



---

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

---

## Sommario

### ⇒ Oncologia

- La variabilità genetica degli enzimi di riparazione del DNA e della glutatione-S-trasferasi influenzano l'*outcome* clinico nell'osteosarcoma
- Impatto dei polimorfismi a singolo nucleotide nei geni del metabolismo della citarabina sulla tossicità al farmaco nella leucemia linfoblastica acuta infantile
- Il polimorfismo SNP-A482 nella lisina demetilasi (KDM4A) è associato ad aumentata sensibilità agli inibitori di mTOR

### ⇒ Immunomodulazione

- Mancanza di efficacia del mitoxantrone nella sclerosi multipla progressiva primaria indipendentemente da fattori farmacogenetici: un'analisi retrospettiva multicentrica
- I microRNA circolanti predicono l'insensibilità alla terapia con glucocorticoidi nell'oftalmopatia di Graves
- Analisi mutazionale dei geni dei podociti in bambini con sindrome nefrosica sporadica resistente agli steroidi

### ⇒ Asma

- Uno studio di associazione *genome-wide* identifica un nuovo locus sul cromosoma 2, prossimo al gene ASB3, correlato alla risposta ai  $\beta_2$ -agonisti a breve durata d'azione
- Il trattamento con corticosteroidi per via inalatoria modula l'effetto di varianti del gene ZNF432 sulla risposta ai broncodilatatori negli asmatici

### ⇒ Neurologia

- L'aplotipo HLA-A\*02:01:01/-B\*35:01:01/-C\*04:01:01 associato ad esantema maculo papuloso indotto da lamotrigina in pazienti messicani meticci

### ⇒ Cardiovascolare

- Il polimorfismo rs13064411 del gene *WDR52*, associato ai livelli di PCSK9, modifica i cambiamenti nei livelli sierici di colesterolo totale e LDL indotti da statine

### ⇒ La metanalisi del mese

- Ruolo delle varianti genetiche di TPMT e COMT associate ad ototossicità indotta da cisplatino in pazienti con cancro: studio su due nuove coorti e meta-analisi

---

**ONCOLOGIA**

## LA VARIABILITÀ GENETICA DEGLI ENZIMI DI RIPARAZIONE DEL DNA E DELLA GLUTATIONE-S-TRASFERASI INFLUENZANO L'OUTCOME CLINICO NELL'OSTEOSARCOMA

A cura della Dott.ssa Lucia Gozzo

L'osteosarcoma è un tumore raro, ma rappresenta il più frequente tumore maligno dell'osso nei bambini e negli adolescenti, con un primo picco di incidenza intorno ai 16 anni ed un secondo picco dopo i 60 anni. Con la chemioterapia la sopravvivenza è migliorata significativamente rispetto al solo trattamento chirurgico. Molti dei protocolli di trattamento comprendono chemio pre e post-chirurgica a base di cisplatino, doxorubicina, alte dosi di metotrexate e/o ifosfamide. Nonostante il miglioramento della prognosi, esiste un'ampia differenza interindividuale nella risposta al trattamento. Circa il 50% dei pazienti presenta un *outcome* clinico negativo, e circa il 30% avrà una ricaduta o svilupperà metastasi. La variabilità genetica dei meccanismi coinvolti nella risposta al trattamento può influenzare la sopravvivenza e la comparsa di reazioni avverse, pertanto l'individuazione di *marker* predittivi consentirebbe di migliorare la scelta dei farmaci più efficaci e quindi migliorare l'*outcome*. Il cisplatino viene utilizzato in diverse forme tumorali e agisce legandosi al DNA e impedendone così la replicazione. I meccanismi di riparazione del DNA sono pertanto importanti nel determinare la risposta a questo farmaco: in particolare il *nucleotide excision repair* (NER) rappresenta il meccanismo chiave coinvolto nella riparazione del danno da cisplatino, anche se altre vie, come la *homologous recombination repair* (HRR), possono essere cruciali per la stabilità genomica. Due enzimi della via NER sono stati associati alla resistenza al cisplatino, l'elicasi XPD codificata dal gene *ERCC2* (*excision repair cross-complementation group 2*) ed una proteina del complesso dell'endonucleasi codificata dal gene *ERCC1* (*excision repair cross-complementation group 1*). Nella via HRR, la nibrina (NBN) è parte di un complesso coinvolto nel riconoscimento del danno al DNA, mentre la ricombinasi RAD51 catalizza diverse reazioni con l'aiuto di altre proteine, tra cui la XRCC3 (*X-ray complementing defective repair in Chinese hamster cells 3*). SNPs dei geni NER sono già stati associati con la risposta al cisplatino in diverse patologie tumorali, incluso l'osteosarcoma, ma i dati sono contrastanti. Solo pochi studi invece hanno valutato l'influenza degli SNP dell'HRR, ma non nella risposta dell'osteosarcoma. Studi precedenti degli stessi autori (Goricar K et al. *Radiol Oncol* 2012,46:46–53; Goricar K et al. *J Med Biochem* 2014) hanno mostrato che SNP di *XRCC3* e *NBN* modificano la capacità di riparazione del DNA ed il rischio di osteosarcoma.

Inoltre, anche la glutatione-S-trasferasi (GST) può avere un ruolo importante nell'efficacia del cisplatino. GST mu 1 (*GSTM1*), GST theta 1 (*GSTT1*), e GST pi 1 (*GSTP1*) sono responsabili della riduzione delle concentrazioni intracellulari del farmaco. Diversi polimorfismi, come delezioni del *GSTM1* o del *GSTT1* o SNP non-sinonimi del *GSTT1*, possono alterare l'espressione o l'attività dell'enzima. Studi precedenti hanno mostrato il potenziale ruolo della variabilità genetica del gene *GST* nel trattamento dell'osteosarcoma, ma con risultati inconclusivi (Salinas-Souza C et al. *Pharmacogenet Genomics* 2010,20:507–15; Yang LM et al. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012,13:5883–6; Zhang SL et al. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012,13:2705–9; Windsor RE et al. *Cancer* 2012,118:1856–67).

Lo scopo di questo studio era quello di valutare l'influenza della variabilità genetica degli enzimi di riparazione del DNA e della GST sull'*outcome* del trattamento a base di cisplatino in pazienti con osteosarcoma.

Si tratta di uno studio retrospettivo su pazienti sloveni con osteosarcoma diagnosticato tra il 1990 ed il 2008 e con campioni di tessuto sufficienti per estrazione del DNA. Tutti i pazienti avevano ricevuto chemioterapia a base di cisplatino. I dati clinici sono stati ottenuti dalle cartelle cliniche. La percentuale di necrosi del tessuto tumorale è stata utilizzata per valutare la risposta alla chemioterapia, e sono stati considerati *responder* pazienti con più del 90% di necrosi. *Event-free survival* (EFS) e *overall survival* (OS) sono state definite come il tempo tra l'inizio del trattamento ed un evento (ricaduta di malattia, sviluppo di metastasi o morte) o la morte rispettivamente.

Tra il 1990 ed il 2008, sono stati trattati con chemioterapia a base di cisplatino 66 pazienti con osteosarcoma. Il 54,5% aveva meno di 18 anni al momento della diagnosi. Il 57,6% (38 pazienti) aveva ricevuto chemio a base di cisplatino e metotrexate e il 15,1% (9 pazienti) aveva ricevuto chemio adiuvante. Al momento dell'analisi, 39 pazienti (59,1%) avevano presentato un evento e 33 (50%) erano deceduti. Informazioni sulla percentuale di necrosi erano disponibili per 50 pazienti (75,8%), mentre la risposta istologica non era valutabile per i pazienti che avevano ricevuto una chemio adiuvante. In 24 pazienti (48%) era stata ottenuta

una necrosi superiore al 90%. L'età inferiore a 18 anni ed il sesso femminile erano significativamente associati con una risposta migliore alla chemio ( $P=0,008$  e  $P=0,026$  rispettivamente). Dopo l'aggiustamento per variabili cliniche, l'allele rs13181C dell'*ERCC2* è stato associato con una migliore risposta ( $P=0,022$ ), ma non dopo correzioni per confronti multipli. Una associazione *borderline* è stata osservata tra l'rs1805794 del gene *NBN* ed una migliore risposta ( $P=0,048$ ). Nessuna associazione è rimasta significativa dopo aggiustamento per confronti multipli. Dati completi riguardanti gli eventi avversi erano disponibili per 57 pazienti, mentre dati su eventi gastrointestinali e nausea erano disponibili per 60 pazienti. Il 53% dei pazienti ha sperimentato tossicità ematologica grave, il 50% nausea o vomito ed il 61,7% tossicità gastrointestinale, mentre il 33,3% ha presentato tossicità renale. Nessuno dei polimorfismi studiati era associato con tossicità ematologica o renale. I portatori di almeno un allele rs1799793 dell'*ERCC2* presentavano con maggiore frequenza nausea o tossicità gastrointestinale in generale ( $P=0,032$  e  $P=0,017$ ), mentre l'rs861539 del gene *XRCC3* è stato associato con un rischio ridotto di nausea ( $P=0,038$ ). È stata valutata l'eventuale insorgenza di tossicità in base ai diversi protocolli di trattamento, ed è stata trovata un'incidenza diversa di tossicità ematologica nell'associazione cisplatino-metotrexate ( $P=0,039$ ). Lo stadio e l'età di insorgenza rappresentavano le variabili predittive più importanti per l'OS ( $P=0,003$ ), mentre lo stadio, l'età e le dimensioni del tumore erano i più importanti predittori di EFS ( $P<0,001$ ;  $P=0,003$ ;  $P=0,033$ ). I portatori di almeno un allele rs1799793 A dell'*ERCC2* presentavano una più lunga EFS ( $P=0,006$ ), mentre l'allele rs1138272T del *GSTP1* era associato a più brevi EFS e OS ( $P=0,005$ ;  $P=0,004$ ). È stata inoltre eseguita un'analisi multivariata per EFS che ha incluso i più importanti fattori clinici e genetici, ed entrambi i polimorfismi (rs1799793 dell'*ERCC2* e rs1138272 del *GSTP1*) sono rimasti associati in maniera significativa con l'EFS ( $P=0,002$ ).

In questo studio è stata valutata l'influenza di SNP dei geni di riparazione del DNA e della GST sulla risposta al trattamento, sulla tossicità e la sopravvivenza in pazienti con osteosarcoma trattati con protocolli a base di cisplatino. È stata trovata un'importante influenza tra la presenza degli SNP di *ERCC2* e la risposta alla chemioterapia, ma solo l'associazione con l'EFS è rimasta statisticamente significativa dopo aggiustamento per confronti multipli. Studi precedenti hanno mostrato come la presenza dell'SNP rs1799793 dell'*ERCC2* sia associata con una minore capacità di riparazione del DNA (Spitz MR et al. *Cancer Res* 2001,61:1354–7) ed i risultati sui pazienti concordano con questa scoperta, in quanto una minore capacità di riparazione può aumentare il danno al DNA e quindi l'efficacia del farmaco, ma anche la tossicità. Gli SNP della via HRR e l'influenza sulla risposta al cisplatino sono meno noti, ma l'rs1805794 del gene *NBN* ha mostrato una tendenza ad una migliore risposta, mentre non è stata trovata associazione con la presenza dell'allele rs861539 del gene *XRCC3*. Inoltre, i portatori dell'allele rs1138272 del *GSTP1* avevano una più breve EFS e OS anche dopo aggiustamento per variabili multiple. In studi precedenti anche l'rs1695 del *GSTP1* è stato associato con una ridotta sopravvivenza in pazienti con osteosarcoma (Zhang SL et al. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012,13:2705–9; Windsor RE et al. *Cancer* 2012,118:1856–67; Teng JW et al. *Pak J Med Sci* 2013,29:1182–6). Entrambi gli SNP del *GSTP1* sono associati con una ridotta attività enzimatica che può influenzare la detossificazione del cisplatino. Sebbene non tutte le associazioni siano rimaste significative dopo aggiustamento per confronti multipli, sono stati identificati in questo studio nuovi potenziali fattori genetici predittivi della risposta al cisplatino che meritano ulteriori valutazioni in studi più ampi.

