



---

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

---

## Sommario

### ⇒ Oncologia

- Sviluppo e validazione clinica in cieco di un predittore di risposta, basato su un microRNA, al trattamento con R-CHO(E)P in DLBCL
- Contributo della farmacogenetica come strumento predittivo di risposta al trattamento chemioterapico nell'osteosarcoma: un primo passo verso la medicina personalizzata

### ⇒ Immunomodulazione

- ABCB1 (MDR-1) e farmacogenetica di tacrolimus in pazienti con trapianto renale: un approccio *next generation sequencing*
- MiRNAs circolanti come potenziali biomarkers dell'efficacia del trattamento anti-TNF $\alpha$  in pazienti affetti da artrite reumatoide
- Sequenziamento esonico e analisi di ibridazione genomica comparativa basata sugli array di pazienti che producono preferenzialmente 6-metilmercaptapurina

### ⇒ Infettivologia

- *Direct PCR*: un nuovo approccio farmacogenetico per uno *screening* economico dell'allele HLA-B\*57:01

### ⇒ Cardiovascolare

- Fattori di rischio genetici, insorgenza di eventi cardio-coronarici e beneficio clinico del trattamento con statine: un'analisi di studi di prevenzione primaria e secondaria

### ⇒ Neurologia

- Il polimorfismo *chrna4* rs1044396 è associato alla cessazione del fumo di sigaretta nei pazienti in terapia con vareniclina

---

## ONCOLOGIA

### **SVILUPPO E VALIDAZIONE CLINICA IN CIECO DI UN PREDITTORE DI RISPOSTA, BASATO SU UN MICRORNA, AL TRATTAMENTO CON R-CHO(E)P IN DLBCL**

A cura della Dott.ssa Giulia Sammarini

Il Linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL) rappresenta il 40% dei Linfomi non-Hodgkin negli adulti. È caratterizzato da una marcata eterogeneità biologica e una variabilità nella presentazione e nel decorso clinici. Il trattamento standard con R-CHOP (rituximab, ciclofosfamide, idrossidaunorubicina / adriamicina,

vincristina e prednisone) in prima linea è piuttosto efficace, infatti, oltre l'80% dei pazienti rispondono a questo tipo di trattamento. Il DLBCL rappresenta uno dei primi successi per microarrays basati sull'mRNA. In questo studio, gli autori hanno caratterizzato il trascrittoma dei microRNA nel pannello di linee cellulari NCI60 e questo gli ha permesso di scoprire i profili di due miRNA i cui livelli di espressione sono correlati alla sensibilità al trattamento combinato CHOP e CHOEP (protocollo che prevede anche l'uso di etoposide), i più utilizzati per il trattamento di DLBCL.

Sono stati arruolati 130 pazienti di prima diagnosi per DLBCL trattati con CHOP o CHOEP fra il 2002 e il 2010, i cui tessuti erano disponibili presso una biobanca locale al Rigshospitalet. La risposta clinica (CR) è stata definita come la normalità biochimica, dei linfonodi e del midollo osseo. La CRu è stata classificata come una CR avente però un residuo di massa tumorale di circa 1.5 cm che è stato ridotto più del 75% e in cui il midollo osseo ha subito un incremento nel numero e nella dimensione degli aggregati linfoidi non presentanti anomalie citologiche e istologiche. PR è stata definita come la riduzione del 50% della dimensione dei linfonodi senza la presenza di nuove lesioni; PD rappresenta, invece, lo sviluppo di nuove lesioni con un aumento delle dimensioni dei linfonodi superiore al 25%. Infine, SD è stata definita come una condizione in cui non vi sono né progressione né cambiamento di stato, mentre la ricaduta rappresenta la comparsa di una nuova lesione o un ingrossamento di più del 50% in uno dei noduli identificati in precedenza.

Per l'analisi sono stati scaricati dal sito web DTP i risultati di inibizione della crescita per 60 linee cellulari sottoposte a trattamento con ciclofosfamide, vincristina o doxorubicina; di questi, sono stati calcolati i logaritmi della concentrazione di farmaco che inibisce la crescita del 50% (GI50) che sono stati poi sommati per poterli correlare con i livelli di espressione dei microRNA misurati usando un array Affymetrix per microRNA. Fra questi, 20 miRNA aventi una correlazione di Pearson superiore allo 0.25 sono stati considerati biomarker di sensibilità e ritenuti responsabili del profilo responsivo al trattamento CHOP; in seguito, il medesimo procedimento è stato eseguito per CHOEP portando alla scoperta di 30 miRNA coinvolti nella risposta al trattamento.

Sono stati identificati 20 miRNA che risultano sovraespressi nelle linee cellulari sensibili a doxorubicina, vincristina e ciclofosfamide, con i primi due valori più influenti sul profilo dei microRNA. I livelli di espressione dei microRNA sono stati convertiti in un unico valore indicante la sensibilità totale, che può essere così impiegato per predire la sensibilità di un paziente al trattamento con CHOP analizzando i 20 microRNA con la biopsia di un campione tumorale. Per definire se i valori trovati fossero predittivi (risposta clinica) o prognostici (sopravvivenza), essi sono stati confrontati con l'Indice Internazionale di Prognosi (IPI), comunemente utilizzato per i pazienti con DLBCL.

Tredici pazienti hanno avuto una ricaduta e quindi sono stati curati con il trattamento idoneo: la seconda e la terza linea di trattamento consistono nell'uso combinato di vari protocolli terapeutici (COPE, DHAP, CVP, HDMTX o MVBCNSI). Dei 13, i 5 considerati sensibili al trattamento di seconda o terza linea sono sopravvissuti molto più a lungo (1194 giorni) rispetto agli 8 pronosticati non responsivi (187 giorni).

Gli autori dello studio hanno poi analizzato le interazioni fra i 20 miRNA che costituiscono il profilo di CHOP e i geni cellulari utilizzando NCBI Gene. È stato quindi dimostrato che il miR-106b esclude il danno al DNA indotto dalla doxorubicina; questo gene, insieme al miR-93 e al miR-25 forma un cluster, tutti espressi nello stesso introne. È da notare però, che dei 20 microRNA definiti predittivi di risposta al trattamento con CHOP, solo 4 risultano essere correlati a pathways noti.

Gli autori hanno concluso che la sensibilità, o la resistenza, delle linee cellulari ai farmaci dipendono maggiormente dalla presenza o meno di mutazioni che determinano gli esiti della risposta e possono interessare il profilo generale dei microRNA. La sensibilità dei predittivi di CHOP è molto più accurata verso questo trattamento che non verso quello con CHOEP e viceversa, quindi questo apre la possibilità di impiegare dei predittivi specifici per una particolare cura per selezionare il miglior trattamento secondario o terziario.

Tutti i pazienti di questa coorte sono stati inoltre trattati con rituximab, tuttavia non sono disponibili predittivi rilevanti verso questo farmaco, in quanto i suoi effetti non sono stati testati in vitro sul pannello NCI60. La previsione basata solo sulla sensibilità ai tre farmaci combinati nel trattamento CHOP si è dimostrata in grado di predire la remissione dei pazienti con interesse statistico. Dopo l'aggiunta di prednisolone, il metabolita attivo del prednisone, non ci sono state migliorie nella previsione di risposta, anche se esso, da solo, si è dimostrato un ottimo predittivo, per motivi ancora non chiari. È stato calcolato il valore degli effetti (Effect Size), il rapporto fra la sensibilità dei responsivi e i non responsivi, e si è visto che

esso risulta comparabile fra i pazienti con una piccola quantità di cellule tumorali (n=13; ES=1.14) e quelli con una grande quantità (n=83; ES=1.15), quindi è stato impossibile concludere che la quantità di cellule tumorali potesse incidere sull'accuratezza della predizione. Dalle analisi risulta che vi sia una sola sovrapposizione fra il profilo dei microRNA qui riportati come indicativi della sensibilità al trattamento con CHOP e i precedenti profili di miRNA rappresentativi della sopravvivenza dei pazienti affetti da DLBCL e in cura con R-CHOP. Questa sovrapposizione è rappresentata dal miR-93, che appartiene al cluster del miR-106b-25 e ha la capacità di targettare E2F1, inibendone la traduzione, la cui espressione è associata ad una bassa sopravvivenza delle pazienti affetti da cancro al seno e trattati con FEC (che ha in comune con CHOP la ciclofosfamide).

Concludendo, in questo studio sono stati scoperti i profili di miRNA predittivi per i pazienti con DLBCL che possono portare ad identificare i pazienti con una minor probabilità di risposta al trattamento con CHOP. La potenziale utilità clinica tuttavia si riduce, nei trattamenti di seconda e terza linea, dove la probabilità di risposta è minore e il numero di possibilità di terapia aumenta.

