomia (Choudhury A et al., *Cancer Res* 2010, 70:7017-26). Inoltre polimorfismi a singolo nucleotide dei geni di riparazione del DNA, tra cui MRE11A sembrano associati con un aumentato rischio di cancro alla vescica. Data una forte pressione di selezione negativa contro le varianti codificanti di MRE11A, attualmente in dbSNP sono presenti solamente 9 varianti non sinonime, e tutte con una MAF <1%. Allo scopo di indentificare biomarkers utili - SNPs e varianti rare di MRE11A - per predire la risposta del tumore e la tossicità post radioterapia è stato quindi condotto uno studio di *next generation sequencing*.

Nell'analisi sono stati coinvolti un totale di 201 pazienti affetti da MIBC in trattamento con RT e 256 cistectomizzati. Dei 201 pazienti RT, 186 sono stati sequenziati. Dall'analisi sono state individuate 85 varianti che sono state successivamente validate con successo.

- *Associazione genetica con la sopravvivenza nei pazienti RT*

Tramite analisi di Cox nessuna delle variabili isto/clinicopatologiche e demografiche è risultata associata con la sopravvivenza cancro-specifica (CSS), probabilmente a causa del numero di soggetti coinvolti nello studio; inoltre, nessuna delle varianti rare è risultata associata con CSS (P=0.45).

Considerando che la regione 3'UTR è coinvolta nella regolazione genica post-transcrizionale e che di conseguenza potrebbe influenzare l'espressione di MRE11, sono state considerate le sei varianti rare di 3'UTR di MRE11 osservate in sette pazienti: la presenza di almeno una di queste era significativamente correlata con una peggior CSS (P=0.009) rispetto ai pazienti non portatori (CSS a 5 anni: portatori vs non portatori 42.9% vs 54.8%). Mediante analisi delle varianti individuali sono state identificati 2 SNPs significativamente associati con CSS, rs1805363 ($P_{trend}=0.001$) e rs13447623 ($P_{trend}=0.05$), con le varianti alleliche A e G in *linkage disequilibrium* ($D'=1.00$, $R^2=0.38$); il modello a due loci per entrambi gli SNPs ha però evidenziato che solamente rs1805363 era significativo, indicando anche che l'effetto visto con l'allele G di rs13447623 era secondario. L'allele minore A di rs1805363 era associato con una CSS minore in seguito a radioterapia (HR 2.10, 95% CI 1.34-3.28, CSS 58.3%, GA 42.0% e AA 0%)

- *Associazione genetica con tossicità tardiva alla vescica*

34 pazienti hanno sviluppato tossicità tardiva alla vescica con grado ≥ 2 e 3 pazienti tossicità tardiva al retto. Nessuna variante rara della regione 3'UTR o rs1805363 è risultata associata con lo sviluppo di tale tossicità (P=0.09 e 0.33, rispettivamente); tuttavia, rs13447623 ed rs2155209 erano associate con la tossicità tardiva della vescica (OR 2.12, 95% CI 1.30-3.45, $P_{trend}=0.03$ e OR 0.57, 95% CI 0.35-0.92, $P_{trend}=0.02$). L'analisi condizionale ha poi dimostrato che solo rs13447623 contribuiva in modo indipendente al rischio di tossicità alla vescica

- *Rs1805363: marker prognostico vs predittivo*

Per esplorare se rs1805363 fosse un marker prognostico o predittivo, 256 pazienti MIBC operati mediante cistectomia radicali sono stati genotipizzati; l'analisi non ha rivelato alcun tipo di associazione con CSS (HR 0.99, 95% CI 0.61-1.60, $P_{trend}=0.89$); analogamente, anche l'analisi multivariata non ha mostrato associazioni significative (P=0.88). Questo suggerisce che MRE11 è funzionalmente coinvolto nella risposta nei pazienti trattati con RT, piuttosto che come marker prognostico generale per MIBC.

Per la prima volta è stato dimostrato che SNPs e varianti rare germinali di MRE11A sono associate con la sopravvivenza in pazienti affetti da MIBC trattati con radioterapia. In particolare, la presenza di una variante rara nella regione 3'UTR e dello SNP rs1805363 era associata con uno scarso *outcome* clinico mentre rs13447623 con tossicità tardiva a carico della vescica. Nei pazienti trattati con cistectomia rs1805363 non è risultato associato con la prognosi, suggerendo che tale SNP sia un biomarker predittivo solamente nel caso della radioterapia; lo SNP potrebbe avere un impatto clinico significativo nell'identificazione di pazienti

scarsamente responsivi a RT considerando che i 24 pazienti con genotipo omozigote erano tutti deceduti durante i primi 24 mesi.

In conclusione, in questo studio sono state identificate varianti rare e SNPs germinali nel gene MRE11A, mediante tecnologia *next generation sequencing*, come potenziali markers dell'*outcome* e della tossicità a radioterapia in pazienti affetti da tumore alla vescica muscolo-invasivo.

Parole chiave: tumore alla vescica muscolo-invasivo, radioterapia, MRE11

Riferimento bibliografico

[Teo MT](#) et al. *Ann Oncol.* 2014, 25(4): 877-83.

POLIMORFISMO C677T DEL GENE MTHFR: ASSOCIAZIONE CON I TUMORI LINFOIDI ED EFFETTO SULLA TERAPIA CON IL METOTRESSATO

A cura della Dott.ssa Eva Cuzzoni e della Dott.ssa Raffaella Franca

La metilen-tetraidrofolato reduttasi (MTHFR) è uno degli enzimi fondamentali nel metabolismo dell'acido folico e converte il 5,10 metilen-tetraidrofolato (5,10-MTHF) a 5-metil-tetraidrofolato (5-MTHF), la forma principale di folato circolante. Il 5-MTHF fornisce il gruppo metile necessario per la conversione dell'omocisteina a metionina, importante poi per la metilazione di DNA, RNA, proteine, neurotrasmettitori e fosfolipidi, mentre il 5,10-MTHF e i suoi derivati sono cofattori essenziali sia per la sintesi del timidilato che per la sintesi de novo delle purine. Il gene codificante per l'enzima MTHFR si trova sul braccio corto del cromosoma 1 (1p36.3). Il polimorfismo MTHFR C677T è localizzato nell'esone 4 e porta alla sostituzione di un alanina con una valina nel codone 222. Questo cambiamento aminoacidico avviene a livello del sito di legame di MTHFR con la flavina adenina dinucleotide, suo co-fattore, facilitandone la separazione e, di conseguenza, diminuendo l'attività dell'enzima stesso. Gli individui con genotipo omozigote mutato 677TT presentano solamente il 30% dell'attività enzimatica rispetto ai soggetti wild-type, mentre nelle persone con il genotipo eterozigote MTHFR 677CT, l'attività è del 60%.

E' stato ampiamente dimostrato che la variante MTHFR 677T codifica per un enzima termolabile con ridotta attività catalitica e aumenta i livelli di omocisteina plasmatica. L'attività dell'enzima MTHFR può influenzare il rischio di cancro con due meccanismi diversi. Polimorfismi che riducono l'attività di MTHFR diminuiscono la metilazione dell'omocisteina a metionina e quindi il livello di S-adenosilmetionina disponibile, con conseguente ipometilazione del DNA. Questo fenomeno può aumentare il rischio di sviluppare certi tumori. D'altra parte è stato proposto che un'alterata attività di MTHFR a causa della variazione polimorfica, porti ad un accumulo di 5,10-MTHF citosolico disponibile per la sintesi di purine e pirimidine, quindi ad una ridotta incorporazione di uracile nel DNA. Questo fenomeno potrebbe proteggere il DNA da rotture del doppio filamento e, di conseguenza, da alterazioni cromosomiche e potrebbe comportare quindi un rischio inferiore di sviluppo di cancro. Il polimorfismo MTHFR C677T è stato associato a carcinogenesi, difetti del tubo neurale e a malattie cardiovascolari secondarie a iperomocistinemia moderate in combinazione con bassi folati. I linfomi insorgono in seguito a mutazioni puntiformi, riarrangiamenti cromosomici (ad esempio, traslocazioni cromosomiche) e alterazioni epigenetiche nelle cellule ematopoietiche e rendono quindi MTHFR un gene candidato interessante per gli studi sulla leucemogenesi.