In conclusione, i risultati di questo studio suggeriscono che i polimorfismi rs1799793 dell'*ERCC2* e rs1138272 del *GSTP1* potrebbero essere utilizzati come fattori predittivi della risposta al cisplatino nei pazienti con osteosarcoma.

Limiti dello studio sono rappresentati dalla variabilità dei regimi di trattamento tra i diversi pazienti, come anche dalla possibile influenza dei meccanismi di riparazione del DNA sulla risposta ad altri farmaci. Inoltre, la rarità della patologia ha consentito l'arruolamento di un numero limitato di pazienti, per cui sono necessari ulteriori studi prospettici multicentrici su popolazioni più ampie.

**Parole chiave:** osteosarcoma, cisplatino, enzimi di riparazione del DNA, GST

#### Riferimento bibliografico

Goričar K et al. *Cancer Epidemiol* 2015 Jan 12 [Epub ahead of print]

## **IMPATTO DEI POLIMORFISMI A SINGOLO NUCLEOTIDE NEI GENI DEL METABOLISMO DELLA CITARABINA SULLA TOSSICITÀ AL FARMACO NELLA LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA INFANTILE**

*A cura della Dott.ssa Giulia Sammarini*

La citarabina (ara-C) è un agente chemioterapico usato nel trattamento della leucemia linfoblastica acuta (ALL) infantile. Le più frequenti tossicità alle dosi standard sono mielosoppressione e infezioni. Poiché c'è un'alta variabilità interindividuale nella sensibilità e nella tossicità al trattamento con ara-C, comprenderne il background genetico potrebbe contribuire ad identificare i pazienti suscettibili di maggior rischio nello sviluppo di reazioni avverse. Per entrare nelle cellule, Ara-C necessita di un trasporto attivo mediato da SLC29A1 e SLC28A1. All'interno delle cellule, il farmaco viene metabolizzato con gli stessi meccanismi degli analoghi nucleosidici, quali gemcitabina e decitabina. La conversione intracellulare di ara-C nella forma attiva ara-CTP è indispensabile perché si manifesti la tossicità a livello della fase-S del ciclo cellulare. Ara-CTP viene incorporata al DNA, inibendone competitivamente la sintesi. Ara-C e il suo metabolita attivo sono degradate dalla citidina deamminasi (CDA) e dalla deossicitidina-monofostato deaminasi (DCTD). Negli ultimi anni, numerosi SNPs nei geni coinvolti nel metabolismo di ara-C sono stati identificati come fattori responsabili di modificazioni a livello della farmacocinetica e della farmacodinamica. Lo scopo di questo studio è stato quello di verificare l'ipotesi che gli SNPs coinvolti nel metabolismo e nel trasporto di ara-C potessero modificare la tossicità ematica e l'esito del trattamento dei bambini affetti da ALL trattati con ara-C.

Nello studio sono stati arruolati 144 pazienti affetti da ALL infantile e suddivisi, secondo il protocollo ALL BFM 1990, in tre gruppi di rischio (basso medio ed alto rischio) a seconda dello stato di salute ad inizio diagnosi, delle caratteristiche patologiche e genetiche e della risposta iniziale alla terapia. La tossicità è stata analizzata durante la fase di intensificazione che precede il trattamento chemioterapico: in ogni gruppo di rischio i pazienti sono stati trattati 8-16 volte con una dose giornaliera di 75 mg/m<sup>2</sup> endovena per 4 giorni, ripetuta per 2 o 4 settimane. Durante la terapia, ai pazienti è stata somministrata una dose giornaliera di 60 mg/m<sup>2</sup> di 6-mercaptopurina orale e una o due dosi di metotrexato intratecale. Due giorni prima della somministrazione di ara-C, ai pazienti è stata fatta una singola dose intravenosa di ciclofosfamida 1 mg/m<sup>2</sup>.

Sono stati selezionati 8 SNPs nei geni di CDA, DCK, DCTD, SLC28A3 e SLC29A1, i criteri di selezione sono stati: la frequenza dell'allele minore che deve essere maggiore del 10% nella popolazione caucasica, SNPs omologhi o intronici oppure che risultassero associati al rischio cancerogeno o implicati nella possibile risposta al trattamento in studi precedenti. Il DNA è stato estratto dal sangue periferico e gli SNPs sono stati genotipizzati usando un metodo competitivo basato sulla fluorescenza (KASP).

Nella coorte di bambini affetti da ALL acuta, sono state monitorate la leucopenia, la trombocitopenia, l'anemia, la nefrotossicità, l'epatotossicità, l'encefalopatia e le infezioni. Nessuno dei pazienti ha riportato nefrotossicità, solo uno ha avuto encefalopatia per cui non è stato possibile eseguire uno studio di associazione con un particolare genotipo. I maggiori effetti avversi sono stati: leucopenia, trombocitopenia (con una frequenza del 100%) ed infezioni (31%). Lo studio ha messo in evidenza un'associazione fra gli SNPs nel gene DCK e la leucopenia: i pazienti con gli alleli rs12648166 G e rs4694362 T hanno un alto rischio di presentare una forma di leucopenia di 3/4 grado (OR= 2.25, 95% CI= 1.27-3.99, P= 0.005; OR= 2.24, 95% CI= 1.26-3.97, P= 0.0053 rispettivamente). Andando ad osservare la distribuzione del genotipo, si è visto che il 41% dei pazienti con genotipo per DCK rs12648166 GG hanno sviluppato leucopenia, contro il 12% dei pazienti con genotipo AA; i pazienti con genotipo rs4694362 TT (42%) sono risultati più suscettibili al contrarre la leucopenia rispetto ai corrispondenti CC (12%). L'analisi degli aplotipi nel gene DCK, ha evidenziato che l'aplotipo GT è più frequente nei pazienti affetti da leucopenia di 3/4 grado rispetto a tutti gli altri aplotipi.

Lo studio ha inoltre analizzato l'influenza degli SNPs sulla sopravvivenza complessiva (OS) e quella priva di ricadute (EFS) senza evidenziare nulla di significativo.

Il trattamento dei pazienti affetti da ALL è molto efficace, anche se comporta reazioni avverse frequenti e di notevole entità. Due SNPs del gene DCK, rs12648166 e rs4694362, sono associati con un aumentato rischio di sviluppare leucopenia a livello di allele, genotipo e aplotipo, mentre nessuno di questi influenza la

trombocitopenia, l'anemia, le infezioni o la sopravvivenza dei pazienti. Il ridotto numero di pazienti analizzati è stato una limitazione per questo studio, tuttavia i risultati sono plausibili. Il gene DCK è richiesto per l'attività farmacologica di molti analoghi nucleosidici utilizzati nella terapia antitumorale. Infatti, la sua funzionalità è la maggior determinante nello sviluppo della resistenza al trattamento con ara-C in quanto l'espressione del gene DCK nelle cellule resistenti ad ara-C è ridotta del 60% rispetto ai normali livelli delle cellule linfoidi umane. I livelli ridotti di mRNA sono correlati ad un minor livello della proteina DCK e quindi ad una sua minore attività.

I risultati di questo studio indicano che i polimorfismi a livello del gene DCK possono essere un importante fattore di rischio genetico per le tossicità ematiche che insorgono durante il trattamento della ALL pediatrica con ara-C. Identificare una chemioterapia più mirata, basata sul background genetico dei pazienti, può portare all'ottimizzazione della dose di ara-C, migliorando l'*outcome* farmacologico e riducendo le tossicità.

**Parole chiave:** citarabina, SNPs, tossicità, leucemia linfoide acuta pediatrica

#### Riferimento bibliografico

Gabor KM et al. *Pediatr Blood Cancer* 2015 Jan 3 [Epub ahead of print]

---

## IL POLIMORFISMO SNP-A482 NELLA LISINA DEMETILASI (KDM4A) È ASSOCIATO AD AUMENTATA SENSIBILITÀ AGLI INIBITORI DI mTOR

A cura della Dott.ssa Eleonora Turrini

È noto come polimorfismi della linea germinale siano associati anche al rischio di insorgenza di cancro, così come correlino con la sopravvivenza e la risposta al trattamento farmacologico. Si conosce poco su come i polimorfismi codificanti alterino la funzione di enzimi coinvolti nel rimodellamento della cromatina. Le più recenti evidenze sulle mutazioni somatiche nel cancro hanno identificato questi enzimi come critici nel processo tumorale. Un polimorfismo codificante nella lisina demetilasi KDM4A è stato di recente associato all'*outcome* del tumore al seno.

Scopo del presente studio è stato quello di descrivere l'impatto molecolare e biochimico del polimorfismo codificante A468 (rs586339) della lisina demetilasi sulla prognosi di pazienti affetti da tumore al polmone non a cellule piccole (NSCLC).

La lisina demetilasi è stata associata in vari studi ad una alterata proliferazione cellulare, al potenziale metastatico ed alla sopravvivenza di pazienti affetti da tumore al polmone e alla vescica. Da qui l'interesse nel valutare quali fattori genetici potessero influenzare i livelli di questa proteina, in particolare, tra i polimorfismi non sinonimi codificanti, in quanto maggiormente correlati a cambiamenti nella sequenza amminoacidica e, di conseguenza, nella funzionalità proteica. Il polimorfismo SNP-A482 è emerso come potenziale candidato in quanto conservato tra le specie, per il quale è riportato su più database A come allele più frequente per il quale è stata riscontrata differenza rilevante tra le etnie. La frequenza stimata tra le popolazioni analizzate da HapMap è stata 65% omozigosi per l'allele maggiore, 30% eterozigosi e 5% omozigosi polimorfa (SNP-A482). Per verificare se SNP-A482 fosse associato a qualche esito clinico, una coorte di 462 pazienti affetti da NSCLC è stata analizzata retrospettivamente (una volta acquisito il consenso informato) sulla base dell'*outcome* clinico. La frequenza allelica tra le coorti NSCLC e non-NSCLC non ha mostrato differenze, ma pazienti omozigoti per KDM4A SNP-A482 hanno mostrato una peggiore prognosi ( $P = 0.055$ ), soprattutto per pazienti in stadio avanzato della malattia ( $P < 0.05$ ). Per meglio valutare l'impatto clinico di SNP-A482 ed il suo potenziale come biomarcatore di sopravvivenza per NSCLC, i pazienti sono stati analizzati secondo curva ROC (*receiving operating characteristic*) suddivisi in 5 sottogruppi: età inferiore a 65 anni, adenocarcinoma, stadio avanzato della malattia, sottoposti a terapia con radiazioni e sottoposti ad intervento chirurgico. Per ognuno dei sottogruppi si è valutata AUC in relazione alla presenza dello SNP e ad altre caratteristiche quali età, sesso e stato di fumatore. I dati emersi non supportano questo polimorfismo come biomarcatore da solo; per confermare KDM4A SNP-A482 come biomarcatore è necessario un maggior numero di pazienti, sebbene i risultati raccolti forniscano il razionale per esplorare più a fondo il suo impatto clinico. In seguito gli autori hanno valutato l'impatto di questo

polimorfismo sull'attività catalitica dell'enzima *in vivo*, dimostrando che la presenza di SNP-A482 su KDM4A esita in un aumento di due volte dell'ubiquitinazione ed in una minore stabilità della proteina. Per valutare poi l'impatto sulla risposta al trattamento farmacologico, in 86 linee di NSCLC, genotipizzate per KDM4A, è stata valutata l'efficacia in termini di vitalità di 87 differenti composti, alcuni dei quali in uso clinico, a 3 differenti concentrazioni. Dai risultati, analizzati ed espressi attraverso *volcano plot*, è emerso che linee cellulari omozigoti per il polimorfismo in studio presentano un'umentata sensibilità al trattamento con farmaci inibitori di mTOR ( $P = 0.002$ ). In seguito, è stato analizzato anche l'impatto di altri polimorfismi di KDM4A sulla sensibilità ad inibitori di mTOR, ma solo lo SNP-A482 ha mostrato associazione significativa. Gli autori hanno quindi approfondito la relazione tra polimorfismo ed inibitori di mTOR dal punto di vista biochimico, ipotizzando che in presenza di inibitori mTOR i livelli di proteina fossero più bassi in presenza del gene polimorfo piuttosto che nel *wild type*, e tale ipotesi è stata confermata attraverso esperimenti di transfezione *in vitro*. Infine, il fatto che i ridotti livelli di proteina fossero associati ad una maggiore sensibilità agli inibitori di mTOR è stato confermato da esperimenti di transfezione con siRNA per KDM4A, avendo come *end-point* la proliferazione in seguito a trattamento con rifampicina, ed ulteriori esperimenti sulla vitalità cellulare hanno dato conferma sul fatto che SNP-A482 e i livelli di KDM4A giochino un ruolo importante nel sensibilizzare le cellule al trattamento con inibitori di mTOR.