**Parole Chiave:** DLBCL, R-CHO(E)P, microRNA predittivi

#### Riferimento bibliografico

[Knudsen S](#) et al. *PLoS One* 2015, 10(2): e0115538.

## CONTRIBUTO DELLA FARMACOGENETICA COME STRUMENTO PREDITTIVO DI RISPOSTA AL TRATTAMENTO CHEMIOTERAPICO NELL'OSTEOSARCOMA: UN PRIMO PASSO VERSO LA MEDICINA PERSONALIZZATA

A cura della Dott.ssa Eleonora Turrini

L'osteosarcoma rappresenta il tumore osseo maligno primario più comune nei bambini e nei giovani adulti e nonostante l'ottimizzazione del trattamento chemioterapico, l'*overall survival* dei pazienti è del 60%. Tra i principali fattori che influenzano la sopravvivenza all'osteosarcoma si elencano la presenza di metastasi, il sito e le dimensioni del tumore primario, l'età alla diagnosi, l'approccio chirurgico e la risposta alla terapia chemioterapica pre-operatoria. Il presente lavoro, che si configura come il primo a mostrare una possibile stratificazione del trattamento in pazienti con osteosarcoma su basi farmacogenetiche, intende valutare con un approccio *pathway-based* l'effetto cumulativo di polimorfismi in geni coinvolti nel metabolismo di cisplatino e doxorubicina, i due principali farmaci utilizzati per l'osteosarcoma, in relazione alla sopravvivenza.

I pazienti con osteosarcoma coinvolti nello studio sono stati 126 appartenenti al *discovery group*, arruolati da due differenti centri (*Radbound University Medical Center* e *Univiversity Medical Center Groningen*, Paesi Bassi). La *replication cohort*, ovvero la popolazione confrontabile a quella in studio per testare la validità delle associazioni emerse, era costituita da 64 pazienti del *Leiden University Medical Center*, Paesi Bassi. Tutti i pazienti arruolati erano caucasici, di nuova diagnosi, con osteosarcoma ad elevato grado di differenziazione, di prima localizzazione e/o con metastasi, trattati tra il 1979 ed il 2008. Tutti i pazienti hanno firmato il consenso informato e lo studio è stato approvato dal comitato etico del *Radbound University Medical Center*. I regimi terapeutici adottati sono stati due, nel *Radbound University Medical Center* i pazienti con diagnosi di osteosarcoma fino al 2002 sono stati trattati con cisplatino (600 mg/m<sup>2</sup>) e doxorubicina (450 mg/m<sup>2</sup>). In seguito al 2002 e tutti i pazienti degli altri due centri sono stati trattati in accordo allo studio EUROMOS, ovvero cisplatino (480 mg/m<sup>2</sup>)/doxorubicina (450 mg/m<sup>2</sup>) ed in più una elevata dose di metotressato (MTX) (94-144 g/m<sup>2</sup>, a seconda dell'età del paziente). I dati clinici sono stati raccolti retrospettivamente. I 54 geni selezionati ed i relativi polimorfismi considerati per l'analisi farmacogenetica sono stati scelti sulla base della loro associazione con cambiamenti funzionali nei *pathway* di cisplatino e doxorubicina. Un set di 381 polimorfismi è stato quindi analizzato mediante la piattaforma Illumina. I polimorfismi associati in modo significativo alla *progression free survival* (PFS) a 5 anni sono stati analizzati anche nei 64 pazienti della *replication cohort*.

Le caratteristiche demografiche dei pazienti appartenenti al gruppo *discovery* rispetto al *replication* non differivano significativamente, se non per una risposta istologica al trattamento leggermente migliore per la

*replication cohort* ( $P = 0.07$ ), ma questo potrebbe essere giustificato dell' utilizzo aggiuntivo in terapia del MTX, con una migliore ma non significativa PFS ai 5 anni. (66.7% vs 54.5%,  $P = 0.13$ ). Una buona risposta istologica al trattamento chemioterapico non risulta associata ad alcuna caratteristica alla *baseline* dei pazienti, mentre si osserva una differenza nella PFS ai 5 anni in presenza di co-trattamento con elevate dosi di MTX, quindi tale trattamento viene utilizzato come covariata delle analisi multivariate.

L'analisi di regressione lineare multivariata corretta per la somministrazione di MTX ad alte dosi mostra l'associazione di 23 SNPs con la PFS a 5 anni nel *discovery group*; tra questi, 5 polimorfismi hanno dimostrato un'associazione significativa alla PFS a 5 anni nella *replication cohort*. I polimorfismi funzionali correlati significativamente alla sopravvivenza sono risultati (1) rs763110 (844T>C) nel gene Fas Ligand (*FasL*), coinvolto nello sviluppo e progressione del cancro e la cui espressione è inversamente correlata al potenziale metastatico in cellule di osteosarcoma. Questo è in accordo ai risultati del presente studio dove la presenza dell'allele T, legata ad una minore espressione di *FasL*, è associata ad una prognosi peggiore. (2) rs4638843 del gene MSH2, appartenente alle proteine del complesso *Mismatch Repair*, la cui espressione è associata a mancata risposta alla terapia e decremento della sopravvivenza in pazienti affetti da osteosarcoma. (3) rs939338 di ABCC5, la cui elevata espressione è associata alla resistenza a cisplatino e doxorubicina in diverse linee cellulari, mostrando, infatti, una peggiore PFS. (4) rs2720376 di CASP3, uno dei maggiori esecutori dell'apoptosi cellulare, che influenza quindi l'*outcome* del trattamento. (5) rs4646437 del CYP3A4, che svolge un importante ruolo nel metabolismo sia del cisplatino che della doxorubicina. La sovraespressione del gene CYP3A4 risulta nella diminuita efficacia del farmaco e, nei pazienti con osteosarcoma, è stata associata allo sviluppo di metastasi distanti dal tumore primario.

Questi 5 polimorfismi non sono stati associati in questo studio al raggiungimento di una migliore risposta istologica, sebbene una buona risposta istologica sia, di solito, altamente prognostica per una buona sopravvivenza. Il genetic risk score è stato calcolato per i 5 SNPs emersi dalla meta analisi con un punteggio da 1-10. Visto che solo un numero limitato di pazienti raggiungeva uno score di 6 o maggiore, sono stati scelti 4 gruppi unendo tutti i pazienti in analisi: 0-1, 2-3, 4-5 o più di 5 alleli sfavorevoli. Dopo aggiustamento per il trattamento con MTX, il *genetic risk score* è risultato significativamente associato a PFS. Pazienti privi o con un solo allele di rischio hanno mostrato una PFS del 100%, rispetto ad un 84.4% in presenza di 2-3 alleli di rischio, 66.7% con 4-5 alleli e 41.8% in presenza di più di 5 alleli ( $P < 0.001$ ). Rapportando il *genetic risk score* e la presenza di metastasi alla diagnosi, la capacità di predire la PFS è risultata notevolmente maggiore. Infatti, i 5 geni emersi dall'analisi risultano anche correlati alla formazione di metastasi in vari studi. PFS a 5 anni in pazienti privi di metastasi alla diagnosi è stata simile a quella della popolazione totale ( $P = 0.008$ ). Pazienti con metastasi sono risultati portatori di almeno due alleli di rischio e la PFS di portatori di 2-3 alleli di rischio è risultata dell'80% e, comunque, è diminuita al 56.2% in portatori di 4-5 alleli di rischio e solo al 12.5% se gli alleli erano più di 5 ( $P = 0.007$ ).

Polimorfismi in geni coinvolti nel *pathway* di cisplatino e doxorubicina sono stati associati alla PFS a 5 anni in pazienti affetti da osteosarcoma. La presenza di questi fattori di rischio farmacogenetici potrebbe essere utile per predire l'*outcome* del trattamento farmacologico, suggerendo una stratificazione dei pazienti immediatamente dopo la diagnosi, offrendo uno strumento prognostico per ottimizzare il trattamento e migliorare la sopravvivenza.

Sebbene i risultati dello studio siano promettenti, un maggior numero e una migliore caratterizzazione dei pazienti sarebbe richiesta sulla base della presenza o meno di metastasi e sulla base del regime terapeutico assunto, ovvero con due o tre chemioterapici. Questo studio costituisce solamente il quarto pubblicato in ambito farmacogenetico su pazienti affetti da osteosarcoma, anche perché si tratta di una patologia rara. I geni emersi come significativamente correlati a questa patologia differiscono tra i vari studi anche a causa delle diverse terapie utilizzate.

**Parole chiave:** osteosarcoma, cisplatino, doxorubicina, metotressato, *markers* farmacogenetici, PFS, risposta istologica.

#### Riferimento bibliografico

[Hagleitner MM](#) et al. *Clin Cancer Res* 2015 Mar 31 [Epub ahead of print].

