

**Newsletter Numero 76 – Settembre 2015**

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

Sommario**⇒ Oncologia**

- I livelli sierici di miR-335 sono associati con la risposta alla chemioembolizzazione transarteriosa e con la prognosi in pazienti con carcinoma epatocellulare
- Genotipizzazione di una famiglia con una nuova mutazione dannosa della DPYD supporta lo screening pre-terapeutico del deficit di DPD basato sul rapporto diidrouracile/uracile

⇒ Neurologia

- Variabilità genetica del gene triptofano idrossilasi 2 nella dipendenza da alcool e nei sintomi psicopatologici alcool-correlati
- Farmacogenetica dell'escitalopram: relazione tra CYP2C19, dosaggio e *outcome* clinico nei disturbi dello spettro autistico

⇒ Immunomodulazione

- Studio dell'influenza del polimorfismo MTHFR C677T sull'interruzione del trattamento con metotrexato assunto in monoterapia da pazienti affetti da artrite reumatoide: risultati del progetto europeo GAPAID
- Analisi dei microRNA circolanti in vivo in seguito alla somministrazione di desametasone e adrenocorticotropina

⇒ Tossicologia

- Prevalenza delle varianti genetiche delle cheratine 8 e 18 in pazienti con danno epatico farmaco-indotto

⇒ Le metanalisi del mese

- Polimorfismi del gene ST13 sono associati alle esacerbazioni dell'asma nei bambini e adolescenti in terapia con corticosteroidi
- La delezione del gene BIM come biomarcatore prognostico di risposta alla terapia con inibitori della tirosin chinasi EGFR in pazienti con cancro del polmone non a piccole cellule: revisione sistematica e meta-analisi

ONCOLOGIA**I LIVELLI SIERICI DI MIR-335 SONO ASSOCIATI CON LA RISPOSTA ALLA CHEMIOEMBOLIZZAZIONE TRANSARTERIOSA E CON LA PROGNOSI IN PAZIENTI CON CARCINOMA EPATOCELLULARE**

A cura della Dott.ssa Gloria Ravegnini

La chemioembolizzazione epatica (TACE) rappresenta oggi uno dei trattamenti più diffusi per il carcinoma epatico non resecabile. Tuttavia, nei pazienti con carcinoma epatocellulare (HCC) si osserva un'ampia risposta individuale alla TACE, e ad oggi non vi sono dei validi markers di risposta. I microRNA (miRNA) sono molecole di RNA non codificante in grado di regolare l'espressione proteica; recentemente, il ruolo dei miRNA nella tumorigenesi e nella formazione di metastasi ha fortemente attratto l'interesse dei ricercatori. Specificatamente, è stato dimostrato che il miR-335 agisce come soppressore delle metastasi, regolando diversi *pathways*. Nel tumore epatocellulare, i livelli di espressione di questo miRNA sono molto bassi se comparati con il tessuto non tumorale. Date le suddette premesse, lo scopo di questo studio è stato quello di analizzare i livelli sierici del miR-335 in associazione con la risposta al trattamento e con la prognosi in pazienti affetti da HCC in trattamento con TACE.

Nell'analisi sono stati arruolati un totale di 125 pazienti di nuova diagnosi (HCC in stadio II, III e IV), riceventi TACE in prima linea, 125 pazienti con epatite B e C e 125 controlli sani. Nei pazienti con HCC il sangue è stato prelevato prima del trattamento TACE e dopo trenta giorni; il sangue dei pazienti sani e con epatite è stato prelevato agli stessi *timepoints*. Per quanto riguarda i livelli sierici del miR prima della chemoembolizzazione, nei pazienti HCC, questi erano significativamente più bassi (0.89 ± 0.49) se comparati con quelli degli individui con epatite (1.89 ± 0.56) e con i controlli sani (1.95 ± 0.76), ($P < 0.001$). Trenta giorni dopo la TACE, il tasso di espressione di miR-335 nei pazienti era leggermente aumentato (1.12 ± 0.59) ma era ancora significativamente più basso ($P < 0.001$, rispetto ai pazienti con epatite, 1.88 ± 0.67 , e ai controlli 1.98 ± 0.35).