I protocolli chemioterapici attualmente utilizzati negli adulti per il trattamento della leucemia linfoblastica acuta (LLA), hanno aumentato l'incidenza di remissione completa della malattia, sebbene la tossicità indotta dalla terapia rimanga uno dei motivi principale di interruzione o sospensione del trattamento con conseguente possibile aumento del rischio di ricaduta. Predire la tossicità è difficile a causa della variabilità interindividuale nella farmacocinetica e nella farmacodinamica e a causa della possibile attribuzione della tossicità a diversi farmaci. Un chemioterapico importante nella terapia di mantenimento della LLA è l'antifolato metotressato. Questo farmaco entra nelle cellule grazie al trasportatore per i folati allo stato ridotto (*reduced folate carrier*, RFC) ed il suo meccanismo d'azione consiste principalmente nell'inibizione competitiva dell'enzima diidrofolato reduttasi (DHFR), responsabile della riduzione del diidrofolato a tetraidrofolato. L'inibizione del DHFR indotta da metotressato porta quindi all'esaurimento delle forme

ridotte di tetraidrofolato (compreso il 5,10-MTHF), contribuendo alla inibizione della sintesi di acidi nucleici e favorendo la morte cellulare. Nonostante il suo successo clinico, il metotressato è stato associato a tossicità severa in un numero considerevole di pazienti. Polimorfismi nel gene per il trasportatore del metotressato (es. RFC G80A), nei geni target del metotressato (es. la delezione di 19-bp nel gene codificante per DHFR e la ripetizione in tandem brevi di 29-bp nel gene codificante per la timidilato sintasi) e nei geni codificanti per gli enzimi del metabolismo dei folati (es. MTHFR C677T e A1298C) possono influenzare l'efficacia e gli effetti tossici del metotressato.

Lo scopo dello studio presentato dagli autori è stato quello di indagare sull'eventuale ruolo del polimorfismo MTHFR C677T nella patogenesi delle neoplasie linfoidi (LLA e linfoma non-Hodgkin (LNH)) e di studiare l'influenza di questo polimorfismo sulla tossicità da metotressato in pazienti adulti con LLA in terapia di mantenimento.

Lo studio ha coinvolto 173 soggetti: 42 pazienti con diagnosi di LLA all'esordio (39 LLA di tipo B e 3 LLA di tipo T, età media: $30,1 \pm 7,7$ anni (range 20-50), 69% maschi), 49 pazienti con diagnosi di LNH (45 B-LNH e 4 T-LNH, età media: $54,3 \pm 11,4$ anni (range 22-75), 61,2% maschi) e 82 soggetti sani abbinati per sesso ed età, scelti come gruppo di controllo tra i donatori sani. Trenta pazienti con LLA sono stati seguiti durante la terapia di mantenimento con somministrazione settimanale di metotressato a 20 mg/m^2 per analizzare l'influenza del polimorfismo MTHFR C677T sulla tossicità da farmaco (valutata su midollo, fegato e mucose).

I DNA sono stati estratti dal sangue periferico o midollare dei pazienti e le genotipizzazioni sono state effettuate con PCR standard (ottenendo un amplicone di 265 bp) e utilizzo successivo di un'enzima di restrizione: infatti, la sostituzione della base "C" con la base "T" in posizione 677 introduce un sito di taglio per l'enzima HinfI, che può quindi digerire l'amplicone in due frammenti di 171 e 94 bp. L'associazione delle varianti di MTHFR con il rischio di sviluppare tossicità da metotressato è stata analizzata con modelli di regressione logistica calcolando l'odds ratio (OR) e l'intervallo di confidenza (95% IC).

Dai risultati riportati, gli autori hanno evidenziato un aumento statisticamente significativo del rischio di LNH nei pazienti con genotipo CT (OR: 2,9; 95%IC: 1,3-6,3; $p=0,007$) e genotipo combinato CT + TT (OR: 3,2; 95% IC: 1,5-6,6; $p=0,006$), mentre nessuna associazione significativa è stata trovata tra il polimorfismo e il rischio di sviluppare LLA. I pazienti con LLA trattati con metotressato sono stati seguiti per 6 mesi durante la terapia di mantenimento per valutare insorgenza di qualsiasi tossicità (grado 1-4). Il genotipo combinato CT + TT è stato significativamente correlato con la tossicità epatica (OR: 15,6; 95 IC%: 2,6-81,3; $p=0,001$). Inoltre, una maggiore frequenza di questo genotipo combinato si è osservata nei pazienti che sviluppavano mucosite, anemia, trombocitopenia e leucopenia, senza tuttavia raggiungere livelli statisticamente significativi.

Gli autori sono coscienti di alcuni limiti di questo studio, in particolar modo sulla popolazione di studio che è relativamente piccola per valutare l'impatto delle varianti genetiche e sulla necessità di analizzare l'effetto di altri co-variabili importanti quali il genere, le malattie concomitanti e la somministrazione contemporanea di altri farmaci. Per confermare il ruolo del polimorfismo MTHFR C677T, sono necessari quindi ulteriori studi con una casistica maggiore che considerino anche i livelli di folati serici o l'assunzione di questi con la dieta.

In conclusione, questo studio dimostra una significativa associazione tra il polimorfismo MTHFR C677T ed il rischio di LNH, fornendo una base genetica per l'ipotesi che una bassa assunzione di folati e/o un loro alterato metabolismo può svolgere un ruolo nella linfomagenesi. Inoltre, in questo studio è stata trovata un'associazione significativa tra il polimorfismo MTHFR C677T e la tossicità epatica durante la terapia di mantenimento con metotressato in pazienti adulti affetti da LLA.

Parole chiave: metotressato, leucemia linfoblastica acuta, linfoma non-Hodgkin, polimorfismi genetici, metilentetraidrofolato reduttasi (MTHFR)

Riferimento bibliografico

[Ayad MW](#) et al. *Eur J Haematol* 2014 Mar 4 [Epub ahead of print].

VARIAZIONI GENETICHE DELL'UGT MODIFICANO L'ASSOCIAZIONE TRA L'USO DI FANS ED IL RISCHIO DI CARCINOMA COLORETTALE: REGISTRO FAMILIARE DEL CARCINOMA DEL COLON

A cura della Dott.ssa Lucia Gozzo

Diversi studi, inclusi trial randomizzati, hanno riportato un effetto protettivo degli antinfiammatori non steroidei (FANS) sulla carcinogenesi coloretale, come anche sull'eziologia di altre neoplasie. Rimangono comunque diversi dubbi, in particolare sul dosaggio, la durata della terapia ed il beneficio a lungo termine dell'uso preventivo dei FANS. I FANS riducono l'infiammazione inibendo la sintesi delle prostaglandine e sembrerebbero interferire con vie importanti per la carcinogenesi, quali proliferazione, apoptosi e angiogenesi. Una recente metanalisi su più di 24.000 individui ha dimostrato una riduzione del 37% di carcinoma coloretale e del 19% della mortalità globale dei pazienti che utilizzano aspirina. L'efficacia dei FANS potrebbe comunque essere legata alla biodisponibilità del composto attivo e le differenze interindividuali nel metabolismo dei farmaci potrebbero modificare gli effetti terapeutici. Il metabolismo dei FANS coinvolge primariamente la glicina N-aciltrasferasi, l'uridina 5'glucuronosiltrasferasi (per esempio l'UGT1A6) ed il CYP2C9. Pertanto, la presenza di polimorfismi del CYP2C9 o quelli dei geni della famiglia dell'UGT potrebbe influenzare l'effetto dei FANS e modificare il rischio di carcinoma coloretale. Studi precedenti hanno mostrato gli effetti di alcuni polimorfismi (CYP2C9*2, CYP2C9*3, UGT1A6*2) sul rischio di carcinoma coloretale, anche in relazione all'uso di FANS. La variante UGT1A6 sembrerebbe avere un'attività ridotta con un prolungamento dell'esposizione al farmaco attivo e di conseguenza un rischio ridotto di adenoma coloretale. Tuttavia, poco ancora si sa sui polimorfismi dell'UGT e le interazioni con i FANS in relazione alla suscettibilità al carcinoma coloretale. Per studiare gli effetti dei polimorfismi dell'UGT1A e dell'UGT2B sul rischio di carcinoma coloretale ed il rischio di modificare l'effetto protettivo dei FANS, dovrebbe essere effettuata un'analisi farmacogenetica dei loci UGT in maniera mirata e completa. A causa della struttura complessa dei loci UGT, le variazioni genetiche di questa regione non sono sufficientemente coperte dalle piattaforme standard di *genome-wide association*. Pertanto, molte delle varianti riportate in questo studio sono state studiate per la prima volta.

È stato condotto uno studio caso-controllo su 1.584 pazienti con carcinoma coloretale e 2.516 controlli sani, valutando una selezione di SNP funzionali ipotetici in 10 geni di enzimi di fase I (CYP2C9) e II (UGT) in relazione al rischio di carcinoma coloretale. Inoltre, scopo dello studio era la valutazione dell'effetto di polimorfismi target nella prevenzione del carcinoma coloretale legata all'uso di FANS.