## IMMUNOMODULAZIONE

### ABCB1 (MDR-1) E FARMACOGENETICA DI TACROLIMUS IN PAZIENTI CON TRAPIANTO RENALE: UN APPROCCIO NEXT GENERATION SEQUENCING

A cura della Dott.ssa Stefania Cheli

Il tacrolimus (Tac) è un farmaco immunosoppressore ampiamente utilizzato per prevenire il rigetto di trapianto d'organi solidi. L'approccio corrente al trattamento consiste in una dose iniziale prefissata che viene poi regolata secondo i livelli ematici di Tac. E' quindi necessario il monitoraggio post-trapianto (PT) di Tac per poter regolare il dosaggio ed evitare gli eventi avversi o il rischio di rigetto d'organo, che potrebbero derivare rispettivamente da una dose elevata o troppo bassa di farmaco. I citocromi P450 (CYP) 3A4 e 3A5 sono responsabili del metabolismo ossidativo di Tac ed il polimorfismo a singolo nucleotide (SNP) rs776746 del CYP3A5 (alleli CYP3A5\*1 e \*3) è il principale determinante della variabilità interindividuale delle dosi richieste di Tac. Soggetti omozigoti per il CYP3A5\*3 (non esprimenti) presentano una quasi totale mancanza di attività enzimatica e richiedono dosi inferiori di Tac rispetto ai portatori del CYP3A5\*1 (esprimenti). La genotipizzazione del SNP di CYP3A5 potrebbe aiutare a individuare la dose iniziale di Tac. E' stata proposta una dose di carico di Tac di 0,075 mg/kg e 0,150 mg/kg, per peso corporeo e due volte al giorno, rispettivamente per i soggetti non esprimenti il CYP3A5 e quelli esprimenti. Nonostante l'utilità della genotipizzazione del CYP3A5 nel prevedere la dose, un certo numero di pazienti restano fuori dal range target di Tac. Varianti del DNA presenti in altri geni implicati nel metabolismo di Tac potrebbero spiegare questi casi fuori range. La biodisponibilità di Tac è principalmente controllata dalla P-glicoproteina (PgP) intestinale codificata dal gene ABCB1 (MDR1). Alcuni polimorfismi nel ABCB1 sono stati collegati a differenze di espressione e/o funzione di PgP, che potrebbero determinare delle differenze nella quantità di Tac che raggiunge il flusso sanguigno. Tra gli altri, SNP sinonimo C3435T (rs1045642) nell'esone 26 di ABCB1 è stato associato all'espressione di PgP (ridotta nei portatori dell'allele T). In riferimento al trapianto di rene, ci sono risultati contrastanti circa l'effetto di questo SNP di ABCB1 sulla dose richiesta di Tac. In questo lavoro, per comprendere meglio il ruolo di ABCB1 nella biodisponibilità di Tac, è stato utilizzato un approccio di *Next Generation Sequencing* (NGS) per caratterizzare l'intera sequenza codificante del gene in un gruppo di pazienti sottoposti a trapianto di reni e fuori dai livelli target di Tac.

**Pazienti e terapia immunosoppressiva.** Tutti i pazienti sono di razza caucasica e provengono dalla regione delle Asturie (Nord Spagna). Tutti hanno firmato un consenso informato per partecipare a questo studio approvato dal Comitato Etico dell'Ospedale Universitario centrale delle Asturie (HUCA). Lo studio ha coinvolto un totale di 100 pazienti che hanno ricevuto un rene da cadavere e sono stati trattati con terapia immunosoppressiva standard con Tac, micofenolato mofetile e prednisone. I pazienti che hanno perso l'innesto nei 6 mesi PT, non sono stati inclusi nello studio. Tutti i pazienti hanno ricevuto una dose iniziale orale di 0,2 mg/kg al giorno di Tac (Prograf, Astellas Pharma Inc) in due dosi uguali a 12 h (mattino e sera). I livelli di Tac (C0) sono stati determinati, subito prima di ricevere la dose mattutina successiva, su sangue intero con saggio immunologico chemiluminescente automatizzato e Arquitect® Tacrolimus (Abbott Laboratories, IL, USA). La dose è stata regolata per raggiungere una C0 di 10-15 ng/mL nel periodo di 0-3 mesi PT. **NGS di ABCB1.** Su un totale di 60 pazienti, che dopo 1 settimana di PT mostravano livelli ematici di Tac fuori dal range, sono state indagate le varianti del DNA in ABCB1 attraverso amplificazioni multiple di un pool di DNA e con l'utilizzo di semiconduttori NGS. Gli autori hanno già dimostrato che quest'approccio di *pooling* è valido per l'identificazione delle varianti rare diluite dall'allele comune. Il DNA di ogni paziente è stato ottenuto da leucociti del sangue e aggiustati alla concentrazione di 10 ng/μL utilizzando la tecnica di quantificazione Taqman Real Time con RNaseP (Life Technologies). Attraverso questa procedura è stato anche confermato che tutti i DNA erano adatti per l'amplificazione in PCR. L'amplificazione multipla (Ampliseq) è stata designata on-line (IonAmpliSeq™ Designer) per amplificare la sequenza codificante di ABCB1 più almeno 10 nucleotidi intronici fiancheggianti l'esone. Sono stati creati quattro pools contenenti 10μL di DNA provenienti da 15 pazienti, ed ogni pool è stato amplificato con l'*ABCB1-Ampliseq* seguito da NGS con *Ion Torrent Personal Genome Machine* (PGM; Life Technologies).

Brevemente, un totale di 10 ng del pool-DNA è stato amplificato utilizzando *Ion Ampliseq™Library Kit* (Life Technologies). Le reazioni sono state quantificate e amplificate nello strumento *Ion One-Touch* con il kit *Ion template PGM OT2 200* (Life Technologies). Le sfere di templatato positivo sono state recuperate con le biglie di streptavidina e quantificate con il saggio di controllo di qualità *Ion Sphere* nel fluorimetro *Qubit 2.0* (Life Technologies). Le particelle a sfera sono state poi caricate in un chip semiconduttore di 318 (1 Gb) e sequenziate utilizzando il kit di sequenziamento *PGM 200 con Ion Torrent PGM*. E' stato utilizzato un flusso di 500 corse che supportano una lettura del templatato di circa 200 bp. I dati provenienti dalla lettura dell'array sono stati elaborati utilizzando il *software Torrent Suite v4.0* (Life Technologies) per generare e filtrare la lettura della sequenza e rimuovere le sequenze con segnale debole. La copertura o livello di ridondanza ("coverage depth") e la qualità delle sequenze sono state determinate con *Integrative Genome Viewer* (IGV). Le sequenze degli ampliconi sono state mappate con il software *Ion Ampliseq Designer BED file*, l'assemblaggio e l'identificazione delle varianti nucleotidiche sono stati eseguiti con il software *Variant Caller* (VC). Inoltre, per ridurre il rischio di falsi negativi in alcuni amplificati, è stata effettuata un'ispezione visiva dei file BAM dei quattro pools. **Genotipizzazione degli SNPs.** Sono stati utilizzati i saggi *TaqMan* in *Real-time PCR* (Applied Biosystems) per la genotipizzazione degli rs776746 CYP3A5 (saggio id C\_25201809\_30) e rs1045642 ABCB1 (saggio id C\_7586657\_20). **Analisi statistiche.** I dati sono stati presentati come media  $\pm$  la deviazione standard o mediana e range. E' usato il test t di Student per confrontare le differenze nei valori della media per le variabili distribuite normalmente (età, BMI) e il test U di Mann-Whitney per comparare le variabili che non seguono una distribuzione normale (dosi di Tac, i livelli ematici di Tac). Il confronto tra i gruppi è stato effettuato attraverso l'ANOVA (variabili con una distribuzione normale). E' stato considerato il  $p < 0.05$  per le associazioni statisticamente significative.

**Risultati.** Complessivamente 39 e 21 individui hanno mostrato un livello ematico di Tac inferiore o superiore al range target. In questi casi ( $n = 60$ ) sono state indagate le varianti del DNA nel gene ABCB1 attraverso amplificazioni multiplex del pool di DNA mediante NGS. Tutti gli ampliconi di ABCB1 hanno dato letture  $> 2000$  per nucleotide, corrispondente ad una media di lettura  $> 100$  per paziente in ogni pool ( $50 \times$  per allele). Il VC ha identificato un totale di 22 variazioni nucleotidiche e quattro varianti missenso conosciute note: tre rare (p.N21D, p.Q1107P, p.S400N) ed una comune (p.S893A). L'analisi bioinformatica (programmi on-line Polyphen e SIFT) ha classificato le quattro variazioni come tollerate o probabilmente non patogeniche. Per le tre varianti missenso rare, è stato determinato il portatore tramite il sequenziamento del corrispondente esone con il metodo di Sanger in tutti i pazienti usati per creare il pool di DNA. Le tre varianti rare sono state trovate nei casi di livelli al di fuori del range target di Tac dopo 1 settimana PT. Poiché i genotipi erano rappresentati sia nei casi con livelli inferiori che superiori al range target di Tac, è improbabile che le varianti missenso di ABCB1, rare e comuni, abbiano un effetto significativo sui requisiti per le dosi di Tac.