Utilizzando il valore medio di miR-335 come cut-off, è stata valutata l'associazione con le caratteristiche clinicopatologiche di HCC. Trenta giorni dopo la terapia è stato osservato che i pazienti con livelli sierici di miR-335 più bassi ($n=64$) esibivano caratteristiche più aggressive tra cui valori elevati di alfa 1-feto proteina (AFP), maggiore cirrosi, tumore di dimensioni maggiori e aumentata invasione vascolare. Tra i 125 pazienti HCC, 34 avevano raggiunto una buona risposta (risposta completa + parziale) e 91 mostravano progressione o malattia stabile. È stata quindi condotta un'analisi ROC per valutare se i livelli di miR-335 potevano essere utilizzati per discriminare i pazienti con risposta buona e scarsa. Effettivamente, dopo la terapia, il tasso di espressione di miR-335 è risultato in grado di distinguere i due gruppi (AUC=0.922, specificità=87%, sensibilità=77%, $P < 0.001$, valore cut-off=1.34): alti livelli di miR-335 post-TACE erano prevalenti tra i soggetti con risposta buona.

Infine, mediante le analisi di Kaplan-Meier è stata valutata l'associazione con TTP ed OS. Pazienti con livelli più bassi di miR-335 mostravano una riduzione in termini di OS e TTP rispetto ai pazienti con livelli più elevati (per OS e TTP, $P < 0.001$, log rank test). Per determinare il ruolo prognostico del miRNA di interesse, è stata quindi condotta un'analisi di Cox. Nell'analisi univariata, livelli di miR-335, AFP e invasione vascolare risultavano associati con OS e TTP; l'analisi multivariata ha confermato il valore prognostico di miR-335 per TTP (HR=0.34, 95%CI: 0.2-0.87, $P < 0.001$) e OS (HR=0.64, 95%CI: 0.33-0.93, $P < 0.001$) nei pazienti con HCC in trattamento con TACE.

I risultati di questo studio hanno mostrato una riduzione dell'espressione di miR-335 nei pazienti affetti da carcinoma epatocellulare, un risultato in accordo con un recente studio che ha anche evidenziato che tale riduzione di espressione è associata ad una ipermetilazione del promotore del suo gene ospite MEST (Dohi O et al. *Int J Oncol.* 2013, 42(2):411-8). Inoltre, i pazienti HCC con bassa espressione di miR-335 presentano caratteristiche clinicopatologiche sfavorevoli e scarsa risposta al trattamento TACE. Infine, miR-

335 si è dimostrato essere un marker prognostico indipendente per OS e TTP. Nonostante questi risultati siano promettenti, sono comunque necessari ulteriori studi sia per chiarire il ruolo biologico di miR-335 nel tumore epatocellulare sia per confermarne il valore prognostico.

In conclusione, questo studio mostra per la prima volta l'associazione tra espressione di miR-335 e *outcome* clinico in pazienti con carcinoma epatocellulare dopo trattamento con chemoembolizzazione trans-arteriosa.

Parole chiave: carcinoma epatocellulare, TACE, miR-335

Riferimento bibliografico

Cui L et al. *Cell Physiol Biochem*. 2015, 37(1): 276-83.

GENOTIPIZZAZIONE DI UNA FAMIGLIA CON UNA NUOVA MUTAZIONE DANNOSA DELLA DPYD SUPPORTA LO SCREENING PRE-TERAPEUTICO DEL DEFICIT DI DPD BASATO SUL RAPPORTO DIIDROURACILE/URACILE