I casi reclutati dal *Colon Cancer Family Registry* (CCFR) erano pazienti tra 20 e 74 anni con diagnosi di carcinoma coloretale primario invasivo effettuata tra il 1998 ed il 2002. I controlli erano fratelli senza diagnosi di carcinoma coloretale. L'uso di FANS era definito come uso regolare nei due anni precedenti all'arruolamento.

Non è stata osservata differenza significativa tra i casi e i controlli per quanto riguarda l'età, l'uso di FANS, l'attività fisica o il BMI. I casi erano più maschi ($p < 0,01$). Dei 18 polimorfismi analizzati, uno ha mostrato un'associazione significativa con il rischio di carcinoma coloretale: si tratta di un polimorfismo non sinonimo nel gene UGT2B15 (rs1902023, T>G; UGT2B15*2) che porta ad una sostituzione di una tirosina con acido aspartico in posizione 85 ed aumenta il rischio di carcinoma coloretale ($p = 0,02$) in soggetti con genotipo TG. Il rischio per gli omozigoti della variante allelica non è risultato statisticamente significativo. Poiché in studi precedenti è stato dimostrato che gli aplotipi o la combinazione di polimorfismi dell'UGT possono avere un impatto maggiore sull'attività enzimatica rispetto al cambiamento in singoli nucleotidi, sono stati valutati aplotipi all'interno di ogni gene UGT e nel locus UGT1A, così come genotipi combinati all'interno di ciascun gene genotipizzato per l'associazione con il rischio di carcinoma coloretale. Sebbene nessuno degli aplotipi abbia mostrato un'associazione significativa, un genotipo a 3 SNP dell'UGT1A è stato associato al rischio di carcinoma coloretale. Individui omozigoti per gli alleli wild-type dei polimorfismi rs2070959 (A>G; Thr181Ala) e rs1105879 (A>C; Arg184Ser) e omozigoti per l'allele minore G dell'rs6759892 (T>G; Ser7Ala) del gene UGT1A6, cioè l'allele UGT1A6*3, avevano un rischio 3.9 volte superiore di carcinoma coloretale rispetto agli individui portatori solo degli alleli maggiori dei tre polimorfismi (UGT1A6*1).

Diverse varianti studiate hanno mostrato una modifica significativa della riduzione del rischio di carcinoma coloretale associato all'uso di FANS. La variante Thr78Thr dell'UGT1A3 (rs17868336; A>G) ha mostrato

un aumento del rischio del 50% nei pazienti omozigoti per l'allele minore G e che non assumevano FANS rispetto ai portatori dell'allele A. Un'analisi stratificata per sito tumorale ha mostrato un'interazione statisticamente significativa tra due polimorfismi *UGT1A6* (Ser7Ala and Arg184Ser) e l'uso di FANS ed il rischio di carcinoma rettale. Non è stata osservata interazione tra gli aplotipi del locus *UGT1A* e l'uso di FANS in generale nella predisposizione al carcinoma coloretale; tuttavia, l'uso di ibuprofene è stato associato con un rischio più alto di carcinoma coloretale in soggetti omozigoti per l'allele maggiore dei tre polimorfismi studiati dell'*UGT2B4* (rs1966151, A>G, 5'UTR; rs13119049, A>T, Asp458Glu; rs1131878, A>G, 3'UTR), mentre i portatori di almeno una variante allelica in uno dei 3 loci presentava un rischio minore. Inoltre, la variante codificante Tyr85Asp del gene *UGT2B15* (*UGT2B15*2*) ha mostrato un'interazione significativa con l'uso di aspirina. Individui omozigoti per l'allele minore G e che usavano aspirina avevano un rischio maggiore rispetto ai portatori dell'allele maggiore T che non la usavano.

Il carcinoma coloretale rappresenta una patologia eterogenea e sono necessarie strategie preventive mirate per ridurre il carico di salute pubblica della malattia. Considerata la presenza di dati sull'effetto preventivo dell'aspirina e di altri FANS, cresce l'interesse nel valutare se variazioni genetiche degli enzimi del metabolismo possano predire gli effetti dei FANS sulla cancerogenesi. Poiché gli enzimi del metabolismo possono modificare, coniugare e/o eliminare composti endogeni o xenobiotici, incluse sostanze cancerogene e composti chemiopreventivi o chemioterapici, la variabilità genetica in questi enzimi può alterare la tossicità o l'efficacia degli xenobiotici e di conseguenza la suscettibilità allo sviluppo di neoplasie.

In questo ampio studio di popolazione è stato valutato se i polimorfismi dei geni degli enzimi di fase I (*CYP2C9*) e II (*UGT*) fossero associati con modifiche dell'effetto protettivo dei FANS sul rischio di carcinoma coloretale. Le varianti di 4 geni (*UGT1A3*, *UGT1A6*, *UGT2B4* e *UGT2B15*) sono risultate associate significativamente con il rischio di carcinoma coloretale. Questo studio è il primo che ha riportato l'associazione tra l'allele *UGT1A6*3* ed il rischio di carcinoma coloretale. Tuttavia questi risultati richiedono conferma, poiché l'associazione si basa su una popolazione limitata di soggetti e non è stato possibile effettuare una stratificazione per localizzazione della neoplasia. È stata, inoltre, osservata un'associazione tra la variante *UGT2B15* ed il rischio di carcinoma coloretale, ed anche una interazione con l'uso di aspirina, come una nuova interazione tra i polimorfismi dell'*UGT2B4* e uso di ibuprofene. I polimorfismi di *UGT2B15* e *UGT2B4* sono stati, infatti, associati con un aumento del rischio di carcinoma della mammella e della prostata, rispettivamente. Queste associazioni potrebbero essere legate a cambiamenti nel metabolismo degli ormoni sessuali con conseguente alterata esposizione tissutale a ormoni che ne stimolano la proliferazione. Mentre è stato dimostrato che l'*UGT2B4* metabolizza i FANS a tassi piuttosto elevati, la glucurono-coniugazione mediata dall'*UGT2B15* è stata osservata solo a livelli ridotti. In vitro, la variante Asp85 dell'*UGT2B15* ha mostrato una capacità metabolica maggiore, che potrebbe portare ad una ridotta quantità di farmaco attivo e pertanto ad una riduzione dell'effetto preventivo. Comunque, la forte interazione tra polimorfismo dell'*UGT2B15* e uso di aspirina in relazione al rischio di carcinoma coloretale, suggerisce un ruolo significativo dell'enzima nel metabolismo dei FANS. Ciononostante sembra che variazioni genetiche maggiori come *copy number variations* (CNV) possano avere un impatto maggiore sul rischio di neoplasie riportato in precedenza. È stato dimostrato che una ampia CNV che porta a delezione dell'*UGT2B17* riduce significativamente il rischio di carcinoma coloretale.

In conclusione, questo studio suggerisce che le variazioni in 4 geni (*UGT1A3*, *UGT1A6*, *UGT2B4* e *UGT2B15*) modificano il rischio di carcinoma coloretale anche in relazione all'uso di FANS. Questi risultati suggeriscono l'importanza della farmacogenetica nell'identificare individui in grado di beneficiare dell'uso preventivo dei FANS. Inoltre, questo studio suggerisce che è più importante considerare combinazioni di genotipi piuttosto che polimorfismi singoli per identificare l'interazione tra la variabilità genetica e l'effetto protettivo dell'uso dei FANS rispetto allo sviluppo di carcinoma coloretale, in particolare per la famiglia *UGT*.

Uno dei limiti dello studio è il fatto che l'uso di FANS ha determinato nella popolazione in esame solo una lieve riduzione del rischio di carcinoma coloretale, limitando il potere statistico di rilevare un'associazione gene-FANS.