**Discussione.** Secondo un recente studio, l'allele 1199G (400 Ser) del gene ABCB1 trasporterebbe in modo più efficiente il Tac rispetto all'allele raro 1199A (400 Asn). La proteina ABCB1 con Asn potrebbe avere pertanto, una capacità minore di guidare l'efflusso di Tac, determinando un accumulo nelle cellule con questa isoforma con aumento del rischio di tossicità cellulare. Nel caso di innesti di rene, il genotipo dei donatori per le varianti funzionali di ABCB1 potrebbe aumentare l'effetto nefrotossico di Tac. In questo studio, l'allele 1199A è stato identificato solo in due pazienti con valori di Tac fuori dal range target. Un risultato simile è stato trovato anche per le altre varianti missenso rare. E' stato riportato che SNP missenso comune p.S893A (rs2032582) è in completo *linkage disequilibrium* con p.I1145I (rs1045642). Questo SNP silente è stato genotipizzato in tutti i pazienti ed i tre genotipi sono stati trovati nei casi con livelli ematici di Tac superiori o inferiori al range target, senza differenze significative tra i gruppi. Come discusso sopra, il genotipo di ABCB1 p.S893A o p.I1145I nel donatore potrebbe avere un effetto sulla nefrotossicità di Tac, ma i livelli ematici dipenderanno dall'attività della pompa di efflusso intestinale che è determinato dal genotipo del destinatario.

Gli studi di NGS del gene ABCB1 su pazienti che hanno subito trapianto renale e che mostrano livelli ematici di Tac fuori dal range, hanno individuato tre varianti rare ed una missenso comune, tutte già note. Tutti i genotipi osservati erano presenti nei trapiantati con livelli di Tac superiori o inferiori al livello target. Questi dati suggeriscono che le variazioni di sequenza codificanti per ABCB1 non hanno alcun valore predittivo sulle dosi di Tac tra i pazienti con trapianto di reni, ed è quindi improbabile che possano servire come strumento valido per determinare la dose iniziale Tac.

**Parole chiave:** ABCB1, P-glicoproteina, farmacogenetica, trapianto renale, tacrolimus

#### Riferimento bibliografico

[Tavira B](#) et al. *Clin Chem Lab Med* 2015 Mar 9 [Epub ahead of print]

## MIRNAS CIRCOLANTI COME POTENZIALI BIOMARKERS DELL'EFFICACIA DEL TRATTAMENTO ANTI-TNF $\alpha$ IN PAZIENTI AFFETTI DA ARTRITE REUMATOIDE

A cura della Dott.ssa Gloria Ravegnini

L'artrite reumatoide (RA) è una malattia infiammatoria autoimmune di eziologia sconosciuta che colpisce prevalentemente cartilagine articolare e ossa; la malattia è accompagnata da infiammazione persistente, iperplasia sinoviale ed erosione cartilaginea. Trattamenti tempestivi possono prevenire disabilità severe e portare a benefici importanti per i pazienti.

Il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF $\alpha$ ) gioca un ruolo centrale nella patogenesi della RA ed è uno dei principali mediatori dell'infiammazione che la caratterizza; TNF $\alpha$  induce i macrofagi ed altre cellule alla secrezione di citochine proinfiammatorie, portando all'attivazione delle cellule T e di cellule endoteliali esprimenti molecole di adesione. Benché l'introduzione di farmaci anti-TNF $\alpha$  abbia portato a notevoli miglioramenti per i pazienti affetti da questa malattia, la risposta al trattamento è multifattoriale e può essere fortemente modulata da variazioni nei geni o nella loro espressione. Negli ultimi anni stanno emergendo anomalie epigenetiche quali caratteristiche patogenetiche chiave per l'artrite reumatoide; in particolare, recentemente è stato dimostrato che pazienti affetti da RA presentano alterazioni nell'espressione di microRNAs (miRNAs) in cellule mononucleate del sangue periferico, linfociti T, e fibroblasti che sono cellule effettrici della distruzione delle giunzioni. Inoltre è stata osservata un'alterata espressione anche nel plasma e nei fluidi sinoviali.

Nel 2011 è stato dimostrato (Ceribelli et al. *Arthritis Res Ther* 2011) che l'espressione dei miRNAs può essere aberrante persino ai differenti stadi della progressione della RA ma ad oggi non vi sono studi che hanno valutato i miRNAs sierici in pazienti trattati con anti-TNF $\alpha$ .

Date le suddette premesse, lo scopo di questo studio è stato quello di identificare possibili biomarkers predittivi dell'effetto terapeutico di farmaci anti-TNF $\alpha$  analizzando i cambiamenti nei miRNAs sierici dopo 6 mesi di trattamento.

A tale scopo sono stati arruolati un totale di 95 pazienti, *naive* per agenti anti-TNF $\alpha$ , che avevano avuto una risposta inadeguata ad almeno due farmaci antireumatici modificanti la malattia (DMARDs) in monoterapia o in combinazione, di cui uno era il metotrexato; la terapia con agenti anti-TNF $\alpha$  è stata associata con DMARDs. In particolare, dei 95 individui, 55 sono stati trattati per sei mesi con infliximab (IFX; infusioni intravenose di 3 mg/kg/day alle settimane 0, 2, 6 e ogni 8 settimane); 25 riceventi etanercept (ETA, 25 mg, due volte alla settimana); 15 trattati con adalimumab (ADA, 40 mg ogni settimana). Per ogni paziente il sangue è stato collezionato all'inizio (T1) e alla fine (T2) del trattamento ed ognuno è stato valutato clinicamente e analiticamente ad ogni time point considerando una serie di parametri quali conta delle articolazioni dolenti (TJC) e tumefatte (SJC), scala visuale-analogica del dolore (VAS); la risposta alla combinazione terapeutica anti-TNF $\alpha$ / DMARDs è stata valutata mediante calcolo dell'indice di attività di malattia (DAS28).

I pazienti sono stati categorizzati in responsivi e non responsivi in base al cambiamento nel punteggio DAS28. DAS28  $\leq 3.2$  con un miglioramento di punteggio  $\geq 1.2$  dopo 6 mesi è stato considerato come una buona risposta;  $3.2 < \text{DAS} < 5.1$  con una riduzione compresa tra 0.6 e 1.2 è stato considerato come risposta moderata ed infine DAS28  $> 5.2$  o una riduzione inferiore a 0.6 al tempo T2 è stata considerata come assenza di risposta.

I miRNA sono stati estratti da 200  $\mu$ l di siero impiegando uno spike-in come miRNA di riferimento.

Per identificare eventuali cambiamenti nei livelli di espressione dei miRNAs sierici in pazienti trattati è stato utilizzato un array specifico per miRNAs plasmatici e sierici in grado di valutare 84 differenti miRNAs.

Per il profiling iniziale sono stati scelti 10 pazienti con risposta ottimale e per ognuno è stata valutata l'espressione prima e dopo il trattamento. Da questa prima analisi 75 miRNAs risultavano upregolati mentre

9 erano downregolati dopo il trattamento. Mediante il software IPA è emerso che molti di questi avevano come target mRNA coinvolti nella risposta cardiovascolare, infiammatoria e nel sistema muscolo-scheletrico.

Per la validazione dei dati in qRT-PCR sono stati scelti 5 microRNAs con almeno un foldchange di 2 tra T1 e T2 (miR-125b, miR-23a-3p, miR-21-5p, miR-126-3p, miR-146a-5p) e un secondo gruppo di 5 perché coinvolti nell'infiammazione, e in malattie cardiovascolari o autoimmuni (let-7a-5p, miR-16-5p, miR-124a-3p, miR-155-5p, miR-223-3p). Nella popolazione totale di pazienti 6 miRNAs su 10 hanno mostrato un p-value < 0.05 prima e dopo la terapia: miR-125b, miR-126-3p, miR-146a-5p, miR-16-5p, miR-23-3p, miR-223-3p.

Per valutare la possibilità che i miRNA sierici potessero essere potenziali biomarkers della patologia e della risposta terapeutica, i pazienti sono stati stratificati in responsivi e non, ed è stato osservato che solo i responders mostravano un incremento nei livelli dei 6 miRNA dopo trattamento e parallelamente un diminuzione di TNF $\alpha$ , interleuchina (IL)-6, IL-7, nel fattore reumatoide (RF) e nei livelli della proteina C-reattiva (CRP). In particolare, i risultati hanno mostrato che miR146a-5p, 223-3p e 16-5p correlavano con i cambiamenti osservati per lo score DAS28 (p=0.001, p=0.026 e p=0.013, rispettivamente); inoltre variazioni nei livelli di miR146a-5p, 223-3p, 16-5p, 126-3p e 23-3p erano associati con parametri dell'infiammazione quali CRP e velocità di sedimentazione degli eritrociti (ESR).