Gli autori hanno dimostrato che la presenza del polimorfismo aumenta l'ubiquitinazione ed il *turn over* della proteina, aumentando la sua interazione con il complesso SCF. Inoltre, hanno effettuato uno screening di farmaci su cellule omozigoti per SNP-A482 che stabilisce un legame tra KDM4A e l'inibizione del *pathway* di mTOR. Infatti, è stato dimostrato come gli inibitori di mTOR riducano in maniera significativa i livelli di proteina derivante dal gene KDM4A polimorfo, piuttosto che da quello omozigote *wild type*. In accordo a questo dato, livelli ridotti di proteina aumentano la sensibilità agli inibitori di mTOR.

I risultati del presente studio riportano per la prima volta che varianti codificanti nella linea germinale nella lisina demetilasi, KDM4A SNP-A428, hanno un impatto nella risposta al trattamento chemioterapico, in particolare questo polimorfismo correla con una peggiore sopravvivenza in pazienti NSCLC. SNP-A482 altera il *turnover* della proteina ed è correlato ad una maggiore sensibilità agli inibitori di mTOR, identificando, quindi, KDM4A come un potenziale *biomarker* di risposta alla terapia con questi inibitori.

Inoltre, emerge come analisi cellulari e biochimiche sulle varianti somatiche e polimorfe di enzimi responsabili del rimodellamento della cromatina possano rappresentare bersagli promettenti per nuove strategie chemioterapiche.

Dato il coinvolgimento della deplezione di KDM4A e del suo polimorfismo SNP-A482 nell'aumentare la sensibilità agli inibitori di mTOR, si potrebbe confermare questo dato anche in altre tipologie di tumore diverse da NSCLC. Ad esempio, sarebbe interessante valutare la correlazione di KDM4A di pazienti con carcinoma renale refrattario trattati con la risposta al trattamento con l'inibitore di mTOR temsirolimus.

**Parole chiave:** KDM4A, SNP-A482, inibitori mTOR, *target therapy*

#### Riferimento bibliografico

Rechem CV et al. *Cancer Discov* 2015 Jan 6 [Epub ahead of print]

### IMMUNOMODULAZIONE

#### MANCANZA DI EFFICACIA DEL MITOXANTRONE NELLA SCLEROSI MULTIPLA PROGRESSIVA PRIMARIA INDIPENDENTEMENTE DA FATTORI FARMACOGENETICI: UN'ANALISI RETROSPETTIVA MULTICENTRICA

A cura della Dott.ssa Donatella Carretta e della Prof.ssa Patrizia Romualdi

Nonostante la mancanza di dati di *higher evidence class*, il mitoxantrone (MX) viene usato su base *off-label* specialmente nella sclerosi multipla progressiva primaria (*primary progressive Multiple Sclerosis*, PPMS) rapidamente evolutiva, a causa della mancanza di opzioni terapeutiche alternative.

I meccanismi d'azione del MX includono la morte cellulare di differenti sottoclassi di leucociti, tra cui le cellule B e le cellule che presentano l'antigene. Nei pazienti con PPMS, una *upregulation* del recettore 2 delle chemochine sui monociti come risposta immunologica distinta è stata identificata solo in coloro con lesioni attive alla MRI; questi pazienti potrebbero quindi rappresentare una delle sottoclassi di pazienti che ha la più alta possibilità di rispondere clinicamente.

Le potenziali reazioni avverse gravi (*serious adverse drug reactions*, SADR) del MX comportano la necessità di un'attenta selezione dei pazienti in modo da determinarne il migliore profilo di rischio-benefici.

Gli Autori hanno in precedenza identificato SNPs funzionalmente rilevanti negli *ATP-binding cassette (ABC) multi-drug resistance transporters ABCB1* e *ABCG2* come potenziali predittori per la risposta terapeutica al MX nella sclerosi multipla remittente progressiva e secondariamente progressiva (*relapsing and secondary progressive MS*, RP/SPMS).

Lo scopo del presente studio è investigare la risposta al MX nei pazienti affetti da PPMS e valutare se le varianti genetiche descritte precedentemente siano in grado di identificare i sottogruppi di pazienti con PPMS che hanno la maggiore probabilità di rispondere al MX.

Sono stati reclutati 138 pazienti con diagnosi di PPMS e genotipizzati (usando *TaqMan™ polymerase chain reaction*) per *ABCG2* V12M (SNP rs2231137) e Q141K (rs2231142) e *ABCB1* 3435CNT (rs1045642) e 2677GNT (rs2032582).

Come genotipo *wild type* è stato designato *ABCB1/ABCG2-H* sulla base dell'alto efflusso *in vitro* di MX dalle cellule immunitarie periferiche. Al contrario, i genotipi con almeno una variante allelica eterozigote in entrambi i geni erano designati *ABCB1/ABCG2-L* (*low efflux*) e polimorfica in *ABCB1* o *ABCG2* come *ABCB1/ABCG2-I* (*intermediate*).

La risposta al trattamento nei pazienti PPMS (41 trattati con MX e 43 controlli) è stata valutata retrospettivamente. La progressione della malattia è stata valutata mediante esame clinico (dati disponibili per 84 pazienti) e tramite l'*expanded disability status scale* (EDSS) (*non-responders*: deterioramento dell'EDSS di 1 punto (EDSS<6.0) o 0.5 punti (EDSS≥6.0), n=82). Le valutazioni sono state effettuate dopo un minimo di 12 mesi di trattamento con MX. Inoltre, la stabilità di EDSS è stata confermata dopo 24 mesi in 46/84 pazienti PPMS.

I pazienti hanno ricevuto MX ogni tre mesi al dosaggio di 12 mg/m<sup>2</sup> di superficie corporea. Su 36 pazienti, 26 hanno ricevuto un trattamento addizionale con corticosteroidi da 1 a 5 volte durante il periodo di trattamento con MX. Quarantatre pazienti con PPMS sono stati considerati come controlli (8 senza terapia, 34 sottoposti a cicli di corticosteroidi endovena e uno trattato con interferon-beta 1a). Sono inoltre stati considerati 155 pazienti con RP/SPMS.

Nel gruppo di pazienti con PPMS trattati con MX, 22 su 41 sono stati classificati come *responders* (53.7%), rispetto al 78.1% dei pazienti RP/SPMS trattati con MX (p = 0.039). In contrasto, 30 di 43 controlli PPMS (prevalentemente trattati con corticosteroidi) soddisfacevano i criteri di stabilità clinica.

Analizzando i genotipi dell'intero gruppo di PPMS, 38 su 138 pazienti con PPMS erano portatori di SNPs omozigoti in entrambi i geni *ABC-transporter (ABCB1/ ABCG2-L*; 27.5%), 16 su 138 avevano il genotipo *ABCB1/ABCG2-H* (11.6%) e il 60.9% mostrava il genotipo *ABCB1/ABCG2-I* (84 su 138). Queste frequenze erano paragonabili a individui sani, pazienti PPMS trattati con MX e pazienti RP/SPMS. Non vi era associazione tra il genotipo *ABC* e la risposta al MX nei pazienti con PPMS.

Un paziente PPMS con aritmia cardiaca e sospetto legame causale di SADR e MX mostrava un genotipo inusuale con varianti alleliche in *ABCG2* and *ABCB1*, oltre a *ABCC2* (rs717620) (*ABCB1-3435TT*, *ABCG2-141QK*, *ABCC2-116CT*).

La mancanza di effetto terapeutico al MX nel presente gruppo di pazienti PPMS è in linea con i dati negativi riportati in un trial di fase II. Il presente studio non è riuscito ad identificare sottogruppi farmacogenetici con risposte differenziali al MX nei pazienti PPMS.

Nello studio è stato individuato un paziente con possibile SADR cardiaco portatore di un relativamente raro *ABC-transporter-genotype* che determina un basso efflusso e accumulo intracellulare di MX. Questo dato indica una possibile influenza di questi *multi-drug resistance transporters* sul profilo di sicurezza del MX.

Gli Autori sono consapevoli che il piccolo campione di pazienti esaminato in questo studio, dovuto al carattere *off-label* del MX per questa indicazione, limita la possibilità di rilevare differenze significative. In letteratura, mancano trials prospettici multicentrici di *higher evidence class* sul MX; tuttavia, i presenti dati non supportano l'uso *off-label* del MX nei pazienti PPMS indipendentemente dal *background* farmacogenetico, non da ultimo per proteggere i pazienti da possibili SADR.

In conclusione, nel presente studio non è stata rilevata un'associazione tra SNPs nei geni *ATP-binding cassette (ABC) multi-drug resistance transporters ABCB1* e *ABCG2* e risposta al mitoxantrone nei pazienti con sclerosi multipla progressiva primaria.

**Parole chiave:** immunosoppressione, *multi-drug resistance transporter*, farmacogenetica

### Riferimento bibliografico

Grey Née Cotte S et al. *J Neuroimmunol* 2015, 278: 277-79.

---

## I MICRORNA CIRCOLANTI PREDICONO L'INSENSIBILITÀ ALLA TERAPIA CON GLUCOCORTICOIDI NELL'OFTALMOPATIA DI GRAVES

A cura della Dott.ssa Gloria Ravegnini

L'oftalmopatia di Graves (GO) è la principale manifestazione extra-tiroidea della malattia di Graves. Quest'ultima è un disturbo che colpisce la tiroide, rendendola di fatto iperattiva e causando un numero svariato di effetti collaterali come perdita di peso, battito cardiaco accelerato, sudorazione, cambiamenti nelle ossa, pelle, o unghie e la suddetta oftalmopatia.

Attualmente, il trattamento di prima linea prevede la somministrazione intravenosa di glucocorticoidi (GC) con una risposta soddisfacente in circa il 75-80% dei casi, morbidità in circa il 6.5% e morte nello 0.6%. La maggior parte degli effetti collaterali sono strettamente legati a malattie o a trattamenti pre-esistenti. Di conseguenza, la selezione dei pazienti o la personalizzazione del trattamento basata sull'*outcome* a GC è veramente difficoltosa. Attualmente non sono stati identificati biomarkers per la predizione della risposta clinica e l'efficacia dei glucocorticoidi in pazienti affetti da GO è associata a parametri clinici come una risposta precoce o una durata breve della malattia. In aggiunta a questi parametri sono stati estensivamente studiati anche quelli farmacogenomici; sebbene infatti sia noto che polimorfismi e mutazioni possono causare resistenza ai GC, tuttavia in questa tipologia di pazienti non è stata individuata alcuna associazione con la variabilità di risposta. Recentemente, diversi studi hanno rivelato che i microRNA (miRNA) possono modulare la risposta ai farmaci, avendo come bersaglio importanti geni implicati in essa.

Ad oggi non vi sono studi sul ruolo dei miRNAs nella modulazione dell'*outcome* clinico a glucocorticoidi in pazienti affetti da GO.