A cura della Dott.ssa Stefania Cheli

Numerosi studi hanno dimostrato che un deficit di diidropirimidina deidrogenasi (DPD), presente nel 5% della popolazione, conferisce un rischio elevato di tossicità nei pazienti trattati con fluoropirimidine. Solo una minima quantità (1-3%) della dose di 5-fluorouracil (5-FU) somministrata, viene convertita nei metaboliti attivi, mentre oltre l'80% viene metabolizzata nella forma inattiva 5-fluorodiidrouracile (FDHU) mediante la DPD, enzima limitante di questo percorso catabolico. L'attività della DPD mostra un'elevata variabilità interindividuale, dovuta principalmente a variazioni genetiche presenti nel gene (DPYD) che codifica per l'enzima. Il *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium* (CPIC) raccomanda una modifica del dosaggio delle fluoropirimidine per gli individui omozigoti o eterozigoti delle tre varianti del gene, per le quali sono chiare le associazioni con la tossicità: c.1905+1G>A (DPYD*2A, causa delezione dell'esone 14), c.1679T>G (DPYD*13, p.Ile560Ser), e c.2846A>T (p.Asp949Val). La determinazione di tali varianti risulta efficace nel predire la tossicità di grado ≥ 3 (sensibilità 5.3%, specificità 99.4%, valore predittivo positivo 81.8% e valore predittivo negativo 68%). Altri approcci basati sul fenotipo sono stati sviluppati per determinare l'attività dell'enzima DPD e integrare l'effetto di determinanti non genetici della variabilità nella disposizione di 5-FU. Tra queste, la misurazione del rapporto endogeno tra diidrouracile e uracile (UH₂/U) si è rivelata affidabile in alcuni studi clinici, poiché l'uracile è fisiologicamente metabolizzato a diidrouracile dalla DPD. In un recente studio, Boisdron-Celle e colleghi hanno documentato che la combinazione della determinazione di UH₂/U con la genotipizzazione delle varianti rilevanti, era più accurata rispetto alla sola genotipizzazione (sensibilità 88% e specificità 78%). Nonostante le raccomandazioni di FDA ed EMA, la maggior parte dei pazienti per i quali è previsto il trattamento con le fluoropirimidine non vengono sottoposti allo screening per il deficit della DPD. Questo articolo descrive una nuova mutazione nel gene della DPYD che causa un enzima tronco inattivo, rilevata in un paziente morto dopo la somministrazione di 5-FU. Attraverso uno studio integrato di analisi genetica e di valutazione del fenotipo della DPD, sono state definite le conseguenze funzionali della mutazione sull'enzima ed il modello di ereditarietà.

Partecipanti. Questo studio è stato condotto su 22 soggetti che hanno dato il consenso informato scritto: 1 paziente con tossicità letale (probando) di grado 5 per FU, 6 volontari sani della famiglia del paziente e 15 ulteriori pazienti, precedentemente indirizzati al laboratorio per la valutazione della DPD. Il probando era una femmina caucasica di 63 anni con un adenocarcinoma di Lieberkühnen moderatamente differenziato (pT3pN1M0), che ha subito una sigmoidectomia seguita da chemioterapia adiuvante con FOLFOX (5-FU in bolo di 400 mg/m² seguito da 46h d'infusione 2400 mg/m², leucovorin 200 mg/m², oxaliplatino 85 mg/m²). Gli altri 15 pazienti sono stati selezionati in base al deficit parziale dal rapporto UH₂/U<6. Nella maggior parte dei casi (11/15 pazienti), l'indicazione al test per la valutazione del deficit della DPD è derivata dalla comparsa di grave tossicità dopo il primo o il secondo ciclo di chemioterapia (capecitabina o 5-FU). Per i restanti 4 pazienti, l'indicazione (screening pre-terapeutico o diagnosi di tossicità correlata al trattamento) non era stata comunicata dal medico prescrittore. **Determinazione del rapporto UH₂/U.** Sono stati raccolti