Parole chiave: carcinoma coloretale, FANS, *UGT*

Riferimenti bibliografici

[Scherer D](#) et al. *Genes Chromosomes Cancer* 2014 Mar 28 [Epub ahead of print]

UNO STUDIO GENE-CANDIDATO SULLA TOSSICITÀ CORRELATA A TERAPIA CON CAPECITABINA DEL CANCRO DEL COLON RETTO IDENTIFICA NUOVE VARIANTI NEL GENE DPYD E SUGGERISCE UN RUOLO PER IL LOCUS ENOSF1 PIUTTOSTO CHE PER TYMS

A cura della Dott.ssa Valeria Conti

La capecitabina (Xeloda, Roche) è un pro farmaco attivato a 5-fluorouracile (5-FU) comunemente utilizzato nei pazienti con cancro del colon-retto (CRC). Circa un terzo di pazienti trattati con capecitabina manifesta una tossicità dose-dipendente correlata a un tasso di mortalità pari all'0,5-2% sia in regime di monoterapia, che di combinazione. Le reazioni avverse più comuni della capecitabina sono la sindrome mani-piedi (*hand-foot syndrome*, HFS) e la diarrea. Altre manifestazioni di tossicità sono rappresentate da neutropenia e trombocitopenia, oltre nausea, vomito, mucositi e stomatiti. Differenze nelle manifestazioni di tossicità osservate tra i pazienti possono essere spiegate da fattori clinici, come l'età, il genere e la pratica clinica, ma una parte rilevante di tale variabilità rimane tuttora sconosciuta. Dopo assorbimento nello stomaco, la capecitabina è parzialmente convertita a 5-FU nel fegato e, di seguito, convertita a 5-FU nel sito CRC. La maggior parte di 5-FU è degradata nel fegato dalla diidropirimidina deidrogenasi (DPYD) e la parte restante è attivata nel sito del tumore, dove svolge la sua azione citotossica inibendo la sintesi di DNA attraverso la competizione con i precursori nucleotidici per il legame con la timidilato sintasi (TYMS). Sono stati condotti diversi studi sulla tossicità correlata al 5-FU e altrettanti biomarcatori genetici polimorfici sono stati proposti essere coinvolti in tale processo. Tra questi, due polimorfismi nel locus TYMS e due varianti più rare nel gene DPYD. Insieme queste varianti sono potenzialmente utili, ma non abbastanza predittive della tossicità osservata nella pratica clinica. In questo studio sono stati analizzati venticinque geni candidati che agiscono nel *pathway* 5-FU/capecitabina per la ricerca di nuovi polimorfismi associati alla tossicità da capecitabina.

La popolazione analizzata in questo studio era quella del trial clinico QUASAR2 (<http://www.octoxford.org.uk/alltrials/> in followup/q2.html; http://www.controlled-trials.com/ISRCTN_45133151/), uno studio randomizzato e controllato di fase III sulla capecitabina ± bevacizumab in pazienti con carcinoma del colon-retto di stadio II/III sottoposti a intervento chirurgico. Per ciascun paziente sono stati collezionati i dati sulle manifestazioni di tossicità come diarrea, nausea e vomito, mucositi/stomatiti, neutropenia, trombocitopenia e HSF. I dati di tossicità individuale e globale sono stati analizzati seguendo due approcci: 1) una classificazione binaria di tossicità di grado basso (grado 0-2) contro una tossicità alta e limitante la dose di farmaco (grado 3-4) e 2) una misura quantitativa della tossicità. La genotipizzazione è stata effettuata su 940 pazienti dello studio QUASAR2 mediante la tecnologia *Illumina tagging SNP Array*. Per ciascuno dei venticinque geni coinvolti nel *pathway* 5-FU/capecitabina, gli autori hanno identificato varianti genetiche presenti in un intervallo di 25kb su entrambi i lati della regione codificante dell'isoforma più lunga di ciascun gene. Nei loci con varianti associate in maniera rilevante alla tossicità, è stato eseguito uno screening in una regione più ristretta di 1,5Mb. Infine, è stato eseguito il sequenziamento di ampliconi nelle regioni codificanti i geni DPYD e TYMS su 100 pazienti con tossicità di grado 3 e 4 per la diarrea e altri tipi di tossicità nei primi quattro cicli di trattamento. Altri 100 pazienti che non avevano manifestato reazioni tossiche per l'intero ciclo di trattamento sono stati analizzati come controllo.

Considerati i criteri di esclusione, sono stati genotipizzati 940 pazienti con la tecnica *Genome wide* e 968 pazienti con l'*Exome array*. Attraverso i due tipi di array, sono state identificate 1456 varianti genetiche che mappavano all'interno di 25 kb dei geni candidati coinvolti nel *pathway* 5-FU/capecitabina. Questo studio ha portato all'identificazione di due nuove varianti (rs12022243 and rs12132152) nel gene DPYD correlate a tossicità da capecitabina. La tossicità associata allo SNP rs12022243 aveva una frequenza pari allo 0,22 ed era associata a un rischio moderato di tossicità nelle manifestazioni di HSF e diarrea. La variante rs12132152 era meno comune, ma non rara (frequenza=0,03) e con un effetto sul rischio tossicità superiore alla

precedente. Mediante il sequenziamento dei pazienti con alto grado di tossicità, gli autori hanno identificato una terza variante nel gene DPYD (Ala551Thr), che è causa del deficit di diidropirimidina quando presente in forma omozigote, o, in eterozigosi, quando associata ad altre varianti. Il ritrovamento di questa variante genetica in un paziente con neutropenia e trombocitopenia di grado 4 ha fornito una prova ulteriore della relazione tra tale variante e l'incremento del rischio di tossicità da 5-FU nei pazienti eterozigoti.

Sette su dodici individui portatori di tale polimorfismo avevano manifestato una tossicità da capecitabina di grado 3, tanto grave da ridurre le dosi di farmaco. Tuttavia, la ragione per cui 5/12 pazienti non avevano sviluppato una tossicità clinicamente rilevante non è stata chiarita.

Il dato più interessante di questo studio riguarda un nuovo SNP (rs2612091) correlato a tossicità da capecitabina e situato nell'introne del gene ENOSF1 a valle del gene per la TYMS. Questo polimorfismo sembrava spiegare sia la tossicità 5-FU/capecitabina, sia quella correlata ai già noti polimorfismi identificati nel gene TYMS (5'VNTR 2R/3R e 3'UTR 6bp ins-del), a loro volta associati a cambi di espressione (sia di mRNA, che proteina) della TYMS. I risultati presentati in questo studio mostrano, invece, una correlazione tra lo SNP rs2612091 e i cambi di espressione di ENOSF1 e non di TYMS, suggerendo l'esistenza di un *linkage disequilibrium* tra le varianti a carico del TYMSF e la variante ENOSF1. Per questo, gli autori hanno ipotizzato che la nuova variante rs2612091 non agisca deprimendo l'espressione del trascritto TYMS. Tuttavia, è stato ipotizzato che la proteina ENOSF1 influenza l'attività della TYMS e questo potrebbe spiegare il meccanismo di tossicità ad essa correlato.

In conclusione, questo studio ha permesso di identificare quattro nuove varianti associate a tossicità da capecitabina. In particolare, i risultati relativi ai loci TYMS e ENOSF1, se confermati, potrebbero portare alla messa a punto di un test che includa: 1) lo screening dei polimorfismi rari del DPYD già noti essere responsabili di tossicità severa e 2) un test addizionale per analizzare queste nuove varianti correlabili al rischio di tossicità clinicamente rivelabile.

Parole chiave: Cancro del colon-retto, ENOSF1, DPYD, TYMS, tossicità, capecitabina

Riferimento bibliografico

[Rosmarin D](#) et al. *Gut* 2014 Mar [Epub ahead of print].

INFETTIVOLOGIA

STUDIO DI ASSOCIAZIONE *GENOME-WIDE* DI FARMACOCINETICA DI ATAZANAVIR E IPERBILIRUBINEMIA (AIDS CLINICAL TRIALS GROUP PROTOCOL A5202)

A cura della Dott.ssa Stefania Cheli

L'iperbilirubinemia associata al trattamento con l'atazanavir può causare l'interruzione prematura del farmaco e la prevenzione della sua prescrizione. L'atazanavir subisce il metabolismo di fase I del citocromo epatico P450(CYP)3A ed è un substrato per i trasportatori di membrana: P-glicoproteina (codificata da ABCB1), proteine associate alla multiresistenza (MRP, codificate da geni ABCC) e polipeptidi di trasporto di anioni organici (OATPs, codificati da SLCO). Studi gene candidato, condotti principalmente su pazienti trattati con atazanavir *unboosted* (non potenziato), hanno suggerito un'associazione tra la farmacocinetica di atazanavir e i polimorfismi nei geni ABCB1, CYP3A5, e NR1H2 (che codifica per il recettore X pregnano). L'esposizione plasmatica ad atazanavir è influenzata anche da fattori non genetici, tra cui: la cosomministrazione con altri farmaci antiretrovirali, rifampicina, antiacidi. Variazioni interindividuali nelle concentrazioni plasmatiche di bilirubina indiretta sono state associate con la ripetizione in tandem (del dinucleotide TA) nel promotore del gene UGT1A1. Questo studio si è avvalso di un approccio *genome-wide*

per valutare le associazioni genetiche e non-genetiche con l'iperbilirubinemia e caratterizzare i fattori genetici predittivi della concentrazione plasmatica di atazanavir.