Date le suddette premesse, lo scopo di questo studio è stato quello di identificare miRNA circolanti che possono predire la risposta a GC in pazienti affetti da GO e valutare il loro ruolo *in vitro*.

Nell'analisi sono stati coinvolti un totale di 54 pazienti, eleggibili per una terapia a base di GC. I criteri di esclusione hanno poi portato il numero effettivo dei soggetti a 35; una dose di 4.5 g di metilprednisone (MP) è stata somministrata per 12 settimane e per ogni paziente, un oftalmologo ha calcolato il *clinical activity score* (CAS), valutando parametri specifici come proptosi, pressione intraoculare e diplopia. Sono state inoltre valutate la funzione e gli anticorpi tiroidei. Alla fine delle 12 settimane, in base al punteggio CAS e a parametri oftalmologici oggettivi, i pazienti sono stati suddivisi in 3 gruppi: responsivi, parzialmente responsivi o resistenti.

Utilizzando uno specifico array per miRNA circolanti, sono stati screenati un totale di 84 miRNAs per i 5 pazienti con la risposta migliore (pazienti responsivi con risposta precoce nel primo mese e senza recidive alla fine di trattamento) vs i 4 pazienti con la peggior risposta (pazienti resistenti senza alcun miglioramento o con peggioramento alla fine del trattamento). Dall'array, 9 miRNA hanno mostrato differenze significative nei due gruppi ( $p < 0.05$ ), 8 dei quali up-regolati nei responsivi; in particolare miR-155-5p e miR-224-5p esibivano il *fold-change* più elevato, 14.4 ( $p = 0.02$ ) e 11.04 ( $p = 0.02$ ), rispettivamente.

Successivamente i livelli sierici dei due miRs sono stati validati in real-time PCR in tutti i 35 pazienti. Per il miR-155-5p non sono state osservate differenze nei  $\Delta$ ct dei tre gruppi; al contrario miR-224-5p mostrava  $\Delta$ ct significativamente più elevati nel gruppo dei resistenti (responsivi vs resistenti,  $p=0.0048$ ; responsivi parziali vs resistenti,  $p=0.0098$ ).

L'analisi univariata ha evidenziato che i livelli di miR-224-5p, e dell'anticorpo sierico per il ricettore di TSH (TRAb) erano associati con rischio di resistenza a GC. Dopo l'aggiustamento per fattori quali età, sesso, CAS score, TRAb, nessun parametro era più associato con tale rischio. Considerando quindi che i livelli di miR-224-5p non erano un fattore di rischio indipendente ma che erano significativamente diversi nei tre gruppi, è stata osservata la correlazione tra questi e i parametri clinici; da ciò è emerso che miR-224-5p era negativamente correlato con TRAb ( $p=0.016$ ) e CAS ( $p=0.008$ ). Poiché miR-224-5p e il fattore sierico TRAb erano correlati, mediante combinazione dei due e regressione logistica è stata valutata la possibilità di generare un fattore di rischio indipendente per l'*outcome* terapeutico. Il nuovo parametro ha quindi permesso di differenziare i tre gruppi (resistenti vs responsivi,  $p=0.0005$ ; resistenti vs responsivi parziali,  $p=0.01$ ) risultando anche associato con risposta a GC sia in analisi univariata (OR: 2.718, 95% CI 1.410-5.236,  $p=0.0028$ ) che multivariata (OR: 2.565, 95% CI 1.011-6.505,  $p=0.047$ ).

Infine, per distinguere i pazienti che avrebbero beneficiato del trattamento, i gruppi responsivi e responsivi parziali sono stati accorpati in "non-resistenti" e comparati con il gruppo di resistenti. L'analisi delle curve ROC ha mostrato che i livelli di miR-224-5p da soli avevano un valore predittivo (PV) positivo, PPV, del 92.31% e un PV negativo, NPV, del 72.73%. TRAb aveva un PPV del 80% e un NPV del 60%; la loro composizione aveva un PPV del 91.67% e un NPV del 69.56%.

Esperimenti *in vitro* hanno successivamente dimostrato che, in un modello cellulare resistente (cellule 293T con resistenza ai glucocorticoidi indotta dal TNF alfa), l'over-espressione di miR-224-5p ripristinava la sensibilità a GC.

In conclusione, lo studio ha dimostrato che i livelli sierici di miR-224-5p sono associati con sensibilità al trattamento a GC in pazienti affetti da oftalmopatia di Graves; inoltre il parametro di combinazione miR-224-5p – TRAb potrebbe effettivamente essere impiegato per predire la sensibilità a glucocorticoidi nei suddetti pazienti.

Tale scoperta potrebbe essere utile nell'indirizzare i clinici nella scelta della migliore strategia terapeutica per i pazienti affetti da GO; infatti prima dell'inizio del trattamento con GC, gli individui malati potrebbero essere screenati per i livelli di miR-224-5p per determinare la sensibilità alla terapia con GC.

**Parole chiave:** oftalmopatia di Graves, glucocorticoidi, miR-224-5p

#### Riferimento bibliografico

Shen L et al. *Endocrine* 2015 Jan 15 [Epub ahead of print].

---

## ANALISI MUTAZIONALE DEI GENI DEI PODOCITI IN BAMBINI CON SINDROME NEFROSICA SPORADICA RESISTENTE AGLI STEROIDI

A cura delle Dott.sse Eva Cuzzoni e Sara De Iudicibus

La sindrome nefrosica idiopatica (SN) è una malattia glomerulare molto comune nell'infanzia. Si caratterizza per l'associazione di proteinuria, ipoalbuminemia, edema, e iperlipidemia. La malattia richiede tipicamente una somministrazione prolungata di steroidi e trattamenti immunosoppressivi. Circa il 10% dei pazienti non risponde ai corticosteroidi presentando rischi di complicanze renali supplementari alla SN e la possibilità di sviluppare malattie renali allo stadio terminale. Studi recenti hanno dimostrato che le mutazioni in diversi geni dei podociti, tra cui NPHS1, NPHS2 e CD2AP, sono associate con la patogenesi della sindrome nefrosica resistente agli steroidi (SNRS). NPHS1, NPHS2 e CD2AP codificano per gli elementi strutturali della barriera di filtrazione glomerulare e sono stati identificati come i geni responsabili della SNRS autosomica recessiva. Numerosi studi hanno evidenziato che quando sono presenti mutazioni su questi geni, i pazienti con SNRS autosomica recessiva possono mostrare resistenza agli steroidi e agli

immunosoppressori. Mutazioni sul gene *NHPS1*, che codifica per la nefrina, causano SN congenita del tipo finlandese e sembrano essere responsabili dell'esordio infantile della SNRS. Mutazioni del gene *NHPS2*, che codifica per la podocina, sono state associate alla SNRS autosomica recessiva (AR). Mutazioni del gene *CD2AP* sono invece state identificate nella SN sporadica e nella glomerulosclerosi focale segmentale. Il gene *WT1* codifica per un fattore di trascrizione zinc-finger coinvolto nello sviluppo del rene, mutazioni su questo gene sono state correlate alle sindromi di Denys-Drash e Frasier e a casi di SNRS. La maggior parte dei pazienti con SNRS presentano mutazioni nei geni dei podociti *NPHS1*, *NPHS2*, *CD2AP* e *WT1* e sono anche resistenti agli agenti immunosoppressori. Gli autori sottolineano come comprendere le mutazioni causative nei geni dei podociti in bambini con SNRS sia importante per poter modificare la classificazione della SNRS sui risultati delle analisi genetiche. In questo studio, per chiarire il ruolo di queste mutazioni genetiche, gli autori hanno analizzato le sequenze di tutti gli esoni ed i confini esone-introne per tutti e 4 i geni in 10 bambini SNRS cinesi refrattari alla terapia immunosoppressiva.

Lo studio ha incluso 10 bambini affetti da SNRS sporadica con esordio della malattia tra i 3 mesi e 18 anni di età, nessuna risposta alla terapia immunosoppressiva e nei quali l'istologia renale evidenziava glomerulosclerosi focale segmentale, SN a cambiamenti minimi o glomerulonefrite a proliferazione mesangiale. Il gruppo di controllo comprendeva 20 bambini con SNRS responsivi ad una terapia steroidea prolungata o ad agenti immunosoppressori. Sono stati inoltre studiati 50 volontari adulti con analisi delle urine normali come controlli. La SN è stata diagnosticata sulla base dell'escrezione urinaria di proteine  $>50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{giorno}^{-1}$  con ipoalbuminemia  $<25 \text{ g/L}$ . La remissione completa è stata definita come analisi delle urine normale o tracce di proteine su stick per 3 giorni consecutivi e normalizzazione dei livelli di albumina nel siero ( $>35 \text{ g/L}$ ). La remissione parziale è stata definita come la risoluzione di edema, proteinuria  $4\text{-}40 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ , e la normalizzazione di albumina sierica. La resistenza agli steroidi è stata definita come un fallimento di induzione di remissione completa dopo 4 settimane di terapia standard con prednisone ( $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{giorno}^{-1}$ , dato in 3 dosi divise, massimo 60 mg/die). L'esito del trattamento con ciclofosfamide, ciclosporina, micofenolato mofetil, o tacrolimus della maggior parte dei pazienti non responsivi agli steroidi è stato determinato tramite attività della malattia. L'analisi mutazionale è stata effettuata utilizzando campioni di sangue dei pazienti. Il DNA genomico è stato estratto da leucociti del sangue periferico mediante il kit EZNASE Sangue DNA (OMEGA Bio-Tek) secondo il protocollo del produttore. L'analisi mutazionale è stata effettuata mediante sequenziamento diretto di tutti i 29 esoni di *NPHS1*, tutti gli 8 esoni di *NPHS2*, tutti i 18 esoni di *CD2AP* e tutti i 10 esoni di *WT1*. Gli esoni sono stati amplificati con la reazione a catena della polimerasi (PCR), i prodotti di PCR sono stati sequenziati utilizzando ABI 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems). Le mutazioni sono state confermate mediante sequenziamento in entrambe le direzioni. Il DNA genomico dei 50 controlli sani è stato utilizzato per confermare mutazioni ed escludere polimorfismi del DNA.

Sei varianti di *NPHS1* sono state rilevate in 5 pazienti: 928G>A, 2677A>G, IVS8+30C>T, IVS21+14G>A, IVS25-23C>T e \*142T>C. Due varianti di *CD2AP* eterozigoti sono state rilevate in due pazienti: IVS7-135G>A e IVS13-137G>A. Una mutazione eterozigote di *WT1* (1180C>T) è stata identificata in 1 paziente. Nessuna di queste varianti è stata identificata nei 50 controlli sani. Mutazioni patogenetiche sono state identificate in 2 dei 10 pazienti (20%) che non manifestavano alcuna riduzione della proteinuria in seguito a trattamenti prolungati di steroidi o trattamenti con agenti immunosoppressivi. Non sono state rilevate mutazioni nei 20 controlli SNRS che hanno raggiunto una remissione completa dopo terapie prolungate con steroidi o immunosoppressori.

Gli autori evidenziano come i dati ottenuti in questo studio suggeriscano che l'analisi mutazionale di geni dei podociti dovrebbe essere eseguita su pazienti SNRS che non rispondono a trattamenti prolungati di steroidi o a terapie immunosoppressive.

**Parole chiave:** sindrome nefrosica, steroidi, immunosoppressori, analisi mutazionale

#### Riferimento bibliografico

Feng DN et al. *Genet Mol Res* 2014, 13(4):9514-22.