Infine è stata identificata una *signature* plasmatica specifica per i miR-23a-3p e 223-3p; come caratteristica generale, è stato osservato che migliore era lo stato del paziente (in termini di parametri clinici e sierologici), più bassi erano la variazione di DAS e i livelli dei 2 miRNAs dopo la terapia; in particolare elevati livelli di entrambi i miRNAs prima della terapia indicavano assenza di risposta. Tali dati sono stati confermati dalle analisi ROC le quali mostravano che livelli di miR-23a-3p e 223-3p al tempo T1 (con un cut-off di 6.9 e 11.2 rispettivamente) erano predittori di una mancata risposta al trattamento anti-TNF $\alpha$ /DMARD con una sensibilità del 62.5% e 57.1% ed una specificità di 86.4% e 90.2%; le analisi delle variazioni nell'espressione relativa dei miRNAs dopo trattamento hanno mostrato poi una downregolazione nei pazienti non responsivi mentre si aveva un incremento significativo in quelli con una buona risposta.

Le analisi ROC sono poi state condotte per valutare l'influenza dei due miRNAs sulla risposta alla terapia, osservando le differenze dei livelli di espressione ai tempi T1 e T2; miR-23a-3p ha mostrato un valore di cut-off di 0.83 con una sensibilità del 62.5% e specificità del 77.6%; mir-223 ha mostrato un cut-off di 3.03 con una sensibilità del 57.1% e specificità del 84.3%.

Infine allo scopo di migliorare l'accuratezza dell'analisi è stata condotta un'analisi combinatoriale delle curve di analisi ROC per i due miRNA; ciò ha portato ad un incremento della sensibilità (62.5%) e specificità (91.5%) sia per i miRNA al T1 che per le variazioni T1-T2 (cut-off=1.5, sensibilità = 62.5%, specificità = 84.7%).

Questi risultati suggeriscono che i livelli sierici di miR-23a-3p e miR-223-3p possono agire come predittori della risposta terapeutica e in particolare come biomarkers della risposta alla combinazione anti-TNF $\alpha$ /DMARD in pazienti affetti da artrite reumatoide.

**Parole chiave:** artrite reumatoide, anti-TNF $\alpha$ , miR-23a-3p, miR223-3p

#### Riferimento bibliografico

[Castro-Villegas C](#) et al. *Arthritis Res Ther* 2015, 17:49

## SEQUENZIAMENTO ESONICO E ANALISI DI IBRIDAZIONE GENOMICA COMPARATIVA BASATA SUGLI ARRAY DI PAZIENTI CHE PRODUCONO PREFERENZIALMENTE 6-METILMERCAPTOPURINA

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

L'azatioprina (AZA) e la 6-mercaptipurina (6-MP) sono definiti farmaci tiopurinici in quanto analoghi delle purine: a livello cellulare le tiopurine vengono convertite, in seguito a diversi step metabolici, in nucleotidi 6-tioguaninici (6-TGN), che si incorporano nel DNA durante la fase di sintesi, interrompendone il processo e causando citotossicità. Due *pathway* competono con la formazione dei nucleotidi 6-TGN, ovvero la

metilazione e l'ossidazione della 6-MP, mediate rispettivamente dagli enzimi tiopurina-S-metiltransferasi (TPMT) e xantina deidrogenasi (XDH).

I farmaci tiopurinici sono ampiamente utilizzati nelle malattie infiammatorie croniche intestinali per indurre la remissione e ridurre l'impiego di terapie steroidee, nonostante presentino complicazioni immunosoppressive potenzialmente molto gravi.

La variabilità interindividuale nella risposta alle tiopurine è stata largamente studiata e, oltre all'enzima TPMT, stanno emergendo nuovi markers farmacogenetici, anche se la maggior parte della variabilità continua ad eludere le attuali conoscenze farmacogenetiche.

Il monitoraggio terapeutico dei pazienti in trattamento con tiopurine viene effettuato determinando le concentrazioni di 6-TGN e nucleotidi 6-metilmercaptipurinici (6-MMP), e l'aggiustamento della dose, sulla base di tali informazioni, potrebbe incrementare la risposta al farmaco e minimizzare la potenziale tossicità da trattamento. Individui che metilano preferenzialmente le tiopurine a 6-MMP, come evidenziato dal rapporto 6-MMP/6-TGN alto (>20), sembrano più propensi ad avere una risposta sfavorevole al trattamento. In letteratura, ad oggi, non sono ancora ben chiari i meccanismi che portano all'ipermetilazione delle tiopurine, e anche il ruolo di TPMT in questo particolare fenomeno è ancora incerto; inoltre il coinvolgimento di altri geni non è stato ancora confermato. Il sequenziamento dell'intero esoma (WES), ovvero il sequenziamento simultaneo di tutte le regioni codificanti all'interno del genoma, ha identificato numerosi nuovi markers farmacogenetici come quelli coinvolti nella risposta al clopidogrel, escitalopram, clozapina pazopanib e everolimus. Tale approccio è stato utilizzato dagli autori dello studio, per investigare le possibili basi genetiche alla base della formazione dei metaboliti in un gruppo di pazienti clinicamente resistenti alla terapia tiopurinica. L'obiettivo principale dello studio è stato quello di testare se questo fenotipo, resistente ed ipermetilato, può essere dovuto a mutazioni dei geni coinvolti nel metabolismo, nel trasporto o nelle funzioni delle tiopurine.

A questo scopo sono stati reclutati 12 pazienti (9 femmine e 3 maschi con età media 49 anni e range 40-56): 8 pazienti presentavano malattia di Crohn, 3 l'epatite autoimmune e 1 paziente la colite ulcerosa. Tutti i pazienti erano risultati metabolizzatori normali considerando il genotipo di TPMT, ma presentavano dopo trattamento un rapporto 6-MMP/6-TGN >100 con conseguente modificazioni terapeutiche e associazione di allopurinolo.

I DNA dei 12 pazienti sono stati estratti dai leucociti del sangue periferico utilizzando il KingFisher Flex Magnetic Particle Processor. L'arricchimento ed il sequenziamento dell'intero esoma è stato eseguito da un servizio privato (Genomics Ltd). Le analisi dell'esoma dei 12 partecipanti hanno evidenziato in totale 118.784 siti varianti: queste varianti sono state successivamente filtrate e selezionate in base al coverage del sito (>100), al MAF globale ( $\leq 10\%$ ), alla presenza della variante in almeno due partecipanti, e in base allo score di conservazione GERP, risultando in una lista di 1176 varianti con più probabilità di avere una significatività funzionale. Dalla selezione sono stati identificati cinque geni (ENOSF1, GDA, NFS1, SLC17A4 e RCC2) che potrebbero influenzare indirettamente il metabolismo, il trasporto o l'azione terapeutica delle tiopurine. Ognuno di questi geni presenta varianti in eterozigosi con una frequenza bassa nella popolazione (MAF < 2%) ma presente in 2 o 3 pazienti, e altre varianti con un MAF più alto (>3%).

Nello studio gli autori hanno eseguito anche un'analisi di gene candidato di 52 geni, utilizzando un approccio di selezione meno restrittivo e considerando anche le varianti più rare (MAF < 1%) presenti in eterozigosi anche in un solo paziente dello studio. Nella coorte di controllo è stato identificato un numero paragonabile di varianti rispetto a quelle trovate nei pazienti (13 varianti nei 12 pazienti rispetto a 29 varianti nei 24 controlli). Tutti i risultati di entrambe le tecniche sono stati validati con sequenziamento Sanger.

Infine sono state valutate le *copy number variation* (CNV), ovvero variazioni genetiche che potrebbero essere importanti a livello farmacogenetico ma non sono visualizzabili tramite sequenziamento esonico. Per queste analisi è stata utilizzata la tecnica basata su array di ibridazione genomica comparativa (aCGH) per i 12 pazienti identificando 61 duplicazioni/delezioni: di queste 48 sono risultate essere presenti nel Database of Genome Variants, e possono quindi essere classificate come innocue. Le rimanenti 13 CNVs, per le loro elevate dimensioni o per caratteristiche particolari, sono state classificate come non predisponenti. Non sono quindi state identificate nello studio CNVs insolite o potenzialmente patogeniche che potrebbero essere importanti nel identificare il fenotipo ipermetilatore delle tiopurine.