campioni di sangue (8 ml in provette eparinizzate) entro le ore 12. Il tempo di campionamento medio è stato alle ore 9:24 del mattino (range:7:30-10:35). Le concentrazioni plasmatiche endogene di uracile e diidrouracile sono state determinate in HPLC. **Assegnazione del fenotipo.** Sulla base del lavoro di Boisdron-Celle e colleghi, con i quali gli autori condividono lo stesso metodo di determinazione del UH_2/U , la soglia di normalità è stata fissata a $UH_2/U=6,0$. I pazienti con $1,5 < UH_2/U < 6$ sono stati considerati parzialmente carenti di DPD (attività intermedia) ed i pazienti con $UH_2/U < 1$ sono stati considerati completamente carenti (nessuna attività). **Genotipizzazione.** Il primo screening genetico è stato fatto per le 3 mutazioni della DPYD (c.1679T>G; c.1905+1G>A; c.2846A>T) con il sequenziamento Sanger. Per il probando e gli altri 15 pazienti, il sequenziamento Sanger è stato eseguito anche per la regione del promotore che fiancheggia il polimorfismo c.-1590T>C, per i 23 esoni codificanti (comprese le giunzioni esone-introne) ed una parte dell'introne 10, in cui è già stato descritto il polimorfismo funzionale c.1129-5923C>G. **Predizione della funzione delle varianti genetiche.** L'impatto delle varianti genetiche missenso sulla funzione delle proteine è stato valutato mediante il programma UMD-Predictor utilizzando il trascritto della DPYD ENST00000370192. Le mutazioni sono state poi definite qualitativamente "polimorfismi" se non patogeniche, "probabili polimorfismi", "probabilmente patogeniche" o "patogeniche". **Analisi statistiche.** Il test di Kruskal-Wallis è stato utilizzato per confrontare i valori di UH_2/U tra i 3 genotipi: eterozigoti composti (2 alleli non funzionali), eterozigote (1 allele non funzionale) e wild-type (0 alleli non funzionali). In seguito è stato eseguito un test di tendenza non parametrico tra gruppi ordinati (0, 1 o 2 alleli non funzionali). Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il software Stata 10.0. (StataCorp. 2007. *Stata Statistical Software: Release 10*. College Station, TX).

Fenotipo. Il probando presentava un valore di UH_2/U estremamente basso (0,1), che dimostrava una carenza totale di DPD. Tra i membri della famiglia del probando, la sorella 1 aveva un deficit completo di DPD con un UH_2/U pari a 0, mentre la madre, sorella 2 e la figlia mostravano un deficit parziale (UH_2/U di 3,9, 4,8, e 4,7 rispettivamente). **Genotipo.** Il primo screening del probando mostrava che era portatore eterozigote della variante c.1679T>G. Inoltre, i risultati del sequenziamento delle regioni codificanti hanno rivelato che il soggetto era eterozigote per una nuova duplicazione di 8-bp (c.168_175dupGAATAATT) nell'esone 3, che porta alla formazione di un codone di stop prematuro p.(Phe59Ter). Questa mutazione è stata quindi studiata nei 6 membri della famiglia del probando ed è stata rilevata nella madre e nella sorella 2; la figlia è risultata portatrice della sola mutazione c.1679C>T confermando che il probando presentava le due mutazioni su differenti alleli. Poichè la madre non presentava la variante c.1679T>G mentre 3 su 4 sorelle erano eterozigoti per essa, si può dedurre (non indagato) che il loro padre era eterozigote per la stessa. Il sequenziamento delle regioni codificanti della DPYD negli altri 15 pazienti non ha rivelato la presenza della variante c.168_175dupGAATAATT in alcun soggetto. Delle 22 varianti identificate: 8 sono risultate introniche, 2 nel UTR, 11 missenso ed una era la variante nel sito di splicing c.1905+1G>A. **Previsione della funzione delle varianti genetiche.** Il possibile effetto delle varianti missenso identificate è stato valutato in silico e ove disponibile è stato confrontato con i dati della letteratura. Oltre alle 3 varianti note (c.1905+1G>A, c.1679T>G e c.2846A>T) osservate in 6 pazienti su 15, sono state identificate 3 mutazioni missenso con effetto deleterio: c.257C>T (p.Pro86Leu), c.623G>A (p.Arg208Gln) e c.1027A>C (p.Thr343Pro) in altri 3 pazienti. **Rapporto genotipo/fenotipo.** Nella famiglia del probando, l'associazione tra genotipo e fenotipo, misurato tramite UH_2/U ha indicato che tutti coloro che presentavano un allele funzionale ed uno non funzionale della DPYD (madre, sorella 2 e figlia) mostravano un deficit parziale di DPD con valori di $1,5 < UH_2/U < 6$, mentre gli individui che portavano due alleli non funzionali (sorella 1 e il probando) mostravano un rapporto UH_2/U vicino allo 0, deficit completo di DPD. La nuova duplicazione di 8-bp comporta un deficit parziale con un rapporto UH_2/U pari a 3,9 quando espressa in eterozigosi (come osservato nella madre). I valori del rapporto UH_2/U sono risultati significativamente differenti tra i 3 genotipi ($p=0,01$). Il test di tendenza è risultato significativo ($p=0,003$), confermando che i valori di UH_2/U diminuiscono con il numero di alleli non funzionali (media di $UH_2/U=5,56$ per i pazienti che hanno 0 alleli non funzionali, 3,96 con un allele non funzionale e 0,05 per quelli che ne hanno 2).