**ASMA****UNO STUDIO DI ASSOCIAZIONE *GENOME-WIDE* IDENTIFICA UN NUOVO LOCUS SUL CROMOSOMA 2, PROSSIMO AL GENE ASB3, CORRELATO ALLA RISPOSTA AI B2-AGONISTI A BREVE DURATA D'AZIONE**

A cura della Dott.ssa Sarah Cargin

L'asma è una malattia infiammatoria cronica delle vie aeree risultante in broncospasmo reversibile e difficoltà respiratorie. I farmaci  $\beta$ 2-agonisti risultano essere fortemente efficaci nel trattamento dell'asma in quanto, stimolando i recettori  $\beta$ 2-adrenergici localizzati a livello del tessuto liscio bronchiale, inducono una consistente riduzione della broncocostrizione. La risposta al trattamento con tali farmaci è misurabile tramite la valutazione della "risposta broncodilatatoria" (BDR), definita come il variare della costrizione alle vie aeree dopo la somministrazione di un farmaco  $\beta$ 2-agonista. Nonostante l'efficacia di tale classe farmacologica sia comprovata nel trattamento dell'asma, emerge dalla pratica clinica una forte variabilità inter-individuale nella risposta ai farmaci  $\beta$ 2-agonisti assunti per via inalatoria. Tra i plausibili fattori influenzanti tale variabilità, la componente genetica individuale è stata ipotizzata esserne uno dei principali determinanti. A supporto di tale ipotesi, alcuni studi in letteratura hanno identificato una potenziale correlazione tra una variante del gene ADRB2 (codificante per il recettore  $\beta$ 2-adrenergico) e la risposta alla terapia con  $\beta$ 2-agonisti. Ulteriori varianti nei geni CRHR2 (codificante per un recettore ad alta affinità per il CRH), ARG1 (codificante per l'arginasi) e SPATS2L (codificante per una DNA-polimerasi transattivata) sono emerse da studi successivi come potenzialmente associate alla risposta broncodilatatoria da  $\beta$ 2-agonisti. Obiettivo di questo studio di associazione *genome-wide* è stato quello di identificare nuove varianti genetiche potenzialmente associate alla risposta broncodilatatoria indotta da  $\beta$ 2-agonisti a breve durata d'azione in un'ampia coorte di pazienti asmatici.

Lo studio di associazione *genome-wide* è stato condotto su una *coorte esplorativa* costituita da 724 pazienti asmatici in trattamento con salbutamolo. Nello specifico, tale coorte risulta essere composta da pazienti di etnia caucasica partecipanti a tre differenti studi sponsorizzati dal *National Institute of Health*, di cui: a) 315 bambini arruolati per lo studio "Childhood Asthma Management Program" (CAMP); b) 178 bambini reclutati per lo studio "Childhood Asthma Research and Education" (CARE); c) 231 adulti arruolati per lo studio "Asthma Clinical Research network" (ACRN). L'*outcome* primario dello studio è rappresentato dalla valutazione della risposta broncodilatatoria (BDR) indotta da albuterolo, intesa come variazione della FEV<sub>1</sub> (volume di aria emesso nel primo secondo di una espirazione forzata) dopo 2 o più puffs di albuterolo. Sono state applicate due differenti definizioni per la misurazione della BDR: 1) FEV<sub>1</sub> post-broncodilatatore - FEV<sub>1</sub> pre-broncodilatatore, con FEV<sub>1</sub> espressa come percentuale della FEV<sub>1</sub> prevista, corretta per il numero dei puffs di broncodilatatore somministrati; 2) (FEV<sub>1</sub> post-broncodilatatore - FEV<sub>1</sub> pre-broncodilatatore) / FEV<sub>1</sub> pre-broncodilatatore. Lo scopo dell'utilizzo di due definizioni distinte di BDR costituisce una delle strategie adottate per ridurre la variabilità nella risposta fenotipica al trattamento con albuterolo. Dei 724 pazienti arruolati, 662 soggetti sono stati genotipizzati per 906,600 SNPs mediante il chip *genome-wide* human SNP Array 6.0 prodotto da Affymetrix. Dall'analisi di associazione *genome-wide* sono stati identificati i 100 top SNPs associati all'*outcome* primario sulla base di ciascuna delle due definizioni utilizzate. Tra gli SNPs emersi come associati alla BDR sia secondo la prima definizione che sulla base della seconda definizione ("SNPs comuni"), sono stati selezionati 50 top SNPs che sono stati successivamente validati in una seconda coorte di pazienti (*coorte di replicazione*) costituita da 439 soggetti adulti affetti da asma moderata-severa ed in trattamento con  $\beta$ 2-agonisti a breve durata d'azione.

Dei 906,600 polimorfismi genotipizzati, 444.088 SNPs (MAF>5%) sono stati valutati nell'analisi statistica di associazione *genome-wide* condotta all'interno della coorte esplorativa. Come descritto nei metodi, dopo aver selezionato i 100 top SNPs statisticamente associati a ciascuna delle due differenti definizioni di BDR, sono stati identificati i "50 top SNPs comuni" alle due liste di varianti correlate all'*endpoint* in studio. Dopo controllo di qualità, 42 di queste 50 varianti sono state genotipizzate nella coorte di replicazione ma solo 5 di

queste si sono riconfermate come statisticamente associate all'*outcome* ( $P < 0.05$ ). Tutte le 5 varianti sono in modesto *linkage disequilibrium* tra loro e risultano essere localizzate in un regione del cromosoma 2p16.2, prossima al gene ASB3/SOCS. Dall'analisi statistica effettuata combinando la coorte esploratoria con quella di replicazione emerge che quattro delle 5 varianti precedentemente validate raggiungono la significatività statistica *genome-wide* (rs350729,  $P = 2.21 \times 10^{-10}$ ; rs1840321,  $P = 5.75 \times 10^{-8}$ ; rs1384918,  $P = 9.3 \times 10^{-8}$ ; rs1319797,  $P = 3.95 \times 10^{-8}$ ). Per ciascuno di questi SNPs (rs350729, rs1840321, rs1384918, rs1319797) si evidenzia una riduzione media di circa il 20% della BDR da salbutamolo nei soggetti omozigoti per l'allele mutato rispetto a quelli omozigoti *wild-type*. Un'analisi informatica supplementare condotta utilizzando il database SCAN ha inoltre identificato una forte interazione ( $P < 1 \times 10^{-4}$ ) tra SNP rs350729 e l'espressione di 52 geni, tra i quali emergono i geni ASB3 e ADRB2.

Gli Autori osservano che il gene ASB3, strettamente correlato alle varianti emerse come statisticamente associate alla BDR, appartiene alla famiglia di geni ASB, primariamente espressi nel muscolo scheletrico ed il cui livello di espressione sembra essere fortemente influenzato dall'azione dei  $\beta$ -agonisti. Tra le varie funzioni esercitate, tale famiglia di geni sembra svolgere un ruolo nella regolazione del turnover delle proteine e dello sviluppo delle cellule muscolari, stimolando la sintesi delle proteine ed il differenziamento delle cellule muscolari. Nello specifico, il gene ASB3 codifica per una proteina (*Ankyrin repeat and SOCS box protein 3*) che svolge un ruolo di controllo nell'induzione della risposta ipertrofica nei muscoli sottoposti a carichi. Il ruolo di tale gene nella regolazione della funzionalità muscolare sembra quindi spiegare, da un punto di vista fisiologico, la plausibilità dell'impatto di tale gene sulla risposta broncodilatatoria indotta da  $\beta$ 2-agonisti a breve durata d'azione.

Questo studio di associazione *genome-wide*, identifica, per la prima volta, quattro varianti nel locus 2p16.2 statisticamente correlate alla risposta broncodilatatoria indotta da salbutamolo in pazienti affetti da asma moderata-grave.

Nonostante le varianti genetiche localizzate nel cromosoma 2p16.2 siano emerse come correlate alle risposta al trattamento con  $\beta$ 2-agonisti a breve durata d'azione è plausibile che la medesima correlazione possa essere altrettanto significativa nel caso di BDR indotta da  $\beta$ 2-agonisti a lunga durata d'azione. Ulteriori studi quindi necessari al fine di validare la correlazione delle varianti geniche identificate con la risposta broncodilatatoria indotta da  $\beta$ 2-agonisti a breve e a lunga durata d'azione.

**Parole chiave:** asma, salbutamolo, cromosoma 2p16.2, ASB3

#### Riferimento bibliografico

Israel E et al. *Am J Respir Crit Care Med* 2015 Jan 6 [Epub ahead of print].

---

## IL TRATTAMENTO CON CORTICOSTEROIDI PER VIA INALATORIA MODULA L'EFFETTO DI VARIANTI DEL GENE ZNF432 SULLA RISPOSTA AI BRONCODILATATORI NEGLI ASMATICI

A cura della Dott.ssa Valeria Conti

Alcuni polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) influenzano la risposta al trattamento con corticosteroidi per via inalatoria (ICS) e  $\beta$ 2-agonisti nel paziente asmatico. Un esempio è dato dallo SNP rs242941, nel gene che codifica per il recettore dell'ormone adrenocorticotropo per il quale diversi trial clinici hanno dimostrato un'associazione dell'allele minore con la risposta favorevole ai corticosteroidi sia negli adulti, sia nei bambini. In aggiunta ai polimorfismi che influenzano la risposta terapeutica agli ICS o ai  $\beta$ 2-agonisti, i ricercatori di questo studio avevano dimostrato in precedenza che un polimorfismo nel gene per l'adenilatociclasa 9 poteva predire il grado di risposta ai  $\beta$ 2-agonisti e che tale risposta veniva significativamente aumentata se venivano co-somministrati ICS. Partendo da questi dati preliminari, l'obiettivo di questo lavoro è stato quello di testare l'ipotesi che la terapia con ICS possa influenzare l'effetto di molteplici SNPs sulla risposta broncodilatatrice mediata dai  $\beta$ 2-agonisti (*BronchoDilatorResponse, BDR*).

La popolazione in studio era rappresentata da una percentuale di pazienti arruolati durante lo studio *Childhood Asthma Management Program (CAMP)*, un trial eseguito su 1041 bambini (da 4 a 6 anni d'età) affetti da asma e randomizzati al trattamento con budesonide, nedocromil o placebo. I pazienti *CAMP* trattati con budesonide hanno costituito il braccio *ICS*, mentre i pazienti trattati con nedocromil e con il placebo, il braccio *non-ICS*. Dopo 48 mesi dalla randomizzazione, in tutti i pazienti è stata valutata la BDR e il DNA per la genotipizzazione è stato ottenuto da 581 individui. Uno studio di replicazione è stato invece condotto in pazienti adulti arruolati durante il *Trial Leukotriene Modifier or Corticosteroid or Corticosteroid-Salmeterol Trial (LOCCS)*. Per quanto riguarda questa coorte, i pazienti sono stati suddivisi in due gruppi sulla base di una semplice intervista: i pazienti che avevano dichiarato di assumere ICS quotidianamente oppure da 2 a 6 volte al mese sono stati raggruppati nel braccio *ICS*, mentre i pazienti che avevano dichiarato di assumere ICS meno di una volta al mese o mai, nel braccio *non-ICS*. Tutti i pazienti *LOCCS* sono stati randomizzati ad assumere fluticasone, montelukast, oppure una terapia di combinazione fluticasone-salmeterolo per 4 settimane alla fine delle quali sono stati misurati i valori di BDR.

Per l'analisi dei polimorfismi è stato utilizzato un approccio genome-wide mediante la tecnologia *Illumina's HumanHap550 GenotypingBeadChip*. Alla fine sono stati presi in considerazione 12 SNPs ed è stata eseguita un'analisi quantitativa di microarray per misurare l'espressione dei loci genici in risposta alla terapia con ICS in linee cellulari linfoblastoidi isolate da 151 pazienti *CAMP* e trattate con desametasone. Dopo sei ore di trattamento, i livelli di espressione sono stati misurati mediante la tecnologia *Illumina HumanRef8 v2BeadChip*.

L'età media dei pazienti del Trial *CAMP* era di 8 anni, quella dei soggetti del Trial *LOCCS* era di 40 anni. Il valore medio di BDR nei pazienti del gruppo *ICS* era pari a 8,7% nei pazienti *CAMP* e 6,5% nei *LOCCS*. Gli SNPs strettamente associati alla risposta broncodilatatrice mediata dai  $\beta_2$ -agonisti nei pazienti trattati con *ICS* erano localizzati nei cromosomi 19 e 8. I pazienti omozigoti per la presenza della variante rs3752120 che non erano trattati con *ICS* mostravano una BDR maggiore dei pazienti omozigoti per tale SNP trattati con *ICS*. Inoltre, lo SNP rs11666341 era associato a un'espressione variabile del gene *ZNF432*.