Il gruppo sperimentale, AIDS *Clinical Trials Group protocol A5202* (ClinTrials.gov NCT00118898), è uno studio di fase IIIb di equivalenza che prevede quattro regimi terapeutici, una volta al giorno, per il trattamento iniziale dell'infezione da HIV-1 (dati dello studio già pubblicati). In breve, pazienti arruolati dal 2005 al 2007 sono stati randomizzati in *open-label*, con atazanavir/ritonavir (300/100 mg) o efavirenz (600 mg), in associazione ad abacavir/lamivudina (600/300 mg) o tenofovir DF/emtricitabina (300/200 mg). Per ogni paziente è stata valutata la bilirubina indiretta e l'emoglobina ai seguenti tempi: prima dell'ingresso, al momento dell'inclusione nello studio, alle settimane 4, 8, 16, e 24 e quindi per ogni 12 settimane successive fino a quando l'ultimo partecipante reclutato è stato seguito per 96 settimane.

L'atazanavir è stato quantificato mediante cromatografia liquida a fase inversa ad alta prestazione. L'atazanavir è stato separato mediante colonne "Waters 5- μ m Symmetry shield RP C8, 3-150mm" con un sistema cromatografico costituito da un modulo di separazione (Waters 2695 Alliance) ed un rivelatore a serie di fotodiodi (Waters® PDA 996) (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA). Il sistema è stato controllato dal software Waters Empower 2 versione 6.20.00.00, che ha raccolto tutti i dati cromatografici per l'analisi, generando una curva standard di calibrazione lineare da 100 a 16.000 ng/ml.

L'analisi farmacocinetica di popolazione è stata effettuata utilizzando i campioni raccolti allo stato stazionario durante le prime 24 settimane di terapia. I dati di concentrazione-tempo sono stati analizzati utilizzando il metodo di stima "First Order Conditional" (FOCE-I) e con il programma NONMEM per la modellistica non lineare a effetti misti (versione VII; ICON, Ellicott City, Maryland, USA). Sono stati testati i modelli a uno e due compartimenti. Sulla base della bontà dell'adattamento è stato scelto il modello a singolo compartimento, con assorbimento ed eliminazione di primo ordine. I parametri farmacocinetici di popolazione includono la clearance, il volume di distribuzione e la costante di velocità di assorbimento.

Il consenso per le analisi genetiche è stato ottenuto secondo i criteri del ACTG (AIDS Clinical Trials Group) protocol A5128. L'approvazione alle analisi genetiche è stata data da "Vanderbilt Institutional Review Boards" e ACTG. Dati di genotipizzazione *genome-wide*, ottenuti mediante piattaforma Illumina Human-1M-Duo, erano disponibili grazie ad un altro studio di immunogenomica. Le analisi statistiche sono state effettuate mediante software PLINK versione 1.07. Le analisi nelle tre popolazioni (Afro-americani, Europei, Ispanici) sono state condotte sia singolarmente che in maniera combinata. Solo i polimorfismi che hanno avuto un'efficienza di genotipizzazione del 98% e con frequenza dell'allele minore superiore al 2%, sono stati inclusi nell'analisi. Test di associazione. Le associazioni genetiche sono state valutate utilizzando il Test di Wald non corretto, così come un modello di regressione lineare aggiustato per le covariate che nell'analisi univariata avevano mostrato un $p < 0.05$. Il picco di bilirubinemia è stato definito come la più alta concentrazione ottenuta durante le prime 24 settimane di prescrizione di atazanavir/ritonavir. Nello studio *genome-wide*, sono stati scelti a priori 13 polimorfismi funzionali presenti nei geni coinvolti nella biodisponibilità di atazanavir (CYP3A4, CYP3A5, ABCB1, SLCO1B1, ABCC1, ABCC2, e NR1I2) selezionati da PharmGKB e da studi di farmacogenetica riportati in letteratura. Sono stati scelti a priori anche 27 polimorfismi precedentemente associati con il metabolismo della bilirubina. Le analisi statistiche non genetiche sono state effettuate utilizzando il software R versione 2.15.0, con test a due code per p-values e intervalli di confidenza, senza correzione per confronti multipli. Dopo correzione per Bonferroni la significatività è risultata 5.0×10^{-8} . Per i 13 polimorfismi presenti nei geni coinvolti nella biodisponibilità di atazanavir e nei 27 geni associati al metabolismo della bilirubina, la soglia di p-values corretta per il test di Bonferroni è risultata 0,0038 e 0,0019 rispettivamente; per l'analisi combinata dei tre gruppi etnici di 0,0013 e 0,00062.

Dei 928 soggetti del protocollo A5202, randomizzato per regimi contenenti atazanavir, erano note: le concentrazioni plasmatiche di atazanavir per 815 pazienti, i dati dello studio *genome-wide* per 542 soggetti di cui 475 (88%) con i dati sulla clearance stimata di atazanavir e le covariate rilevanti. Le concentrazioni relative al picco di bilirubina e le covariate rilevanti erano disponibili solo per 443 partecipanti.

Associazioni con la farmacocinetica di atazanavir. Nessun polimorfismo è stato associato significativamente con la *clearance*, a livello *genome-wide* (soglia di significatività $p\text{-value} = 5,0 \times 10^{-8}$, visti i 925.738 test effettuati), sia considerando ogni popolazione separatamente che in un'analisi combinata comprendente tutte e tre le popolazioni. Inoltre fra i polimorfismi con il p-value più basso nella popolazione combinata, nessuno era localizzato in un gene rilevante per la farmacocinetica. Dei 13 polimorfismi

selezionati a priori per una possibile associazione con la *clearance* di atazanavir solo rs4149056 in SLCO1B1 ($b = -0,089$, $p = 0,049$) e rs776746 in CYP3A5 ($b = 0,076$, $P = 0,097$) mostrano un trend di associazione nell'analisi combinata dei tre gruppi etnici.

Associazioni con le concentrazioni di bilirubina indiretta. Dall'analisi *genome-wide*, combinata per i tre gruppi etnici, 10 polimorfismi localizzati nella regione genomica del UGT1A1 sono risultati associati con i livelli basali di bilirubina indiretta a livello *genome-wide*. L'associazione più significativa è stata trovata con il polimorfismo rs6742078 ($P = 1,8 \times 10^{-9}$, $b = 0,30$ mg/dl/T allele). Nell'analisi *genome-wide* multivariata un'associazione significativa con il picco di concentrazione della bilirubina indiretta nella popolazione globale è risultata per 10 polimorfismi localizzati nella regione genomica del UGT1A1, con il polimorfismo rs887829 risultato più significativo. In questa analisi, il picco di concentrazione della bilirubina è risultato associato all'allele T del polimorfismo rs887829 ($p = 6,4 \times 10^{-12}$, $b = 0,30$ mg/dl/T allele), ad una maggiore concentrazione basale di bilirubina ($p = 6,7 \times 10^{-12}$, $b = 0,22$), una più lenta *clearance* stimata [$p = 8,6 \times 10^{-11}$, $b = -0,51$ (mg/dl)/ (l/h)] ed una maggiore concentrazione di emoglobina basale [$p = 4,9 \times 10^{-13}$, $b = 0,098$ (mg/dl)/ (g/dl)].

Predizione del picco di bilirubina nel trattamento. L'associazione tra livelli di picco di bilirubina superiori a 3,0 mg/dl, e il genotipo rs887829 è stata considerata in relazione ai livelli basali di bilirubina di 0,5 mg/dl e di emoglobina di 14 g/dl. Per picchi di bilirubina superiori a 3,0 mg/dl (soglia di concentrazione approssimativa a cui compare ittero evidente clinicamente), il valore predittivo positivo di un livello basale di bilirubina di 0,5 mg/dl o superiore con concentrazioni di emoglobina di 14 g/dl o superiore, era 0,51 (95% CI 0,40-0,57); il valore predittivo positivo aumenta a 0,85 (95% CI 0,65-0,96) in presenza di omozigosi TT per il polimorfismo rs887829. Al contrario, per livelli di picco di bilirubina di 3,0 mg/dl o inferiori, il valore predittivo positivo di un livello basale di bilirubina inferiore a 0,5 mg/dl con una concentrazione di emoglobina basale inferiore a 14 g/dl, era 0,91 (95% CI 0,88-0,95). Tale valore aumenta a 0,96 (95% CI 0,88-0,99) quando nell'analisi in presenza di omozigosi CC per il polimorfismo rs887829. Il modello multivariato che include tutte le quattro variabili (genotipo rs887829 UGT1A1, la concentrazione basale di bilirubina e di emoglobina, e la *clearance* stimata dell'atazanavir) spiega il 41,3% della variabilità del picco di bilirubina indiretta durante il trattamento.

Questo studio non ha replicato le associazioni precedentemente riportate e non ha identificato nuove associazioni genetiche tra polimorfismi nei geni candidati per la biodisponibilità di atazanavir o nello studio *genome-wide* con la farmacocinetica di atazanavir.