Gli autori ipotizzano un modello di eredità co-dominante di deficit totale di DPD, confermato dal fatto che l'allele DPYD wild-type nella madre del probando compensava parzialmente l'allele mutato c.168_175dupGAATAATT. Come previsto, i due individui (sorella 1 e probando) che presentavano le varianti c.168_175dupGAATAATT e c.1679T>G su differenti alleli avevano un deficit completo della DPD, in quanto codificavano entrambi per un enzima inattivo.

Gli autori dimostrano che il deficit totale di DPD, osservato in un paziente caucasico che ha subito una tossicità letale da 5-FU, è causato da un genotipo eterozigote composto dal polimorfismo ben noto c.1679T>G ed una nuova duplicazione nell'esone 3 (c.168_175dupGAATAATT) mai descritta prima. Inoltre gli autori confermano l'affidabilità della misurazione del rapporto UH₂/U come metodo di screening per il deficit della DPD.

Parole chiave: 5-FU, DPYD, tossicità, decesso, farmacogenetica, UH₂/U, duplicazione

Riferimento bibliografico

Thomas F et al. *Clin Pharmacol Ther.* 2015 Aug 11 [Epub ahead of print].

NEUROLOGIA

VARIABILITA' GENETICA DEL GENE TRIPTOFANO IDROSSILASI 2 NELLA DIPENDENZA DA ALCOOL E NEI SINTOMI PSICOPATOLOGICI ALCOOL-CORRELATI

A cura della Dott.ssa Donatella Carretta

La dipendenza da alcool è una patologia multifattoriale complessa influenzata da fattori genetici e ambientali. I geni che giocano un ruolo nell'ereditarietà (stimata in un *range* del 50-60%) della patologia sembrano essere geni coinvolti nel metabolismo dell'alcool e nella trasmissione serotoninergica, GABAergica, oppioide, cannabinoide, dopaminergica e colinergica. E' stato dimostrato, sia negli animali che nell'uomo, che la serotonina (5-HT) regola il consumo di alcool ed è coinvolta in molti aspetti del consumo, dell'abuso e della dipendenza dall'alcool. Studi recenti sono stati incentrati sul gene triptofano idrossilasi 2 (*TPH2*). Il TPH2 è l'enzima limitante nella sintesi della 5-HT ed il gene *TPH2* sembra essere associato a diversi disturbi psichiatrici, quali la depressione maggiore, il comportamento suicidario, il disturbo bipolare ed il disturbo ossessivo-compulsivo. Lo scopo primario del presente studio è investigare l'associazione della variabilità genetica di *TPH2* con la dipendenza da alcool in un campione omogeneo Caucasico. E' stata inoltre effettuata un'analisi esplorativa per indagare se quattro *TPH2* tag SNPs ed i loro aplotipi siano associati a sintomi psicopatologici alcool-correlati.

Tutti i soggetti erano Sloveni maschi, di 18-65 anni di età. I pazienti alcool-dipendenti al momento dell'arruolamento nello studio soddisfacevano i criteri del DSM IV per la dipendenza da alcool. I soggetti astinenti mantenevano la completa astinenza da alcool da più di due anni. I soggetti di controllo includevano soggetti sani della stessa etnia. I soggetti con una diagnosi pregressa o attuale di dipendenza o abuso di altre sostanze (eccetto la nicotina), disturbo bipolare I, depressione maggiore, schizofrenia, disturbo schizoaffettivo, sindromi mentali organiche, trauma cranico, malattie neurologiche o patologie internistiche significative che avrebbero potuto coinvolgere il sistema nervoso centrale sono stati esclusi dallo studio.