Questo studio è stato eseguito in una popolazione pediatrica e replicato in una popolazione adulta, quindi i risultati possono essere generalizzati ai pazienti asmatici di età diverse. È stato dimostrato, in accordo con studi precedenti, che l'effetto sinergico tra gli *ICS* e i  $\beta_2$ -agonisti è mediato da geni specifici localizzati nel cromosoma 19, in particolare da un gene che codifica per la proteina zinc-finger *ZNF432*. I pazienti portatori di 2 copie del polimorfismo rs3752120-*ZNF432* che non assumevano *ICS* mostravano una BDR maggiore degli individui che erano in terapia con *ICS*. L'analisi quantitativa di microarray eseguita in cellule dei pazienti portatori del polimorfismo rs11666341-*ZNF432* e trattate con desametasone, ha suggerito che tale SNP è associato a un'espressione variabile del gene *ZNF432*. In particolare, le cellule isolate da pazienti omozigoti per l'allele maggiore di tale variante mostravano i livelli di espressione più bassi quando trattate con desametasone suggerendo che tale SNP influenza la BDR nei pazienti in terapia con *ICS*.

La funzione della proteina *ZNF432* è tuttora sconosciuta, ma è stato suggerito che altre proteine zinc-finger hanno un ruolo nell'asma. I pazienti portatori della variante rs3752120 che mostravano una BDR elevata potrebbero non aver bisogno della terapia corticosteroidica, ma l'implicazione clinica di questi risultati rimane da determinare. Una limitazione di questo studio è che durante i trial *CAMP* e *LOCCS* dai quali sono stati arruolati i pazienti, la terapia con *ICS* non è stata monitorata direttamente. Per questo motivo, non è possibile escludere che i pazienti (pediatrici) del gruppo *CAMP* fossero stati maggiormente aderenti al trattamento con *ICS* rispetto ai pazienti (adulti) della coorte di replicazione *LOCCS*.

Il trattamento con glucocorticoidi per via inalatoria modifica l'effetto di alcuni SNPs in geni codificanti per proteine zinc-finger sulla risposta broncodilatatrice mediata dai  $\beta_2$ -agonisti sia nei bambini sia negli adulti affetti da asma. L'implicazione clinica di questi risultati rimane sconosciuta e, per chiarirla, saranno necessari nuovi studi sia *in vivo* sia *in vitro*.

Parole chiave: dominio zinc-finger,  $\beta_2$ -agonisti, corticosteroidi, risposta broncodilatatrice.

Riferimento bibliografico

Wu AC et al. *J Allergy Clin Immunol* 2014, 133(3):723-8.e3.

## NEUROLOGIA

### L'APLOTIPO HLA-A\*02:01:01/-B\*35:01:01/-C\*04:01:01 ASSOCIATO AD ESANTEMA MACULO PAPULOSO INDOTTO DA LAMOTRIGINA IN PAZIENTI MESSICANI METICCI

*A cura della Dott.ssa Stefania Cheli*

Le reazioni avverse cutanee (cADRs) possono essere causate da diversi farmaci, inclusi i farmaci antiepilettici (AEDs). Le manifestazioni cliniche di cADRs possono variare da esantema maculo papulare (MPE) di gravità variabile, a reazioni cutanee gravi che possono costituire un pericolo per la vita, tra cui la sindrome di Stevens-Johnson (SJS), la necrolisi epidermica tossica (TEN) e la sindrome da ipersensibilità ai farmaci (HSS). Il più alto tasso di cADRs dovute ad AEDs si verificano con carbamazepina (CBZ), lamotrigina (LTG) e fenitoina (PHT). Le cADRs sono considerate un problema serio per i pazienti e per il sistema sanitario, in quanto imprevedibili e limitano o possono essere pericolose per la vita, durante la terapia con gli antiepilettici. Gli studi sulla prevenzione delle cADRs si sono concentrati sul locus dell'HLA. Le attuali evidenze mostrano che l'associazione tra l'allele HLA e le cADRs sono sottotipo specifiche e dipendono sia dall'AED sia dall'etnia della popolazione studiata. Ad oggi, non è stata riportata alcuna associazione tra un allele dell'HLA e la suscettibilità a AED-cADRs, che possa prevedere questo tipo di reazioni avverse nei pazienti messicani meticci (MM). Poiché l'improvvisa interruzione del farmaco AED a seguito di insorgenza di ADR può aumentare la frequenza delle crisi epilettiche e richiedere un'ospedalizzazione, l'identificazione di biomarcatori validi per prevenire le ADR è utile per la cura dei pazienti affetti da epilessia. Lo scopo di questo studio è di valutare, per la prima volta, una possibile associazione tra gli alleli dell'HLA di classe I e le cADRs indotte da AED nei pazienti MM.

Nello studio sono stati reclutati pazienti che hanno manifestato cADRs dopo trattamento con AED seguiti presso il centro clinico di epilessia dell'Istituto Nazionale di Neurologia e Neurochirurgia "Manuel Velasco Suárez" in Messico. Questo studio è stato approvato dal Comitato Etico locale ed è stato ottenuto il consenso informato scritto di tutti i partecipanti. Il gruppo di cADR indotte da AED consisteva di 21 pazienti MM (14 femmine e 7 maschi; età media:  $35 \pm 12$  anni). Le diagnosi di SJS/TEN e MPE sono state basate su manifestazioni cliniche, come precedentemente descritto in letteratura. In 17 pazienti (81%) è stato identificato il sottotipo MPE di cADR, mentre in 4 casi (19%) è stata diagnosticata la SJS. La gravità di cADR è stata classificata in base alla "Drug and Therapeutics Committees" dell'OMS. Il gruppo AED tollerante era composto da 31 pazienti (14 femmine e 17 maschi; età media:  $34 \pm 13$  anni), che sono stati in trattamento con AEDs per più di 1 anno senza subire cADRs (dosi medie: PHT  $270 \pm 109$ mg, CBZ  $681 \pm 283$ mg, e LTG  $213 \pm 101$ mg). Un gruppo di 225 volontari sani, non correlati, e di popolazione MM (età media:  $42 \pm 12$  anni; 53,3% femmine e 46,7% maschi) è stata inclusa nello studio. Tutti i soggetti inseriti nello studio erano MM per etnia, di almeno due generazioni precedenti, essendo nati e cresciuti in Messico, e con un cognome spagnolo. Il DNA di tutti i pazienti arruolati è stato isolato da campioni di sangue periferico ed è stata eseguita la genotipizzazione dell'HLA di classe I utilizzando le piastre di tipizzazione Micro SSP™ HLA DNA (SSP1L) e il software v.2.0 HLA Fusion™, entrambi della One Lambda Inc. (CA, USA). Per confermare gli alleli identificati, è stata eseguita la tecnica di tipizzazione ad alta risoluzione Sequencing Based Typing (SBT), e i dati sono stati analizzati mediante il software v.3.5 Assegna™ SBT (Conexio Genomics, Fremantle, Australia Occidentale) dal IMGT database. Gli aplotipi sono stati determinati utilizzando il software Arlequin v.3.5.1.3 e Allele Frequency Net Database. L'aplotipo rilevante è stato confermato da una triplice analisi. Le frequenze degli alleli dell'HLA osservate nel gruppo cADR indotte da AEDs sono state confrontate con quelle del gruppo tollerante alle AED. In base all'AED somministrato, i pazienti sono stati ulteriormente sotto classificati in due gruppi: sia secondo AED usato che al sottotipo di cADR. Nel gruppo cADR indotta da AED, 14 pazienti rientravano nel gruppo cADRs causate da LTG (10 con MPE e 4 con SJS, indotte da LTG); 4 nel gruppo MPE indotta da CBZ; uno nel gruppo MPE causata da PHT; un paziente, che ha riportato MPE indotta da CBZ e PHT in occasioni diverse, che è stato quindi incluso in entrambi i gruppi; infine un paziente ha manifestato pemfigo causato da levetiracetam (LEV). Grazie all'utilizzo della terapia combinata con diversi farmaci antiepilettici, i pazienti del gruppo dei AED tolleranti (n=31) sono stati inclusi in più di un'analisi di comparazione: 28 pazienti nel gruppo dei tolleranti

alla LTG; 18 nel gruppo tollerante alla CBZ; e cinque, nel gruppo tollerante alla PHT. Successivamente, le frequenze alleliche dell'HLA associate ad cADRs indotte da AED sono state confrontate con le frequenze alleliche riportate nella popolazione MM generale. E' stato utilizzato il software Epi Info™ 7.0 per eseguire il Test  $\chi^2$  corretto e non corretto. La significatività è stata definita come  $p < 0,05$ ; sono stati calcolati Odds ratio (OR) ed i relativi intervalli di confidenza al 95% (IC).

**cADRs indotte da AEDs.** Il più frequente induttore di cADRs tra i AED utilizzati nei pazienti MM inclusi nello studio è stata la LTG (14 pazienti; 66,7%), seguita da CBZ (4 pazienti, 19,0%), PHT (un paziente; 4,8%), e CBZ e PHT (un paziente; 4,8%), un paziente che ha manifestato un grave caso di pemfigo durante l'assunzione di LEV. Non è stata trovata alcuna differenza significativa circa il genere tra il gruppi con cADRs e il gruppo AED tollerante ( $p_c=0,2139$ ). Il confronto tra le frequenze degli alleli HLA-A e -C nel gruppo con cADR indotta da AED ( $n=21$ ) rispetto al gruppo dei pazienti tolleranti ( $n=31$ ) non ha mostrato alcuna differenza statisticamente significativa. Tuttavia, l'allele HLA-B\*58:01:01 è stato trovato con una frequenza maggiore nei pazienti con cADRs ( $p=0,0327$ ). Tre pazienti portatori di quest'allele hanno mostrato cADR: una MPE dovuta a CBZ, una MPE e una SJS indotte da LTG. **cADRs indotte da PHT.** Nei pazienti con cADRs ( $n=2$ ) causate da PTH sono stati identificati: 3 alleli HLA-A, 4 alleli HLA-B e 2 HLA-C. Nel gruppo dei tolleranti alla PHT ( $n=5$ ) sono stati individuati quattro, sette e cinque alleli HLA-A, -B e -C rispettivamente. La frequenza dell'allele HLA-C\*08:01 nel gruppo della cADR indotta da PHT era superiore, non solo a quella del gruppo dei tolleranti alla PHT ( $p=0,0020$ ;  $p_c=0,0179$ ), ma anche rispetto alla popolazione generale dei MM ( $p < 0,0001$ ;  $p_c < 0,0001$ ; OR: 48.92; 95% CI: 4.92–486.80). **cADRs indotte da CBZ.** Nei pazienti con cADR da CBZ ( $n=5$ ), sono stati identificati: 5, 10, 6 alleli HLA-A,-B,-C rispettivamente. Nel gruppo di pazienti CBZ tolleranti sono stati identificati: 9 alleli HLA-A, 18 alleli HLA-B e 10 alleli HLA-C. La frequenza degli alleli HLA-A\*01:01:01 ( $p=0,0280$ ; OR:7.29; 95% CI:1.02-52.01) e HLA-A\*31:01:02 ( $p=0,0061$ ) è risultata statisticamente significativa tra il gruppo cADR da CBZ e il gruppo tollerante. La differenza è rimasta significativa per entrambi gli alleli quando il confronto è stato fatto con la popolazione generale MM: HLA-A\*01:01:01 ( $p=0,0007$ ;  $p_c=0,0074$ ; OR:7.96; 95% CI:1.93–32.79) e per HLA-A\*31:01:02 ( $p=0,04$ ; OR:4.64; 95% CI:0.93–23.11). **cADRs indotte da LTG.** Nei 14 pazienti con cADRs causate da LTG sono stati identificati 9 HLA-A, 14 HLA-B, e 10 alleli HLA-C, mentre nel gruppo dei tolleranti alla LTG ( $n=28$ ), sono stati trovati 13 alleli HLA-A e HLA-C, e 23 alleli HLA-B. I pazienti con cADRs indotte da LTG ( $n=14$ ) sono stati classificati in due sottogruppi in base al sottotipo di cADR (MPE o SJS). Quando sono state confrontate le frequenze alleliche di ciascun sottogruppo con quelle dei tolleranti alla LTG e con la popolazione dei MM, nel gruppo con MPE indotta da LTG ( $n=10$ ), la frequenza dell'allele HLA-B\*35:01:01 è risultata superiore a quella del gruppo dei tolleranti ( $p=0,0215$ ,  $p_c=0,0537$ ; OR:4,37; 95% CI: 1,16-16,46), ma non è stata trovata alcuna differenza rispetto alla popolazione dei MM. Inoltre, è emersa una frequenza molto più alta di un aplotipo che include quest'allele (-A\*02:01:01/-B\*35:01:01/-C\*04:01:01) nel gruppo con MPE causata da LTG rispetto al gruppo dei tolleranti alla LTG ( $p=0,0009$ ,  $p_c=0,0048$ ; OR:18.33; 95% CI: 1,99-169,08); tale differenza è risultata significativa anche rispetto alla popolazione dei MM ( $p < 0,0001$ ,  $p_c < 0,0001$ ; OR:11.20; 95% CI: 3.54–35.48). Nei pazienti con SJS causata da LTG, le frequenze di quattro alleli HLA sono risultate superiori a quelli del gruppo dei tolleranti: HLA-A\*23:01:01 ( $p=0,0077$ ); HLA-B\*40:02:01 ( $p=0,0192$ ; OR:9; 95% CI: 1,07-76,02); HLA-B\*57:01:01 e HLA-B\*58:01:01 ( $p=0,0077$  per entrambi i casi). La frequenza dell'allele HLA-A\*23:01:01 non era statisticamente differente da quella della popolazione dei MM mentre per gli altri tre alleli, la differenza è rimasta statisticamente significativa: HLA-B\*40:02:01 ( $p=0,0245$ ; OR:5,44; 95% CI: 1,04-28,26), HLA-B\*57:01:01 ( $p=0,0107$ ; OR:10,57; 95% CI: 1,12-99,78), e HLA-B\*58:01:01 ( $p=0,0004$ ; OR: 21.29; 95% CI: 1,96-230,72). **Frequenze dell'allele HLA di classe I nella popolazione generale dei MM.** In un campione ( $n=225$ ) della popolazione generale dei MM sono stati identificati 37 alleli HLA-A, 55 alleli HLA-B e 22 HLA-C. La frequenza dell'allele HLA-B\*15:02 in questo campione è risultata di 0,889%.