Dai risultati ottenuti, 5 geni (ENOSF1, NFS1, SLC17A4, RCC2 e GDA) potrebbero essere associati al fenotipo ipermetilante dei pazienti studiati. Il gene ENOSF1 potrebbe influenzare il metabolismo delle

tiopurine attraverso la regolazione di TPMT, inconseguenza della sua attività sulla timidilato sintasi. NFS1 agisce, invece, come donatore di zolfo nella sintesi del cofattore del molibdeno, essenziale per l'attività di idrossilazione della XDH e dell'aldeide ossidasi. Un'altra variante è stata identificata in SLC17A4, gene codificante per il trasportatore degli urati, i prodotti finali del metabolismo delle purine nell'uomo. L'effetto dell'ultima variante è risultato incerto perché presente nella regione del 3' del gene RCC2. Questo gene codifica per una proteina che limita l'attività di Rac1, uno dei geni considerati target terapeutico delle tiopurine. Ultima variante identificata è presente nel gene GDA, che codifica per una deaminasi che metabolizza la 6-tioguanina a 6-tioxantina.

Gli autori sono consapevoli di alcune limitazioni di questo studio: la numerosità dei campioni selezionati non è alta ed è stata paragonata alle MAF presenti nei database pubblici per le analisi statistiche; l'applicazione dei filtri per selezionare un numero ridotto di varianti potrebbero averne escluse alcune potenzialmente patogeniche; il dosaggio dei metaboliti tiopurinici negli eritrociti potrebbe essere differente da quello misurato nei leucociti periferici e potrebbe quindi confondere l'interpretazione del fenotipo; infine l'ultima limitazione riguarda la tecnica WES che non permette di visualizzare mutazioni introniche o in altre regioni non codificanti, che potrebbero essere potenzialmente patogeniche.

In conclusione questo studio suggerisce che, nonostante siano state identificate mutazioni che potrebbero interferire nell'ipermetilazione delle tiopurine, le mutazioni causative del fenotipo ipermetilante sembrano essere eterogenee e si verificano in diversi geni, oppure possono trovarsi nelle regioni introniche o regioni regolatorie non studiate dal WES. In alternativa, l'ipermetilazione potrebbe derivare dal coinvolgimento di geni multipli con piccoli effetti. Per verificare queste ipotesi sarebbero necessari studi su coorti di pazienti di grandi dimensioni e l'applicazione di tecniche *genome-wide*.

**Parole chiave:** azatioprina, 6-mercaptopurina, ipermetilazione dei nucleotidi, sequenziamento dell'esoma, *copy number variations*

#### Riferimento bibliografico

[Chua EW](#) et al. *Pharmacogenomics J* 2015 Mar 10 [Epub ahead of print]

## INFETTIVOLOGIA

### **DIRECT PCR: UN NUOVO APPROCCIO FARMACOGENETICO PER UNO SCREENING ECONOMICO DELL'ALLELE HLA-B\*57:01**

A cura della Dott.ssa Valeria Conti

Uno degli esempi più brillanti della traslazione tra farmacogenetica e pratica clinica è lo *screening* dell'allele HLA-B\*57:01 per l'identificazione dei pazienti a rischio di reazioni di ipersensibilità (HSR) all'abacavir (ABC). L'ABC è un farmaco antiretrovirale molto efficace, in special modo quando co-somministrato con lamivudina e zidovudina, per il trattamento dei pazienti HIV positivi. Esso funziona come inibitore della trascrittasi inversa impedendo la replicazione del DNA del virus e riducendo così la carica virale. La sicurezza del farmaco è però legata all'eventuale insorgenza di ABC-HSR, che si manifesta come una sindrome multiorgano con sintomi gastrointestinali e respiratori, febbre, rash e morte. La stretta associazione tra genotipo HLA-B\*57:01 e ABC-HSR è stata ormai accertata e, dapprima negli USA, poi in Europa, ora è obbligatorio eseguire lo screening prima di somministrare il farmaco. L'ABC-HSR ha un'incidenza variabile nelle diverse popolazioni così come la frequenza dell'allele HLA-B\*57:01, che nei caucasici è pari al 5-8%. Gli autori di questo studio hanno proposto un nuovo metodo per analizzare l'allele HLA-B\*57:01 con una spesa inferiore a un euro per paziente.

Il protocollo presentato in questo lavoro (*Thermo Scientific Phusion Human Specimen Direct PCR kit*, Finnzymes, Finland) consente di eseguire contemporaneamente l'estrazione e l'amplificazione del materiale

genetico senza prevedere l'utilizzo di procedure separate di estrazione e sequenziamento. Inoltre il DNA da analizzare deriva da saliva o tampone buccale e non da prelievo di sangue, che rappresenta ovviamente un campione più rischioso da manipolare.

Una prima reazione di PCR è stata predisposta tramite l'utilizzo di una polimerasi ad alta fedeltà (*Phusion Hot Start II high-fidelity DNA polymerase*, Finnzymes, Finland) e gli ampliconi ottenuti sono stati analizzati tramite una semplice corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2,5%. Come controllo interno, una coppia di oligonucleotidi (INT-F e INT-R) specifici è stata utilizzata per amplificare il gene *Lysyl oxidase-like 1* (LOXL-1) in modo che i prodotti della PCR fossero lunghi 444bp per LOXL-1 e 262bp per HLA-B\*57. Infine, per identificare l'allele HLA-B\*57:01, è stata prevista una PCR *nested*, per la quale i frammenti genici ottenuti nella prima reazione sono stati utilizzati come stampo e tre primers specifici come innesco. Per la PCR *nested* sono stati utilizzati un oligonucleotide "F" e due reverse "2R" e "3R" per distinguere gli alleli HLA-B\*57:01:01 e HLA-B\*57:01:02.

Come per la prima PCR, anche per la *nested* la specificità degli ampliconi è stata verificata tramite corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2,5%; sul gel è stato possibile visualizzare tre bande, le più alte corrispondenti agli ampliconi ottenuti in precedenza (LOXL-1 e HLA-B\*57) e la più bassa di 94bp rilevante la presenza dell'allele HLA-B\*57:01.

I risultati ottenuti con il protocollo appena descritto sono stati confermati mediante sequenziamento diretto, previa estrazione del DNA dalla banda del gel. La specificità e la sensibilità del metodo di screening sono state migliorate aggiungendo un pre-trattamento rappresentato dalla diluizione dei campioni biologici con un buffer specifico che può essere incubato a 98°C per due minuti con gli altri reagenti. In questo modo è stata migliorata l'accessibilità del campione di materiale biologico che è risultato pronto per essere utilizzato nei due consecutivi cicli di amplificazione.

Per validare il test farmacogenetico, gli autori hanno eseguito un'analisi comparativa su 150 pazienti. Campioni di tampone buccale sono stati processati in parallelo mettendo a confronto il metodo *Direct PCR* e la metodologia (standard) di sequenziamento diretto ottenendo una concordanza del 100%.

Un'altra analisi di validazione è stata eseguita per stabilire quale fosse la fonte di DNA ottimale tra la saliva e il tampone buccale e quest'ultimo è stato riconosciuto come il campione più resistente e performante.

A causa della reazione d'ipersensibilità potenzialmente fatale a esso associata, l'ABC è considerato un farmaco di seconda scelta dalla *World Health Organization* per il trattamento degli individui HIV positivi, soprattutto nei pazienti pediatrici.

In paesi poveri, come l'Africa subsahariana, la disponibilità di un test farmacogenetico per la predizione dell'ABC-HSR che sia nello stesso tempo facile da eseguire ed economico potrebbe tradursi in un utilizzo più sicuro dell'abacavir, ossia di un farmaco molto efficace contro il virus dell'HIV. Un campione di tampone buccale è sufficiente per analizzare direttamente, tramite una semplice reazione di PCR e successiva corsa elettroforetica su gel di agarosio, i pazienti HIV positivi per la presenza del genotipo HLA-B\*57, identificando in tal modo più del 90% degli individui eleggibili per il trattamento con l'abacavir. A questo punto un'altra reazione di PCR è sufficiente a identificare l'allele HLA-B\*57:01 associato all'eventuale reazione d'ipersensibilità.

Il protocollo di PCR diretta presentato in questo studio rappresenta un metodo innovativo, semplice e molto economico per implementare l'applicazione dell'analisi farmacogenetica dell'abacavir nella pratica clinica. Inoltre, questa procedura è semplice da eseguire e non richiede la disponibilità di apparecchiature sofisticate e costose che sono difficili da reperire e mantenere soprattutto nei paesi in via di sviluppo.