Per la valutazione clinica sono stati utilizzati i seguenti questionari: *Zung Depression and Anxiety scale* per il tono dell'umore, *Brief Social Phobia Scale* (BSPS) per l'ansia sociale, *Yale-Brown Obsessive Compulsive Scale* (YBOCS) per i sintomi ossessivo-compulsivi e *Buss-Durkee Hostility Inventory* (BDHI) per i tratti aggressivi e ostili. Nei pazienti dipendenti i questionari sono stati somministrati almeno 2 settimane dopo l'ingresso nell'unità per il trattamento della dipendenza, quando i sintomi di astinenza si erano attenuati. Nei restanti due gruppi i questionari sono stati somministrati all'entrata dei soggetti nello studio. Sono stati genotipizzati gli SNPs *TPH2* rs4570625, rs1843809, rs7305115 e rs4290270 tramite *competitive allele-specific real-time PCR* (KASPar assay, KBioscience, Hoddesdon, Herts, UK). Lo studio comprendeva 101 pazienti dipendenti dall'alcool, 100 pazienti astinenti da alcool e 97 controlli.

Il più frequente aplotipo in tutti i gruppi era il GTGT, che è stato considerato l'aplotipo di riferimento. Nei pazienti dipendenti l'aplotipo GGAA era meno frequente ($p = 0.038$), mentre gli aplotipi GTAA e GGGT erano più frequenti ($p = 0.011$ e $p = 0.021$, rispettivamente) rispetto ai controlli.

Nei pazienti dipendenti rs4570625 ha mostrato una tendenza all'associazione con i punteggi del BDHI ($p = 0.011$, $Df = 2$, $F = 4.736$), rs1843809 una tendenza all'associazione con il punteggio della *Zung Depression Scale* ($p = 0.045$, $Df = 2$, $F = 3.201$) e rs1843809 un'associazione significativa con il punteggio del BDHI ($p = 0.001$, $Df = 2$, $F = 8.148$). Nei soggetti astinenti rs1843809 ha mostrato una tendenza all'associazione con il punteggio BSPS ($p = 0.003$, $Df = 2$, $F = 6.095$). Nei pazienti dipendenti rs4290270 ha mostrato una tendenza all'associazione con i punteggi della *Zung Depression and Anxiety Scale* ($p = 0.040$, $Df = 2$, $F = 3.337$ e $p = 0.025$, $Df = 2$, $F = 3.829$, rispettivamente).

I presenti risultati sono preliminari ed applicando la correzione di Bonferroni solo l'associazione tra rs1843809 e il punteggio BDHI ($p = 0.001$) e tra l'aplotipo GTAA e la *Zung Anxiety Scale* e il punteggio BDHI ($p = 0.001$ and $p < 0.001$, rispettivamente) nei pazienti dipendenti è rimasto significativo.

L'analisi degli SNPs di selezionati polimorfismi di *TPH2* non ha rilevato significative associazioni con la dipendenza da alcool, in accordo con dati riportati in altri studi. Nel presente studio è stata osservata una tendenza all'associazione dell'aplotipo GGAA (meno frequente) e degli aplotipi GTAA e GGGT (più frequenti) nei pazienti dipendenti rispetto ai controlli. I risultati del presente studio indicano che SNPs di *TPH2* non rappresentano la base primaria della dipendenza da alcool ma che piuttosto dovrebbe essere considerato, e quindi studiato in esteso, il ruolo degli aplotipi.

Nella parte esplorativa del presente studio è stata osservata un'associazione significativa tra i tratti aggressivi e il genotipo rs1843809 nei pazienti dipendenti (i soggetti con genotipo rs1843809 TT hanno mostrato minori tratti di aggressività). Gli studi in questo campo sono scarsi. Considerando che un atto di suicidio presenta elementi di aggressività e che un precedente studio nella popolazione Slovena ha riportato un'associazione *borderline* tra il polimorfismo rs1843809 e il suicidio correlato all'alcool è possibile ipotizzare un ruolo di questo SNP nei sintomi aggressivi alcool-correlati; tuttavia, un altro studio nella popolazione Tedesca non ha rilevato alcuna associazione tra questo SNP e il tentativo di suicidio negli alcolisti.

Per ciò che concerne la sintomatologia ansiosa, nel presente studio è stata osservata una tendenza all'associazione tra ansia sociale e genotipo rs1843809 nei soggetti astinenti e sintomi ansiosi di maggiore entità nei soggetti dipendenti con genotipo rs4290270 AA. Questi risultati sono stati confermati dall'analisi degli aplotipi. Diversi studi in letteratura sono consistenti con i presenti dati in quanto hanno dimostrato un ruolo delle varianti del gene *TPH2* nei disturbi d'ansia.