I dati ottenuti suggeriscono che l'aplotipo HLA-A\*02:01:01/-B\*35:01:01/-C\*04:01:01 possa essere un biomarker per la MPE indotta da LTG e che l'allele HLA-C\*08:01 lo sia per la MPE causata da PHT. Inoltre sono stati individuati gli alleli candidati HLA-A\*01:01:01 e -A\*31:01:02 associati a MPE indotta da CBZ nei pazienti MM.

Questo è il primo studio che analizza l'associazione tra gli alleli dell'HLA di classe I e le cADRs indotte da AEDs nei pazienti MM. La principale limitazione sono le dimensioni ridotte del campione. Tuttavia, sono necessarie ulteriori indagini per confermare questi risultati.

**Parole chiave:** farmaci antiepilettici droga, carbamazepina, reazioni avverse cutanee, esantema maculo papulare, antigene leucocitario umano, lamotrigina, farmacogenetica

#### Riferimento bibliografico

Fricke-Galindo I et al. *Pharmacogenomics* 2014, 15(15):1881-91

## CARDIOVASCOLARE

### IL POLIMORFISMO RS13064411 DEL GENE *WDR52*, ASSOCIATO AI LIVELLI DI PCSK9, MODIFICA I CAMBIAMENTI NEI LIVELLI SIERICI DI COLESTEROLO TOTALE E LDL INDOTTI DA STATINE

A cura della Dott.ssa Giusy Russomanno

Le statine sono farmaci in grado di ridurre i livelli di colesterolo largamente prescritti per la prevenzione primaria e secondaria delle malattie cardiovascolari. Le statine agiscono principalmente sui livelli sierici di colesterolo LDL interferendo con il metabolismo del colesterolo attraverso l'inibizione della 3-idrossi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasi. Tale inibizione comporta una iper-regolazione dei recettori epatocitari per le LDL, con conseguente aumento dell'assorbimento di colesterolo LDL dal siero e riduzione del colesterolo sierico (Shepherd J et al. *N Engl J Med* 1995,333:1301–07). Nella pratica clinica, si osserva frequentemente una notevole differenza interindividuale in termini di risposta ipocolesterolemizzante in seguito a trattamento con statine. Fattori genetici potrebbero essere in grado di spiegare, almeno in parte, tale variabilità. Diversi polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) sono stati associati alla risposta al trattamento con statine. Ad esempio, la variante E2 dell'apolipoproteina (*APOE*) è stata associata a maggiore riduzione di colesterolo LDL sia in studi di geni candidati che in studi di associazione sull'intero genoma (Thompson JF et al. *Pharmacogenomics J* 2005,5:352–58; Thompson JF et al. *Circ Cardiovasc Genet* 2009,2:173–81).

La proproteina convertasi subtilisina/kexina di tipo 9 (PCSK9) è coinvolta nell'omeostasi del colesterolo e promuove la degradazione del recettore per le LDL. Nel fegato, PCSK9 si lega al recettore per le LDL e viene internalizzata insieme al recettore. Il legame con PCSK9 induce modifiche nella conformazione del recettore che ne alterano la normale attività e ne aumentano la degradazione lisosomiale. Tale riduzione nel numero di recettori per le LDL a livello epatocitario è responsabile dell'aumento del colesterolo LDL plasmatico. Infatti, è stata dimostrata una correlazione positiva tra i livelli sierici di PCSK9 e quelli di colesterolo LDL e totale (Alborn WE et al. *Clin Chem* 2007,53:1814–19). Inoltre, è noto che le concentrazioni sieriche di PCSK9 risultano aumentate in seguito a terapia con statine (Welder G et al. *J Lipid Res* 2010,51:2714–21). Negli ultimi anni l'interesse verso l'influenza di PCSK9 sul metabolismo del colesterolo e l'interazione con le statine è notevolmente aumentato, e di recente sono stati sviluppati inibitori di PCSK9 come potenziali farmaci per riduzione del colesterolo LDL, in associazione alle statine o meno (Giugliano RP et al. *Lancet* 2012,380:2007–17).

In un recente studio *genome-wide*, il polimorfismo rs13064411 nel gene *WD repeat domain 52 (WDR52)* è stato significativamente correlato alla variazione dei livelli plasmatici di PCSK9 indotta da statine e ad alterata risposta ipocolesterolemizzante (Theusch E et al. *Pharmacogenet Genomics* 2014,24:492–500). In particolare, l'allele minore è stato associato a maggiore incremento simvastatina-indotto delle concentrazioni di PCSK9 rispetto al genotipo omozigote portatore dell'allele maggiore.

Obiettivo del presente studio è stato verificare l'associazione tra l'allele minore del polimorfismo rs13064411 nel gene *WDR52* e la terapia con statine, valutando l'effetto dell'allele sul colesterolo totale, LDL e HDL nel siero in un'ampia coorte in trattamento o meno con statine.

Lo studio è stato condotto nell'ambito del Rotterdam Study, uno studio di coorte prospettico, il cui obiettivo era studiare la frequenza e i determinanti delle patologie in soggetti di almeno 55 anni (Hofman A et al. *Eur J Epidemiol* 2013,28:889–926) del distretto di Ommord (Rotterdam). La popolazione presa in esame era composta da tutti i soggetti delle tre coorti del Rotterdam Study per i quali fossero disponibili il DNA e almeno un valore di colesterolo (totale, LDL o HDL) dal 1 gennaio 1997 al 18 agosto 2011. La determinazione dei livelli sierici di colesterolo è stata effettuata dallo "Star-Medisch Diagnostisch Centrum" (Star-MDC), Rotterdam, e i dati relativi all'assunzione di statine e farmaci concomitanti sono stati ottenuti dalle sette farmacie computerizzate del distretto. Prescrizioni ripetute entro 7 giorni dalla precedente sono state considerate come uso continuo.

L'effetto del polimorfismo sulla risposta alle statine è stato valutato confrontando la differenza nei livelli di colesterolo (delta) tra i soggetti in terapia e non, stratificati per genotipo. Età, sesso e la dose giornaliera prescritta sono stati considerati potenziali fattori di confondimento e quindi inclusi nell'analisi come covariate. Per confrontare le dosi delle diverse statine, la dose giornaliera è stata espressa come dose definita die (DDD). Soggetti non caucasici sono stati esclusi dall'analisi.

Sono stati inclusi nello studio 1105 soggetti in trattamento con statine durante il follow-up, 322 soggetti in precedente trattamento con statine e 4831 soggetti mai trattati. La simvastatina è risultata la statina più frequentemente assunta. Per ogni paziente è stato possibile ottenere più determinazioni del colesterolo sierico (mediana 4.1±3.8). La frequenza dell'allele minore del polimorfismo rs13064411 era del 14.9% e le frequenze genotipiche erano all'equilibrio di Hardy-Weinberg sia nei pazienti in trattamento che non ( $P=0.06$  e  $0.18$ , rispettivamente).

Nei portatori dell'allele minore G in trattamento con statine si osservava significativa riduzione della risposta ipocolesterolemizzante rispetto agli omozigoti AA. Comparando i soggetti in trattamento con quelli non in trattamento con lo stesso genotipo, il colesterolo LDL medio era 0.720 mmol/l inferiore negli omozigoti portatori dell'allele maggiore, 0.566 mmol/l inferiore negli eterozigoti e 0.565 mmol/l inferiore negli omozigoti portatori dell'allele minore. L'interazione tra il numero di alleli minori e l'uso di statine è risultata statisticamente significativa per gli eterozigoti ( $P_{\text{int}}=4.0 \times 10^{-5}$ ), ma non per gli omozigoti portatori dell'allele minore ( $P_{\text{int}}=0.094$ ). Nei soggetti in trattamento rispetto ai soggetti non in trattamento, il colesterolo totale medio era 0.732 mmol/l inferiore negli omozigoti portatori dell'allele maggiore, 0.561 mmol/l inferiore negli eterozigoti e 0.471 mmol/l inferiore negli omozigoti portatori dell'allele minore. L'interazione tra il numero di alleli minori e l'uso di statine era statisticamente significativo sia per gli eterozigoti ( $P_{\text{int}}=6.0 \times 10^{-6}$ ) che per gli omozigoti portatori dell'allele minore ( $P_{\text{int}}=0.005$ ). Nessuna correlazione significativa è stata riscontrata tra il polimorfismo e il colesterolo HDL.

Stratificando la popolazione in studio in base alla dose media di statina assunta e in base al sesso, l'interazione tra il polimorfismo rs13064411 e lo stato di utilizzatore corrente era più rilevante nel caso di dosaggi più elevati ( $\text{DDD}>1.00$ ) ( $P_{\text{int}}=7.0 \times 10^{-5}$  per il colesterolo LDL;  $P_{\text{int}}=0.081$  per il colesterolo totale) e nelle donne ( $P_{\text{int}}=2.0 \times 10^{-5}$  per il colesterolo LDL;  $P_{\text{int}}=8.0 \times 10^{-6}$  per il colesterolo totale). I risultati ottenuti erano indipendenti dalla statina assunta (simvastatina, atorvastatina, pravastatina, fluvastatina, rosuvastatina). Nei soggetti che non avevano mai assunto statine, non vi era significatività di associazione tra la presenza dell'allele minore e colesterolo totale, LDL o HDL.