**Parole chiave:** abacavir, PCR, reazione d'ipersensibilità

#### Riferimento bibliografico

[Cascella R](#) et al. *Pharmacogenomics J* 2015, 15(2):196-200

**CARDIOVASCOLARE**

## FATTORI DI RISCHIO GENETICI, INSORGENZA DI EVENTI CARDIO-CORONARICI E BENEFICIO CLINICO DEL TRATTAMENTO CON STATINE: UN'ANALISI DI STUDI DI PREVENZIONE PRIMARIA E SECONDARIA

A cura della Dott.ssa Sarah Cargin

Il rischio di sviluppare eventi cardio-coronarici è fortemente influenzato da fattori correlati allo stile di vita e al background genetico individuale. Gli studi di associazione *genome-wide* hanno evidenziato la correlazione tra 27 SNPs, localizzati in differenti loci genetici, ed il rischio di insorgenza di eventi cardio-coronarici. Dalla pratica clinica emerge come anche il beneficio clinico indotto dal trattamento con statine nei pazienti a rischio di sviluppare tali patologie sembri variare in base alla suscettibilità individuale alla malattia. È quindi plausibile che lo studio dell'impatto complessivo degli SNPs emersi come fattori di rischio per lo sviluppo di eventi cardio-coronarici, possa altresì permettere l'identificazione dei pazienti con maggiore probabilità di beneficiare della terapia farmacologica con statine. Gli obiettivi di questo studio sono stati: i) valutare se lo score di rischio genetico calcolato sulla base dei 27 SNPs, precedentemente identificati in studi *genome-wide*, potesse predire l'insorgenza di eventi cardio-coronarici incidenti e ricorrenti in pazienti arruolati in coorti epidemiologiche e cliniche; ii) stabilire se il beneficio clinico dal trattamento con statine potesse variare sulla base dello score di rischio genetico calcolato in pazienti a rischio di sviluppare eventi cardio-coronarici incidenti o ricorrenti.

L'analisi della correlazione tra lo score di rischio genetico e l'insorgenza di eventi cardio-coronarici è stato condotto su 5 coorti di pazienti arruolati in 3 studi di prevenzione primaria (*Malmo Diet and Cancer Study*, JUPITER, ASCOT) e due di prevenzione secondaria (CARE e PROVE-IT TIMI 22). Nello specifico, JUPITER, ASCOT, CARE e PROVE-IT TIMI 22 sono trials clinici randomizzati e controllati mentre "Malmo Diet and Cancer Study" (MDCS) è uno studio prospettico caso-controllo. La genotipizzazione delle 27 varianti genetiche, emerse in precedenti studi GWAS come statisticamente associate all'insorgenza di eventi cardio-coronarici, è stata condotta su un totale di 48421 pazienti (MDCS: N=27817; JUPITER: N=8749; ASCOT: N=6978; CARE: N=2878; PROVE-IT TIMI 22: N=1999). Per ciascun partecipante allo studio è stato calcolato lo score di rischio genetico sulla base della somma del numero degli alleli di rischio posseduti per ciascuno dei 27 SNPs, pesata per il logaritmo dell'odd ratio di ogni SNP riportato nello studio GWAS originario. L'*outcome* in studio è rappresentato dall'insorgenza di eventi cardio-coronarici, tra i quali morte coronarica/cardiaca, infarto del miocardio, angina instabile, bypass arterioso coronarico e intervento coronarico percutaneo. Lo score di rischio genetico è stato definito "basso", "intermedio" o "alto" se il valore di score genetico risultava essere compreso, rispettivamente, nel quintile 1, quintile 2-4 e quintile 5. Al fine di determinare il rischio di insorgenza di eventi cardio-coronarici al variare dello score di rischio genetico è stato utilizzato il modello di Cox dei rischi proporzionali (il quintile 1 "basso rischio genetico" è stato utilizzato come *reference* per l'analisi). Tramite un approccio meta-analitico sono state poi combinate le stime ottenute in ogni coorte di pazienti, stratificando per tipo di prevenzione attuata (primaria o secondaria). Infine, è stata condotta l'analisi della correlazione tra lo score di rischio genetico e il beneficio della terapia con statine nei soggetti arruolati nei trials randomizzati JUPITER, ASCOT, CARE e PROVE-IT TIMI 22. Nello specifico, è stato valutata la potenziale correlazione tra i tre livelli di score di rischio genetico (alto, moderato, basso) e il numero totale degli eventi cardio-coronarici insorti nei gruppi di pazienti in trattamento con statine o con placebo. Sono stati poi combinati mediante meta-analisi gli hazard ratio (HR) di beneficio del trattamento con statine ottenuti in ogni coorte, categorizzando per livello di score di rischio genetico (alto, moderato, basso) e stratificando per tipo di prevenzione attuata (primaria o secondaria).

Dall'analisi di correlazione tra lo score di rischio genetico e l'insorgenza di eventi cardio-coronarici è emerso un crescente rischio di sviluppo di eventi cardio-coronarici all'aumentare dello score di rischio genetico dei pazienti. Nello specifico, dopo meta-analisi condotta sui risultati ottenuti negli studi di prevenzione primaria, il rischio di eventi cardio-coronarici è risultato essere maggiore nei pazienti con score di rischio genetico "intermedio" (HR 1.31, 95% CI 1.19-1.45,  $P < 0.0001$ ) e ancor più elevato in quelli con uno score genetico "alto" (HR 1.72, 95% CI 1.53-1.92,  $P < 0.0001$ ) rispetto ai soggetti con score genetico "basso". Lo stesso trend è stato riconfermato dopo meta-analisi dei risultati ottenuti dagli studi di prevenzione secondaria (score genetico "intermedio" vs score genetico "basso": HR 1.65, 95% CI 1.19-2.30,  $P = 0.003$ ; score genetico "alto" vs score genetico "basso": HR 1.81, 95% CI 1.22-2.67,  $P = 0.0029$ ). Il beneficio tratto dalla terapia con statine è stato espresso in termini di riduzione del rischio relativo (RRR) e riduzione del rischio assoluto (ARR).

Dall'analisi di associazione è emerso un crescente miglioramento dell'RRR all'aumentare dello score di rischio genetico dei pazienti arruolati sia negli studi di prevenzione primaria (score di rischio genetico "basso": RRR=34%; "intermedio": RRR=32%; "alto": RRR=50%) che in quelli di prevenzione secondaria (score di rischio genetico "basso": RRR=3%; "intermedio": RRR=28%; "alto": RRR=47%). Analogamente, l'ARR è risultato migliorare all'aumento dello score di rischio genetico, sia negli studi di prevenzione primaria che in quelli di prevenzione secondaria ( $P_{\text{meta-analisi}}=0.0101$ ). Inoltre, l'NNT (*number needed to treat*) necessario per prevenire un evento cardio-coronarico in 10 anni è emerso diminuire con l'aumentare dello score di rischio genetico, sia nello studio JUPITER (score di rischio genetico "basso": NNT=66; "intermedio": NNT=42; "alto": NNT=25) che nel trial ASCOT (score di rischio genetico "basso": NNT=57; "intermedio": NNT=47; "alto": NNT=20).

*Limiti dello studio:* 1) le variabili inserite nell'analisi di associazione sono state estratte da studi epidemiologici e clinici differenti tra loro in termini di criteri di inclusione di pazienti, trattamento farmacologico e durata del follow-up; 2) dalla letteratura è noto come l'effetto delle statine possa essere variabile nel tempo: l'NNT qui ottenuto è stato ricavato dai dati disponibili sull'effetto del trattamento con statine in un periodo di follow-up di soli 10 anni; 3) le analisi di associazione sono state condotte su pazienti arruolati in studi clinici per i quali lo score di rischio genetico non rappresentava uno specifico criterio di inclusione; 4) nonostante l'obiettivo dello studio fosse quello di validare la componente genetica come fattore predittivo del rischio di insorgenza di eventi cardio-coronarici e della probabilità di beneficiare della terapia con statine, l'optimum nell'ambito della medicina personalizzata prevede la costruzione di un modello predittivo costituito dalla combinazione di fattori genetici e non-genetici; 5) non sono state inserite nel modello genetico varianti note per essere correlate a variazioni nei livelli di LDL: tali SNPs sembrano tuttavia non impattare fortemente sui livelli di LDL e sulla risposta al farmaco in pazienti in trattamento con statine.

Lo score di rischio genetico, basato sulle 27 varianti genetiche precedentemente identificate in studi *genome-wide*, costituisce un valido modello genetico predittivo dell'insorgenza di eventi cardio-coronarici incidenti e ricorrenti. Tale score genetico, inoltre, è risultato essere predittivo della risposta clinica alla terapia con statine in pazienti a rischio di sviluppare eventi cardio-coronarici.

Questa analisi di associazione suggerisce come l'utilizzo di tale score di rischio genetico possa essere un valido strumento atto a i) individuare i pazienti suscettibili allo sviluppo di eventi cardio-coronarici; ii) personalizzare la terapia con statine in soggetti a rischio di sviluppo di tali patologie. Essendo ad oggi fortemente dibattuto l'utilizzo di statine in pazienti con un basso rischio clinico di sviluppo di patologie cardio-coronariche, può essere rilevante da un punto di vista clinico testare il beneficio del trattamento con statine in pazienti con un basso rischio clinico ma con un elevato score di rischio genetico di sviluppo di tali patologie.