Il significato del presente studio è limitato dal campione di soggetti relativamente piccolo. I polimorfismi e gli aplotipi di *TPH2* investigati hanno mostrato alcune associazioni con i tratti depressivi, di ansia, di ansia sociale e di aggressività nei soggetti dipendenti dall'alcool; tuttavia, in questo campione limitato, solo poche associazioni sono state confermate dopo la correzione di Bonferroni. Pertanto, i presenti risultati dovrebbero essere considerati preliminari e necessitano di essere replicati in un campione più ampio. Un'altra limitazione dello studio risiede nel dato che i soggetti dipendenti erano in trattamento con psicofarmaci, un fattore che potrebbe aver influenzato i valori delle scale di valutazione. I controlli sani e i soggetti astinenti, al contrario, non assumevano farmaci psicoattivi.

In conclusione, il presente studio suggerisce un potenziale ruolo del gene *TPH2* nella dipendenza da alcool; la variabilità genetica di *TPH2* potrebbe essere associata a tratti di ansia e aggressività nei soggetti alcool-dipendenti.

Parole chiave: dipendenza da alcool, sintomi di comorbidità, aplotipo, SNP, triptofano idrossilasi 2

Riferimento bibliografico

[Plemenitaš A](#) et al. *Neurosci Lett* 2015, 604: 86-90

FARMACOGENETICA DELL'ESCITALOPRAM: RELAZIONE TRA CYP2C19, DOSAGGIO E OUTCOME CLINICO NEI DISTURBI DELLO SPETTRO AUTISTICO

A cura della Dott.ssa Claudia Pisanu

I disturbi dello spettro autistico (ASD) sono caratterizzati da alterazioni della capacità di comunicazione sociale e da comportamenti, interessi e attività ripetitivi e ristretti. La prevalenza di ASD è stata stimata in 1 su 68 bambini negli USA. Le terapie comportamentali sono generalmente utilizzate come trattamento di prima linea, ma il 35-56% dei pazienti viene trattato con farmaci. I sintomi che richiedono una terapia comprendono irritabilità, comportamento aggressivo e iperattività. E' stato suggerito che alterazioni del sistema serotoninergico possano esercitare un ruolo nella patogenesi dell'ASD. Le due classi di farmaci maggiormente utilizzate per il trattamento dei sintomi descritti comprendono antipsicotici e inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina (SSRI). Mentre i risultati relativi all'efficacia degli SSRI sui comportamenti ripetitivi sono discordanti, è stata suggerita una potenziale efficacia di questi farmaci sull'irritabilità. Tuttavia, il trattamento con SSRI nel 23-38% dei pazienti può indurre effetti avversi come aggressività o irritabilità durante la titolazione del farmaco. E' stato ipotizzato che alcuni sottogruppi di pazienti con ASD siano più suscettibili allo sviluppo di questi effetti avversi. Pur non essendo formalmente indicato nella terapia dell'ASD, escitalopram (S-CT) può essere utilizzato per il trattamento di irritabilità e comportamenti ripetitivi. L'enzima epatico CYP2C19 è quello maggiormente coinvolto nella trasformazione di S-CT in S-desmetilcitalopram (S-DCT), un metabolita caratterizzato da minore affinità per il trasportatore della serotonina. Gli autori di questo studio open-label hanno esaminato l'effetto di alcune varianti del CYP2C19 sul miglioramento dei sintomi, sull'induzione di effetti avversi sul comportamento e sulla tollerabilità di un regime di titolazione predefinito con escitalopram in pazienti con ASD.