In sintesi, il picco delle concentrazioni plasmatiche di bilirubina indiretta durante le prime 24 settimane di terapia è associato al polimorfismo rs887829 nel gene UGT1A1, alle concentrazioni basali di bilirubina ed emoglobina, e alla *clearance* dell'atazanavir.

Conflitti d'interesse: alcuni autori hanno ricevuto finanziamenti da ditte farmaceutiche.

Parole chiave: atazanavir, farmacocinetica, *genome-wide*, UGT1A1, iperbilirubinemia.

Riferimento bibliografico

[Johnsna DH](#) et al. *Pharmacogenet Genomics* 2014, 24(4):195-203.

ASSOCIAZIONE DEI POLIMORFISMI DI NAT2, GST E CYP2E1 CON EPATOTOSSICITÀ INDOTTA DA FARMACI ANTITUBERCOLARI

A cura della Dott.ssa Eleonora Turrini

In India è stato fondato dal governo nel 1992 un comitato esperto per la revisione del Programma Nazionale Tubercolosi, data l'elevata incidenza della patologia nella popolazione, al fine di ottenere una migliore classificazione dei pazienti integrando un nuovo regime terapeutico (DOTS, *Directly Observed Treatment-Short Course*). DOTS vuole garantire un corretto utilizzo dei farmaci antitubercolari (isoniazide, rifampicina, pirazinamide, etambutolo e streptomina) ed una adeguata supervisione del paziente per rendere il

programma più efficace. La gestione della patologia incontra problemi quali farmacoresistenza, immunodeficienza acquisita, epatotossicità indotta da farmaci antitubercolari (ATDH), problematiche che complicano notevolmente l'aderenza alla terapia, che è fondamentale per curare pazienti con tubercolosi attiva. L'isoniazide è il farmaco antitubercolare che induce maggiormente epatotossicità. Nel fegato l'isoniazide è metabolizzata da N-acetiltransferasi 2 (NAT2), per ottenere acetilisoniazide, che subisce idrolisi a acetilidrazina che a sua volta è ossidata dal citocromo CYP2E1, dando origine al metabolita epatotossico. NAT2 è un gene altamente polimorfo e i vari SNPs contribuiscono ad alterazioni nella sua attività. Il differente fenotipo dà origine a tre gruppi di acetilatori: rapidi, intermedi e lenti. Evidenze contraddittorie sono presenti in letteratura riguardo all'appartenenza a uno dei gruppi di acetilazione e sviluppo di ATDH: alcuni associano ATDH agli acetilatori lenti, mentre altri studi ad acetilatori rapidi, alcuni non rilevano alcuna associazione e, da una recente meta-analisi, un ruolo sembra essere attribuito alle mutazioni di NAT2. Un importante ruolo nella detossificazione è giocato dalle varie isoforme della glutatione S-transferasi (GSTs), che catalizzano la coniugazione dei gruppi sulfidrilici degli intermedi epatotossici, promuovendone l'eliminazione. L'assenza di attività di GST dovuto alla mutazione nulla in due dei suoi loci, GSTT1 e GSTM1, può portare all'accumulo di intermedi epatotossici. Infine, il CYP2E1 epatico è responsabile dell'attivazione di molti cancerogeni, quindi c'è interesse nel capire se SNPs in CYP2E1*5B possano predisporre a disturbi epatici o a tumori. Viste queste premesse, scopo del presente lavoro è stato quello di verificare il ruolo di polimorfismi in NAT2, GSTM1 e GSTT1 e CYP2E1*5B nella predisposizione, dei pazienti affetti da tubercolosi e soggetti a terapia con antitubercolari, a sviluppare ATDH in una coorte etnicamente ben caratterizzata di pazienti indiani.

408 pazienti di etnia indiana affetti da tubercolosi sono stati arruolati nello studio tra il 2008 e il 2010 dal centro DOTS Rampur Bushar. In seguito alla diagnosi di tubercolosi, secondo i definiti parametri clinici, un severo criterio di esclusione è stato adottato nella provenienza geografica della popolazione che doveva risiedere in quell'area da almeno 3 generazioni. I pazienti non avevano storie di alcolismo abituale o patologie croniche al fegato e pazienti affetti da HIV sono stati esclusi. I criteri di consenso internazionale definiscono ATDH come la presenza di livelli almeno due volte superiori al limite massimo di alanina aminotransferasi (ALT) e aspartato aminotransferasi (AST). Prima dell'inizio del trattamento farmacologico sono stati monitorati per tutti i 408 pazienti i livelli di ALT e AST. Dopo i test iniziali, i livelli ALT e AST sono stati misurati al termine della fase intensiva di trattamento o, prima, nel caso in cui il paziente manifestasse malessere e sintomi quali perdita dell'appetito, nausea, vomito, febbre, ittero. Questi sintomi sono stati riscontrati nei 17 pazienti, che sono risultati affetti da ATDH, entro 3 settimane dall'inizio del trattamento antitubercolare.

Il 4.20% dei pazienti è risultato essere affetto da ATDH e la distribuzione del sesso tra il gruppo che ha sviluppato ATDH e quello che non l'ha sviluppata è risultata paragonabile (38% donne nel gruppo ATDH e 35% in quello non-ATDH). I livelli di ALT e AST erano paragonabili nei due gruppi prima del trattamento farmacologico e significativamente più alti nel gruppo dei pazienti affetti da ATDH. Nessun caso di mortalità si è verificato nel gruppo ATDH e tutti i 17 pazienti hanno completato il trattamento farmacologico e non hanno manifestato recidive. Nel gruppo non-ATDH l'1.5% ha avuto ricadute mentre il 2.30% dei pazienti è andato incontro a fallimento terapeutico.

Il fenotipo di NAT2 corrispondente all'acetilatore lento è stato identificato come un fattore di rischio per lo sviluppo di ATDH ($P = 0.01$) rispetto al fenotipo di acetilatore rapido. Gli SNPs di NAT2 analizzati sono stati NAT2*5 (rs1799929, 481C/T), NAT2*6 (rs1799930, 590G/A) e NAT2*7 (rs1799931, 857G/A). Gli aplotipi acetilatore lento $C_{481}A_{590}G_{857}$ ed intermedio $T_{481}A_{590}G_{857}$ sono risultati entrambi correlati in modo significativo a ATDH ($P < 0.01$). Il genotipo nullo per entrambi GSTM1 e GSTT1 è allo stesso modo risultato associato allo sviluppo di ATDH ($P = 0.03$) ed anche il genotipo eterozigote per CYP2E1 si è visto contribuire all'elevato rischio di sviluppare ATDH ($P = 0.04$).

In conclusione, lo studio dimostra il ruolo giocato dal genotipo e dall'aplotipo di NAT2, che caratterizzano un acetilatore lento, nello sviluppo di ATDH. Allo sviluppo di questa epatotossicità farmaco-indotta contribuiscono anche il genotipo nullo per entrambi i loci di GST, GSTM1 e GSTT1, e la presenza dell'allele polimorfo in CYP2E1*5B.

In un paese in via di sviluppo come l'India, dove risiedono 1/5 dei casi di tubercolosi globali, la strategia DOTS è in espansione con un crescente successo nel trattamento di questa patologia con conseguente riduzione del tasso di mortalità. La gestione di fattori che possono contribuire, in modo diretto o indiretto, al fallimento della terapia antitubercolare ed il monitoraggio precoce dei pazienti, il cui genotipo ed aplotipo li rende maggiormente suscettibili agli effetti collaterali, potrebbe aiutare a prevenire mortalità e morbidità provocate dagli effetti avversi della terapia, migliorando *compliance* e gestione della patologia.

Parole chiave: tubercolosi, NAT2, GSTs, CYP2E1, epatotossicità indotta da farmaci antitubercolari (ATDH)

Riferimento bibliografico

[Singla N](#) et al. *Tuberculosis* 2014 Feb 15 [Epub ahead of print].