**Parole chiave:** statine, eventi cardio-coronarici, score di rischio genetico

#### Riferimento bibliografico

[Mega JL](#) et al. *Lancet* 2015 Mar 3 [Epub ahead of print]

## NEUROLOGIA

### IL POLIMORFISMO *CHRNA4* rs1044396 E' ASSOCIATO ALLA CESSAZIONE DEL FUMO DI SIGARETTA NEI PAZIENTI IN TERAPIA CON VARENICLINA

A cura della Dott.ssa Donatella Carretta

Il fumo di sigaretta è uno dei più importanti fattori di rischio associati allo sviluppo di malattie cardiovascolari e respiratorie, oltre ad essere causa di patologie oncologiche. Solo il 4-7% dei fumatori sono in grado di smettere di fumare senza l'aiuto di farmaci o trattamenti alternativi. I farmaci di prima linea approvati dall'FDA per smettere di fumare includono la terapia sostitutiva con nicotina (*nicotine replacement therapy*, NRT), il bupropione (un inibitore della ricaptazione della noradrenalina-dopamina) e la vareniclina (un agonista parziale delle subunità  $\alpha 4$  e  $\beta 2$  dei recettori nicotinici dell'acetilcolina). La vareniclina ha la maggiore efficacia terapeutica nel processo di cessazione del fumo. L'ampia variabilità individuale della risposta ai farmaci utilizzati per smettere di fumare suggerisce che il trattamento farmacologico possa essere più efficace in sottogruppi specifici di fumatori. Diversi studi hanno dimostrato che i fattori genetici sono responsabili di circa il 50% della variabilità di successo nella cessazione del fumo. Molti studi di associazione hanno mostrato che i polimorfismi nei geni *CHRNA4* e *CHRNA2* sono associati alla probabilità di iniziare a fumare, alla dipendenza da nicotina ed anche alla cessazione del fumo. Tuttavia, vi sono ancora alcuni fenotipi in cui si riscontrano risultati controversi in letteratura. I geni *CHRNA4* e *CHRNA2* codificano per le subunità  $\alpha 4$  e  $\beta 2$  dei recettori nicotinici dell'acetilcolina (nAChRs), che sono le subunità più abbondanti nel sistema nervoso centrale e bersagli specifici dell'azione della vareniclina. Le subunità  $\alpha 4$  e  $\beta 2$  sono siti importanti dell'azione della nicotina, poiché sono coinvolti nei fenomeni di gratificazione, tolleranza e sensitizzazione della nicotina. In tale contesto, lo scopo del presente studio è valutare se i polimorfismi di *CHRNA4* e *CHRNA2* siano associati alla risposta alle terapie di cessazione del fumo nei pazienti provenienti da un programma di assistenza per fumatori.

Lo studio ha arruolato 483 pazienti fumatori provenienti dal Programma Assistenza Fumatori. I pazienti sono stati sottoposti ad una visita medica iniziale e ad ulteriori 4 visite mediche di *follow-up* per 12 settimane. In ciascuna visita sono stati rilevati i dati clinici e la concentrazione di monossido di carbonio. Arbitrariamente, ai pazienti che fumavano meno di un pacchetto di sigarette al giorno è stato prescritto bupropione e NRT, mentre la vareniclina è stata somministrata ai pazienti che fumavano uno o più pacchetti di sigarette al giorno o a coloro che non avevano avuto benefici da precedenti trattamenti col bupropione e NRT. L'indicazione ad iniziare la co-somministrazione di vareniclina e bupropione è stata prescritta ai pazienti che non avevano raggiunto la completa astinenza dopo 2 o 3 settimane dall'inizio della vareniclina e nei pazienti che avevano raggiunto la completa astinenza, ma riferivano un disagio moderato o intenso per i sintomi di astinenza. Il tasso di astinenza continuativa (*Continuous Abstinence Rate*, CAR) è stato valutato dopo 6 mesi dall'inizio della farmacoterapia. I pazienti fumatori sono stati divisi in un gruppo di "successo" (pazienti che avevano completato 6 mesi di CAR, confermati dalla concentrazione di monossido di carbonio), un gruppo di "ricadute" (pazienti che non avevano completato i 6 mesi di CAR) e un gruppo "resistente" (pazienti che non avevano mai raggiunto il CAR dall'inizio del trattamento farmacologico). Sono stati analizzati il Facerström test per la dipendenza da nicotina e il punteggio della scala Issa (*Issa situational smoking score*). La genotipizzazione dei polimorfismi *CHRNA4* rs1044396 (c.C1629T), *CHRNA4* rs2236196 (c.G534A), *CHRNA2* rs2072660 (c.T313C) e *CHRNA2* rs2072661 (c.G472A) è stata effettuata tramite PCR seguita dalla *high resolution melting* analisi.

Solo i genotipi di *CHRNA4* rs1044396 sono risultati avere un'associazione significativa con la risposta positiva alla cessazione del fumo: i pazienti con genotipo CC avevano un tasso minore di successo, quando in trattamento con vareniclina (29,5%), rispetto ai pazienti con genotipo CT o TT (50,9%;  $p=0.007$ ,  $n=167$ ). In un modello *multivariate*, i genotipi CT e TT erano associati ad una maggiore OR di successo (OR=1.67, 95% CI=1.10-2.53,  $p=0.02$ ).

Nessuna associazione significativa è stata osservata all'interno dei gruppi di pazienti sottoposti agli altri schemi terapeutici (vareniclina più bupropione, o bupropione più NRT).

Il tasso di successo della cessazione del fumo non ha mostrato differenze significative dei genotipi rs2236196, rs2072660 e rs2072661 in nessun gruppo di pazienti.

Infine, non sono state osservate differenze significative nei punteggi FTND e Issa dei pazienti in relazione al polimorfismo rs1044396.

Il risultato principale del presente studio è l'associazione tra il polimorfismo *CHRNA4* rs1044396 e il successo di cessazione del fumo nei pazienti trattati con vareniclina. Questo dato può essere spiegato dal fatto che il gene *CHRNA4* codifica per recettori che sono bersagli specifici dell'azione della vareniclina. Nel presente studio, tuttavia, non è stata osservata una differenza statisticamente significativa nel tasso di

successo, in relazione a questo polimorfismo, tra i pazienti trattati con vareniclina più bupropione, probabilmente a causa del campione di pazienti troppo piccolo preso in esame.

Inoltre, in questo studio è stato osservato che i pazienti portatori del genotipo TT o CT hanno un OR di 2,18 di successo rispetto ai portatori del genotipo CC; questo dato è in accordo con precedenti studi che hanno dimostrato un'associazione dell'allele T *CHRNA4* rs1044396 con un effetto protettivo in differenti fenotipi, quali minori livelli di depressione, ansia e instabilità emotiva e minore propensione alla ND. Le implicazioni funzionali del polimorfismo *CHRNA4* rs1044396 non sono ancora ben note. La depressione e l'ansia sono frequenti comorbidità nella dipendenza da nicotina; pertanto, futuri studi dovrebbero investigare su questi differenti fenotipi per spiegare i meccanismi attraverso cui i polimorfismi di *CHRNA4* modulano malattie psichiatriche, ND e cessazione del fumo.

Per quanto riguarda i punteggi FTND e Issa non sono state osservate associazioni tra i polimorfismi dei geni *CHRNA4* e *CHRNA2* esaminati, in accordo con precedenti studi della letteratura.

Questo studio presenta alcune limitazioni: primo, il campione dei pazienti trattato con vareniclina è piccolo e di conseguenza il potere statistico è ridotto. Secondo, il *range* del punteggio FTND è piuttosto ridotto in questa coorte di soggetti, poiché la maggior parte dei pazienti che frequentava il Programma Assistenza Fumatori era classificato come affetto da una dipendenza moderata o grave.

In conclusione, il presente studio dimostra una significativa associazione tra il polimorfismo *CHRNA4* rs1044396 e la cessazione del fumo nei pazienti in terapia con vareniclina.

**Parole chiave:** vareniclina, farmacogenetica, cessazione del fumo, polimorfismo, *CHRNA4*, *CHRNA2*.

#### Riferimento bibliografico

[Rocha S](#) et al. *Front Genet* 2015, 6:46.



#### 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@sigr.it](mailto:sif.informazione@sigr.it); [sif.farmacologia@sigr.it](mailto:sif.farmacologia@sigr.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 Carginin (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 Gloria Ravegnini (Università di Bologna)
- Dott.ssa Giulia Sammarini (Università di Bologna)
- Dott.ssa Eleonora Turrini (Università di Bologna)

---

**Archivio SIF-Farmacogenetica Edicola Virtuale SIF**  
<http://edicola.sifweb.org/edicola/farmacogenetica/pagina/archivio>

Contatti: [webmaster@sifweb.org](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.

---