In questo studio, quindi, è stata dimostrata una significativa interazione tra il polimorfismo rs13064411 e l'effetto della terapia con statine sulla concentrazione del colesterolo totale e LDL. Comparando pazienti in corso di trattamento con pazienti non più in trattamento e soggetti mai trattati aventi lo stesso genotipo, nei pazienti in corso di trattamento portatori dell'allele minore, il delta colesterolo LDL e il delta colesterolo totale erano in media 0.154 mmol/l e 0.181 mmol/l inferiori rispetto agli omozigoti portatori dell'allele maggiore. Il polimorfismo non è stato associato ai livelli di colesterolo nei soggetti mai trattati con statine, dimostrando che questo polimorfismo modifica solo la risposta alla terapia con statine. Considerando che le statine inducono un aumento dei livelli di PCSK9, nei pazienti portatori di almeno un allele minore in trattamento si osserva una maggiore degradazione del recettore per le LDL, con conseguente riduzione dell'assorbimento di colesterolo LDL dal siero e ridotta risposta ipocolesterolemizzante. L'effetto del polimorfismo si è dimostrato molto più marcato nelle donne, probabilmente per i livelli sierici basali di PCSK9 più alti. Purtroppo, non essendo disponibili i livelli di PCSK9 nell'ambito del Rotterdam Study, gli autori non sono stati in grado di approfondire questo aspetto. Considerata la notevole variabilità nella

risposta al trattamento con statine e il recente sviluppo di inibitori di PCSK9, potrebbe essere di notevole importanza determinare se i pazienti portatori dell'allele minore del polimorfismo rs13064411, che rispondono meno al trattamento con la sola statina, possano invece beneficiare maggiormente della combinazione con un inibitore di PCSK9.

Nel Rotterdam Study, il polimorfismo rs13064411 nel gene *WDR52* è stato significativamente associato a variazione nella risposta al trattamento con statine in termini di livelli di colesterolo LDL e totale. L'allele minore G, con una frequenza allelica del 14.9%, è stato associato a significativa riduzione della risposta ipocolesterolemizzante con statine, e tale effetto è più marcato nelle donne in trattamento con statine ad alte dosi (DDD>1.00).

**Parole chiave:** colesterolo, inibitori della HMG-CoA reduttasi, PCSK9, farmacogenetica, rs13064411

#### Riferimento bibliografico

de Keyser CE et al. *Pharmacogenet Genomics* 2015, 25(3):134-42.

## LA METANALISI DEL MESE

### RUOLO DELLE VARIANTI GENETICHE DI TPMT E COMT ASSOCIATE AD OTOTOSSICITÀ INDOTTA DA CISPLATINO IN PAZIENTI CON CANCRO: STUDIO SU DUE NUOVE COORTI E META-ANALISI

A cura del Dott. Vittorio Simeon

Circa il 40-60% dei pazienti trattati con cisplatino sviluppa ototossicità che rappresenta una delle principali cause di riduzione della dose o di interruzione del trattamento con cisplatino. I fattori di rischio clinico per lo sviluppo della tossicità indotta da cisplatino comprendono età alla diagnosi inferiore ai 5 anni, terapia concomitante con carboplatino, alti dosi cumulative di cisplatino, radiazioni al cranio e preesistente disfunzione renale. Tuttavia, questi fattori clinici non sono sufficienti per predire in modo affidabile l'ototossicità prima dell'inizio del trattamento. Uno studio di associazione di polimorfismi in geni candidati condotto su 166 pazienti pediatrici ha analizzato le varianti genetiche dei geni tiopurina S-metiltransferasi (TPMT) e catecol-O-metiltransferasi (COMT) ([Ross et al., 2009](#)). Tale studio ha evidenziato un possibile ruolo di queste varianti nella predizione dello sviluppo dell'ototossicità indotta da cisplatino. Due studi recenti, disegnati con lo scopo di validare questi risultati, hanno mostrato invece risultati inconsistenti. Nello studio di [Pussegoda e colleghi](#) (2013) condotto su 155 pazienti è stata confermata, anche se con un effetto inferiore, l'associazione del gene TPMT. Al contrario, non è stata evidenziata nessuna associazione in uno studio condotto su 213 pazienti con medulloblastoma ([Yang et al., 2013](#)). Nello studio qui descritto, gli Autori hanno verificato l'impatto di queste varianti genetiche sullo sviluppo dell'ototossicità in pazienti trattati con cisplatino. A tale scopo sono state studiate due nuove popolazioni indipendenti di 110 (Olanda) e 38 (Spagna) pazienti con osteosarcoma ed è stata condotta una meta-analisi con gli studi precedentemente pubblicati su una popolazione complessiva di 664 pazienti.

#### Coorte Olandese e Spagnola

La coorte Olandese era composta da pazienti con osteosarcoma ad alto-gradato trattati con una dose mediana cumulativa di 500 mg/m<sup>2</sup> di cisplatino (range: da 100 a 600 mg/m<sup>2</sup>). La coorte spagnola era invece composta da 38 pazienti con osteosarcoma trattati con regime terapeutico a base di cisplatino. Per prevenire un bias di popolazione, queste due coorti sono state analizzate separatamente. Sono stati raccolti anche i dati riguardanti il trattamento con altri farmaci potenzialmente ototossici. In entrambe le coorti la valutazione audiometrica era effettuata prospetticamente alla diagnosi, durante la terapia e dopo il completamento della stessa. La perdita dell'udito è stata classificata retrospettivamente in accordo con i sistemi di valutazione del National Cancer Institute CTCAE (versione 3) e la nuova scala di valutazione SIOP Boston che classifica la

perdita di udito su 4 livelli. Sono state genotipizzate le varianti precedentemente associate di TPMT (rs12201199, rs1800460, rs1142345) e di COMT (rs4646316, rs9332377) utilizzando il saggio di discriminazione allelica Taqman. In entrambe le coorti, sono state analizzate le differenze statistiche dei dati demografici tra pazienti con perdita dell'udito (casi; >20 dB di perdita dell'udito) e pazienti senza perdita dell'udito ( $\leq 20$  dB). L'associazione tra ototossicità e potenziali confondenti, come età, genere, dose cumulativa di cisplatino e concomitante terapia con altri farmaci, è stata valutata con l'utilizzo di modelli di regressione logistica o lineare. Per la valutazione dell'effetto delle varianti, i dati di ototossicità sono stati dicotomizzati in grado 0 vs grado 2-4.

Dei 110 pazienti della coorte olandese con nuova diagnosi di osteosarcoma, 42 (38.2%) hanno sviluppato perdita dell'udito. Non c'erano differenze statisticamente significative tra le caratteristiche al baseline di questi pazienti. Nessuno dei pazienti inclusi era stato sottoposto a radioterapia al cranio o a concomitante trattamento con antibiotici ototossici. In 23 pazienti (20.9%) la dose cumulativa è stata ridotta per ototossicità (n=9) o per altre tossicità indotte dal cisplatino (n=14). L'analisi univariata non ha mostrato alcuna associazione con ototossicità dei fattori non-genetici: età (p=0.73) e dose cumulativa di cisplatino (p=0.99). A prescindere dal sistema di classificazione della tossicità (CTCAE o SIOP), l'analisi di associazione genetica, utilizzando un modello additivo e correggendo per l'uso di vincristina, non ha evidenziato alcuna associazione con le varianti polimorfiche di TPMT e COMT.

Anche nella coorte spagnola non c'erano differenze statisticamente significative nelle caratteristiche cliniche dei pazienti, come età, genere o dose cumulativa di cisplatino. In questa coorte 6 pazienti avevano ricevuto vincristina in terapia concomitante e 23 avevano ricevuto antibiotici ototossici, come vancomicina, gentamicina o tobramicina. All'analisi univariata, l'utilizzo di questi antibiotici non risultava essere un fattore confondente per lo sviluppo di ototossicità (p=0.74). Data la bassa numerosità di questa popolazione e per evitare ogni tipo di bias, l'analisi del genotipo è stata effettuata come coorte indipendente nello studio di meta-analisi.

#### Meta-analisi

Dopo analisi della letteratura effettuata in PubMed utilizzando le parole chiave 'ototossicità', 'TPMT' e 'COMT', la meta-analisi è stata condotta su tre lavori precedentemente pubblicati ([Ross et al., 2009](#); [Pussegoda et al., 2013](#); [Yang et al., 2013](#)) e sulle due coorti presenti in questo lavoro. Per ognuno dei 5 lavori è stato utilizzato il criterio di classificazione CTCAE, escludendo i pazienti con grado di tossicità 1 per avere una distinzione più netta tra ototossicità e capacità uditive normali. È stato utilizzato il metodo della varianza inversa per attribuire un peso agli studi in analisi e l'eterogeneità è stata valutata con la statistica  $I^2$ . L'odds ratio (OR) allelico è stato calcolato in ogni coorte utilizzando un modello ad effetti fissi o ad effetti casuali se presente una eterogeneità maggiore del 50% ( $I^2 > 50\%$ ). Nella popolazione complessiva, composta da 664 pazienti, l'unico polimorfismo associato in maniera significativa ad ototossicità era rs4646316 del gene COMT (OR allele A vs T: 1.52, 95% CI: 1.16-1.99, p=0.003). Il test di eterogeneità ha mostrato valori non statisticamente significativi con una  $I^2$  del 31%.

Questo lavoro rappresenta al momento la più ampia meta-analisi per quanto riguarda l'impatto di varianti polimorfiche nei geni TPMT e COMT sullo sviluppo di ototossicità indotta da cisplatino. Il principale limite dello studio è rappresentato dal numero limitato di pazienti. Inoltre, nelle coorti in cui era evidente un'associazione, i pazienti differivano per tipologia di tumore (9 e 12 tipi, rispettivamente in [Ross et al.](#) e [Pussegoda et al.](#)) e conseguentemente per approccio farmacologico. Inoltre, l'uso di agenti protettivi tra cui amifostina, in maniera non uniforme tra gli studi, potrebbe essere un ulteriore potenziale fattore di confondimento. Gli studi inclusi in questa meta-analisi presentano pertanto variabili di confondimento che possono aver influenzato l'associazione delle varianti geniche con lo sviluppo di ototossicità.

Il polimorfismo rs4646316 del gene COMT è associato in maniera significativa ad ototossicità (OR allele A vs T: 1.52, 95% CI: 1.16-1.99, p=0.003). Tuttavia, tenuto conto delle limitazioni dello studio, al momento non è raccomandabile l'analisi delle varianti genetiche di TPMT e COMT nella pratica clinica.

**Parole chiave:** cisplatino, ototossicità, TPMT, COMT

#### **Riferimento bibliografico**

[Hagleitner MM](#) et al. *PLoS One* 2014, 9(12):e115869.



### 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](mailto:sif.informazione@segr.it); [sif.farmacologia@segr.it](mailto: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](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 Donatella Carretta (Università di Bologna) Dott.ssa Stefania Cheli (AO Polo Universitario "L. Sacco" di Milano) Dott.ssa Valeria Conti (Università di Salerno) Dott.ssa Eva Cuzzoni (Università di Trieste) Dott.ssa Sara De Iudicibus (Università di Trieste) Dott.ssa Lucia Gozzo (Università di Catania) Dott.ssa Gloria Ravegnini (Università di Bologna) Prof.ssa Patrizia Romualdi (Università di Bologna) Dott.ssa Giusy Russomanno (Università di Salerno) Dott.ssa Giulia Sammarini (Università di Bologna) Dott. Vittorio Simeon (IRCCS – CROB) 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](mailto:webmaster@sifweb.org)

---

### DISCLAMER – Leggere attentamente

SIF, Società Italiana di Farmacologia, si propone di pubblicare sul proprio sito internet [www.sifweb.org](http://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@segr.it](mailto:sif.farmacologia@segr.it) con oggetto: CANCELLA.

---

---