AUTOIMMUNITA'

MANCATA VALIDAZIONE DI VARIANTI GENICHE ASSOCIATE ALLA RISPOSTA TERAPEUTICA CON INIBITORI DEL FATTORE DI NECROSI TUMORALE IN PAZIENTI AFFETTI DA ARTRITE REUMATOIDE: REPLICAZIONE DI UNO STUDIO *GENOME-WIDE* E META-ANALISI

A cura della Dott.ssa Sarah Cargnin

L'artrite reumatoide è una malattia autoimmune sistemica e disabilitante, caratterizzata dall'infiammazione cronica delle articolazioni sinoviali. La recente introduzione in terapia degli inibitori del fattore di necrosi tumorale (TNFi) ha apportato un miglioramento dell'esito del trattamento, riducendo l'entità dell'infiammazione sinoviale e della degenerazione dei tessuti articolari. È, tuttavia, clinicamente rilevante sottolineare come una consistente percentuale di pazienti non risponda adeguatamente al trattamento con TNFi. Numerosi studi di farmacogenetica hanno evidenziato associazioni plausibili tra alcune varianti geniche e la risposta alla terapia con TNFi, suggerendo un possibile ruolo della variabilità genetica individuale nel modulare la risposta al trattamento farmacologico. Nello specifico, uno studio di associazione *genome-wide* (GWAS) ha individuato una correlazione tra varianti nei geni PDZD2 (rs1532269), EYA4 (rs17301249) e nelle regioni intergeniche dei cromosomi 1 e 12 (rispettivamente, rs12081765 e rs7305646) con la risposta alla terapia con TNFi in pazienti caucasici affetti da artrite reumatoide (Plant et al. *Arthritis Rheum* 2011, 63:645-653). Due GWAS successivi non hanno tuttavia confermato l'associazione di queste 4 varianti polimorfiche (Krintel et al. *Pharmacogenet Genomics* 2012, 22:577-589; Umičević et al. *Ann Rheum Dis* 2013, 72:1375-138). Obiettivi di questo studio: a) verificare la correlazione tra le varianti rs1532269, rs17301249, rs12081765, rs7305646 e la risposta alla terapia con TNFi in un'ampia coorte di pazienti spagnoli affetti da artrite reumatoide; b) condurre una meta-analisi degli studi finora condotti al fine di chiarire il ruolo delle suddette varianti geniche.

Lo studio è stato condotto su due coorti di pazienti spagnoli (*coorte esplorativa*: N=438; *coorte di replicazione*: N=196), affetti da artrite reumatoide ed in trattamento con TNFi, quali infliximab, adalimumab ed etanercept. La risposta al trattamento con TNFi è stata valutata, a 6 e a 12 mesi di follow-up, tramite le scale *Disease Activity Score* a 28 punti (DAS28) ed *European League Against Rheumatism response criteria* (EULAR). Il DNA genomico è stato estratto da linfociti periferici o da saliva mediante procedure standard. La genotipizzazione delle varianti rs1532269, rs17301249, rs12081765 e rs7305646 è stata effettuata mediante multiplex PCR nei pazienti appartenenti alla coorte esplorativa. Nella coorte di validazione la genotipizzazione dei medesimi polimorfismi è avvenuta tramite RealTime PCR. L'analisi combinata dei dati riportati in letteratura e di quelli ottenuti in questo studio è stata effettuata mediante l'utilizzo del *modello a effetti fissi di Mantel-Haenszel* oppure, in caso di eterogeneità tra gli studi, del modello ad effetti random di DerSimonian-Laird. Nella metanalisi, il livello di significatività statistica è stata posta a $P < 5 \times 10^{-8}$.

Coorte esploratoria: Nessuno degli SNPs analizzati risulta essere statisticamente associato alla risposta al trattamento con TNFi valutata tramite la scala DAS28, sia a 6 mesi (rs12081765: P =0.570; rs1532269: P =0.831; rs17301249: P =0.181; rs7305646: P =0.244) che a 12 mesi dall'inizio del trattamento (rispettivamente: P =0.716, P =0.647, P =0.416 e P =0.182). Non emerge, inoltre, nessuna correlazione tra le quattro varianti geniche studiate e la risposta al trattamento (a 6 e a 12 mesi) definita secondo i criteri EULAR.

Coorte di replicazione: Nessuna delle varianti analizzate risulta essere correlata con la risposta al trattamento valutata a 6 mesi, sia tramite la scala DAS28 (rs12081765: P =0.995; rs1532269: P =0.830; rs17301249: P =0.458; rs7305646: P =0.661) che mediante i criteri EULAR. Solo la variante rs1532269 risulta essere associata alla risposta alla terapia con TNFi, misurata a 12 mesi dall'inizio del trattamento, per mezzo della scala DAS28 (P=0.022). Tale associazione perde però la significatività statistica in seguito a correzione per test multipli di Benjamini-Hochberg.

Meta-analisi: Quattro studi sono stati inclusi nella meta-analisi (Krintel et al, 2012; Umicevic et al, 2013; Plant et al, 2011; presente studio), per un totale di 2998 pazienti affetti da artrite reumatoide ed in trattamento con TNFi [potenza superiore al 90% nell'individuare una differenza maggiore di 0,6 unità della scala DAS28, con una significatività statistica *genome-wide* di $P \leq 5.0 \times 10^{-8}$ e con una frequenza allelica $\geq 10\%$]. I dati relativi alla risposta a TNFi valutata a 14 settimane tramite scala DAS28 (Krintel et al, 2012; Umicevic et al, 2013) sono stati statisticamente combinati con quelli relativi alla risposta definita a 24 settimane mediante i medesimi criteri (Plant et al, 2011; presente studio). Dall'analisi quantitativa è emerso un trend di associazione tra la variante rs1532269 e la risposta al trattamento con TNFi (modello ad effetti fissi: $P= 0.0033$; $\beta= 0.107$). Si evidenzia, inoltre, la presenza di eterogeneità tra gli studi inseriti per le varianti rs17301249, rs12081765 ed rs7305646 (Cochran's Q-statistic $P < 0.05$, $I^2 > 40\%$).

Il presente studio di replicazione non conferma l'esistenza di correlazione tra le varianti rs1532269, rs17301249, rs12081765, rs7305646 e la risposta alla terapia con inibitori del fattore di necrosi tumorale, in una coorte di pazienti spagnoli affetti da artrite reumatoide.

È, tuttavia, possibile che la mancata replicazione di tale associazione, nel presente studio ed in studi precedenti (Krintel et al, 2012; Umicevic et al, 2013), sia attribuibile ad alcune differenze nelle caratteristiche cliniche tra i pazienti arruolati. A tale proposito è innanzitutto rilevante evidenziare come la risposta al trattamento con TNFi sia stata valutata a 6 mesi dall'inizio della terapia in due studi (Plant et al, 2011; presente studio), mentre sia stata definita a 14 settimane nei restanti due GWAS inclusi nella meta-analisi (Krintel et al, 2012; Umicevic et al, 2013). Emerge, inoltre, come l'associazione statisticamente più significativa tra le quattro varianti in analisi e la risposta a TNFi sia stata riscontrata solo nella *coorte esploratoria* dello studio di Plant et al del 2011. La rimozione di tale coorte dalla meta-analisi, condotta nel presente studio, determina una riduzione significativa dell'eterogeneità tra gli studi, suggerendo la possibile presenza, nei pazienti appartenenti a quella coorte, di specifiche variabili cliniche in grado di influenzare significativamente la risposta al trattamento con TNFi. In conclusione, dai risultati ottenuti dal presente studio di validazione e da quelli emersi dalla meta-analisi, si evince che i polimorfismi rs1532269, rs17301249, rs12081765 ed rs7305646 non possono essere considerati validi fattori predittivi della risposta alla terapia con TNFi in pazienti affetti da artrite reumatoide.

Parole chiave: TNFi, artrite reumatoide, rs1532269, rs17301249, rs12081765, rs7305646

Riferimento bibliografico

[Marquez A](#) et al. *Arthritis Research & Therapy* 2014, 16:R66

LA METANALISI DEL MESE

POLIMORFISMI DELLE PROTEINE DI TRASFERIMENTO DEL COLESTEROLO ESTERIFICATO, USO DELLE STATINE E IL LORO IMPATTO SUI LIVELLI DI COLESTEROLO ED EVENTI CARDIOVASCOLARI

A cura della Dott.ssa Virginia Paribello

L'azione principale delle statine è quella di ridurre i livelli delle lipoproteine a bassa densità di colesterolo (LDLc) nel sangue, riducendo così il rischio di eventi cardiovascolari. Il trattamento con statine si è dimostrato efficace nel ridurre il rischio di eventi coronarici maggiori e conseguente mortalità (riduzioni medie del rischio del 27% e del 15%, rispettivamente). La proteina di trasferimento degli esteri del colesterolo (CETP) trasferisce gli esteri del colesterolo da HDL alle particelle contenenti apolipoproteine B in cambio di trigliceridi riducendo i livelli di HDLc. Nel 1989 vari SNPs in CETP sono stati associati ai livelli di HDLc (Brown ML et al. *Nature* 1989, 342:448-51) e recentemente una metanalisi ha confermato questa associazione (Teslovich TM et al. *Nature* 2010, 466:707-13). Quindi, tali varianti influenzano il rischio di coronaropatia (Boekholdt SM et al. *Circulation* 2005, 111:278-87). Nel 1998, Kuivenhoven et al. hanno osservato che il polimorfismo Taq1B (rs708272) localizzato nella regione esonica a valle dell'introne 1 in CETP ritarda la progressione dell'aterosclerosi coronarica in pazienti trattati con statine (N Eng J Med 1998, 338:86-93). Tuttavia gli studi successivi non hanno confermato questo risultato e quindi non ci sono ad oggi risultati sufficienti che possano confermare che la variante Taq1B alteri la funzionalità di CETP. Recentemente Papp et al. (*PLoS ONE* 2012, 7:e31930) hanno evidenziato tre varianti genetiche localizzate 2,5-7 kb a monte del sito trascrizionale (rs173539, rs247616 e rs3764261), che sono in forte *linkage disequilibrium* (LD) fra loro e che riducono l'espressione di mRNA-CETP nel fegato umano. Inoltre è stato recentemente dimostrato che due polimorfismi localizzati nell'introne 8 ed esone 9 (rispettivamente rs9930761 e rs5883) aumentano la formazione di una variante di splicing $\Delta 9$, secreta in maniera non efficiente dagli epatociti in circolo (Lira ME et al. *J Lipid Res* 2008, 49:1955-62).

Sulla base di questi dati gli autori del presente studio hanno valutato se le tre varianti funzionali rs3764261, rs5883 e rs9930761 in CETP modificano l'efficacia del trattamento con statine, in termini di cambiamenti nei livelli di colesterolo e riduzione del rischio di infarto del miocardio (MI) in un'ampia popolazione proveniente da diversi studi europei.

L'effetto del genotipo di CETP sui livelli delle lipoproteine ad alta densità del colesterolo (HDLc), delle lipoproteine a bassa densità di colesterolo (LDLc) e sul colesterolo totale durante trattamento con statine è stato valutato in una metanalisi di tre studi (in totale 11.021 pazienti in studio): il *Genetics of Diabetes Audit and Research Tayside (Go-DARTS) study*, il *PREVEND Intervention Trial (PREVEND-IT) study* e *An Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin (JUPITER) study*. L'effetto dei tre polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) sulla risposta alle statine nella protezione contro MI è stato valutato in una metanalisi di cinque studi (in totale 16.570 pazienti in studio): Go-DARTS, PREVEND-IT, French Registry of Acute ST-Elevation and Non-ST-Elevation Myocardial Infarction study (FAST-MI), Prevention of Renal and Vascular Endstage Disease study (PREVEND) e Utrecht Cardiovascular Pharmacogenetics study (UCP).

Lo SNP rs3764261 è risultato significativamente correlato all'aumento dei livelli di HDLc di 0,02 mmol/l per T allele ($P=6 \times 10^{-5}$). Lo studio dimostra che nei portatori della variante T rs3764261 aumentano maggiormente i livelli di HDLc durante il trattamento con statine ma risulta essere ridotta la protezione contro MI rispetto ai non portatori (OR=1.19 per T allele, $P=0.04$). Non sono stati evidenziati effetti significativi per gli altri due SNPs sui livelli di colesterolo e per il rischio di MI. Questi risultati potrebbero essere spiegati per la minore frequenza di questi SNPs nei pazienti (8% e 7% per rs9930761 e rs5883, rispettivamente) che determina una riduzione della potenza statistica dello studio, ma i dati sugli effetti di queste varianti su HDLc e LDLc in Go-DARTS e JUPITER confermano questa non significatività. In sintesi, l'allele T in rs3764261, SNP funzionale nella regione enhancer di CETP legato all'espressione di bassi livelli di mRNA-CEPT, è risultato associato, in trattamento con statine, alle variazioni dei livelli di colesterolo, all'aumento dei livelli di HDLc, ma non presenta effetti significativi su LDLc. Per gli altri due SNPs, che influenzano lo splicing di CETP, non sono stati evidenziati effetti importanti sulle variazioni dei livelli di colesterolo o di altri valori clinici.

I risultati di questo studio dimostrano che le varianti genetiche associate a diminuzione di attività di CETP e ai livelli di mRNA, in trattamento con statine, mostrano una ridotta protezione contro gli eventi cardiovascolari. Anche Papp et al. (*PLoS ONE* 7, e31930-2012) nel loro studio mostrano che le varianti genetiche diminuiscono i livelli di mRNA-CETP, aumentano la produzione della variante $\Delta 9$ di splicing meno efficace, aumentano HDLc ma aumentano il rischio di MI, di ictus e di morte nei pazienti ipertesi a rischio. Ad ulteriore conferma di questi dati, in donne caucasiche è stato osservato che la variante Ile405Val SNP in CETP (rs5882), in moderato LD ($r^2=0,46$) con rs3764261, aumenta i livelli di HDLc, ma nei portatori si evidenzia un rischio significativamente più alto di cardiopatia ischemica (Agerholm-Larsen, B., et al. *Circulation* 101, 1907-1912-2000). Inoltre, in un ampio studio in cui il trattamento con sola simvastatina è stata confrontata con l'associazione simvastatina/torcetrapib, inibitore di CETP, l'associazione torcetrapib/statina ha mostrato un maggiore rischio di eventi cardiovascolari (hazard ratio=1,25), rispetto a trattamento con sola simvastatina, pur aumentando HDLc del 72.1% e riducendo LDLc del 24,9 % (Barter, P.J. et al.; ILLUMINATE Investigators. *N.Eng.J.Med.* 357, 2109-2122- 2007). Ciò suggerisce che bassi livelli di LDLc e elevati livelli di HDLc, tradizionalmente ritenuti parametri clinici cardioprotettivi, non possono essere direttamente collegati al rischio cardiovascolare per quanto riguarda CETP. Ciò è confermato in una recente analisi di randomizzazione mendeliana che dimostra che i livelli geneticamente elevati di HDLc non hanno alcun effetto sul rischio di MI (Voight, B.F. et al. *Lancet* 380,572-580 - 2012).

Il punto di forza di questo studio è che gli SNPs studiati sono stati selezionati sulla base di un'ampia ricerca biologica molecolare, per aumentare la probabilità che i risultati osservati siano reali effetti biologici. Un altro aspetto favorevole è il numero elevato di pazienti arruolati nello studio (11.021 individui per lo meta-analisi riguardo i livelli di colesterolo durante il trattamento con statine e 16.570 per quella sugli effetti del trattamento con statine per la prevenzione di MI), provenienti da diversi paesi europei. La grande dimensione del campione aumenta la precisione dei risultati e la meta-analisi dei diversi studi riduce la probabilità di associazioni false-positive. Questo studio ha anche limitazioni. La scelta degli studi da includere nelle metanalisi può essere considerata arbitraria e i disegni degli studi erano differenti. Poiché le statine sono ancora efficaci per tutti i sottogruppi delle varianti genetiche del gene CETP, individualizzare la terapia di questi farmaci sulla base di questi varianti non migliora la terapia. Questo studio contribuisce a definire le varianti genetiche funzionali in CEPT e a migliorare la futura ricerca in questo campo.

La variante rs3764261 in CETP, influenza la trascrizione del gene, incrementa i livelli di HDLc ed è associata a minore efficacia delle statine nella prevenzione dell'infarto del miocardio.

Parole chiave: CEPT, statine, rischio cardiovascolare.

Riferimento bibliografico:

[Leusink M](#) et al. *Clin Pharmacol Therap* 2014, 95(3): 314-20.



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.informazione@segr.it; sif.farmacologia@segr.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 - ISSN 2282-4758

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

| | |
|------------------------------------|--|
| Direttore | Prof. Emilio Clementi (Università di Milano) |
| Vice-Direttore | Prof. Diego Fornasari (Università di Milano) |
| Coordinatore | Dott.ssa Valentina Boscaro (Università di Torino) |
| Caporedattori | Dott. Gabriele Stocco (Università di Trieste) Dott. Salvatore Terrazzino (Università del Piemonte Orientale) |
| Web Editor | Dott. Federico Casale (Università di Torino) |
| Hanno contribuito a questo numero: | Dott.ssa Sarah Cargnin (Università del Piemonte Orientale) Dott.ssa Stefania Cheli (A. O. Polo Universitario "Sacco" di Milano) Dott.ssa Valeria Conti (Università di Salerno) Dott.ssa Eva Cuzzoni (Università di Trieste) Dott.ssa Raffaella Franca (Università di Trieste) Dott.ssa Lucia Gozzo (Università di Catania) Dott.ssa Virginia Paribello (Università di Salerno) Dott.ssa Gloria Ravagnini (Università di Bologna) Dott.ssa Eleonora Turrini (Università di Bologna) |

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.