Il campione comprendeva 89 pazienti reclutati presso la *Developmental Disorders Clinic* e la *Neurodevelopmental Psychopharmacology Clinic* dell'Università di Chicago e Università dell'Illinois. I criteri di inclusione comprendevano: diagnosi confermata di ASD (inclusi autismo, sindrome di Asperger o disturbo pervasivo dello sviluppo non altrimenti specificato secondo i criteri del DSM-IV-TR) e un punteggio minimo di 12 nell'*Aberrant Behavior Checklist – Community Version Irritability Subscale* (ABC-CV-Irr). I pazienti inclusi nello studio non erano affetti da altre condizioni mediche o psichiatriche, non avevano mai assunto escitalopram o citalopram in precedenza e non assumevano altri farmaci psicoattivi al momento dell'arruolamento. Lo score ABC-CV-Irr è stato scelto come *outcome* principale per la valutazione dei sintomi sulla base del fatto che i pazienti che riportano un punteggio alto su questa scala sono quelli che più comunemente vengono trattati con il farmaco. Lo score totale ABC-CV e altri score parziali sono stati utilizzati per analisi secondarie. L'irritabilità rappresentava sia un sintomo target per la valutazione della risposta, sia un possibile effetto avverso dose-correlato. Lo score ABC-CV è stato compilato settimanalmente da genitori e *caregiver* per le sei settimane di durata dello studio. I pazienti hanno assunto 2.5 mg/die di escitalopram per la prima settimana per passare a 5, 10, 15 e infine 20 mg/die per via orale. In caso di effetti avversi, la titolazione veniva modificata per fare in modo che la dose rimanesse tollerabile.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a un prelievo di sangue venoso prima dell'inizio del trattamento. La genotipizzazione di tre varianti del CYP2C19 è stata effettuata mediante pirosequenziamento. Le varianti selezionate comprendevano rs4244285, rs4986893, rs12248560, ovvero i polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) che definiscono gli alleli CYP2C19*2, CYP2C19*3 e CYP2C19*17, rispettivamente. Le prime due varianti riducono l'attività enzimatica del CYP2C19, mentre la terza variante è associata a un'augmentata attività. Sulla base dei genotipi di queste varianti, sono state definite quattro categorie di metabolizzatori: *extensive metabolizer* (*1/*1), *intermediate metabolizer* (*1/*2 o *1/*3), *poor metabolizer* (*2/*2, *2/*3 o *3/*3) e *ultrarapid metabolizer* (*1/*17 o *17/*17). Tuttavia, nello studio è stato individuato un solo *poor metabolizer* (*2/*2) e la sua risposta e caratteristiche cliniche non differivano rispetto a quelle degli *intermediate metabolizer*. Gli autori hanno quindi deciso di unire questi due gruppi nella classe *reduced metabolizer*.

Per valutare le differenze tra baseline ed endpoint a sei settimane, relativamente all'*outcome* principale e a quelli secondari, sono stati realizzati una serie di modelli di regressione lineare *mixed effect* utilizzando come variabili indipendenti la classe di metabolizzatori, il tempo e l'interazione classe*tempo. Per valutare a quale time point iniziavano ad esserci differenze tra i gruppi di metabolizzatori relativamente alla titolazione del farmaco, sono state utilizzate come variabili indipendenti delle variabili dicotomiche per la classe di metabolizzatori, per ogni punto di valutazione (settimana 1, 2, 3, 4, 5 o 6 vs baseline), per la settimana di titolazione della dose (settimana 2, 3, 4, 5, 6 vs 1) e le interazioni a due vie.

84 pazienti hanno completato la titolazione del farmaco a sei settimane. I risultati dello studio hanno mostrato un miglioramento dello score ABC-CV-Irr, dello score totale e degli altri score parziali dall'arruolamento all'*endpoint*, ma la portata del miglioramento non è stata diversa in base alla classe di metabolizzatori del *CYP2C19*. Tra gli 84 pazienti che hanno completato lo studio, 44 hanno seguito il regime di titolazione prestabilito fino a 20 mg. Le dosi finali medie [media \pm deviazione standard (SD)] tollerate dai pazienti sono state di 12.5 ± 7.8 per gli *ultrarapid metabolizer*, 15.4 ± 6.4 per gli *extensive metabolizer* e 16.7 ± 5.8 per i *reduced metabolizer* ($p = 0.26$). È stato osservato un trend per l'interazione gruppo*tempo rispetto alla dose ($p = 0.1$). Questa interazione era guidata dalle differenze nel tasso lineare di cambiamento della dose dalla settimana 1 all'*endpoint* per i *reduced metabolizer* rispetto agli *ultrarapid metabolizer* ($p = 0.05$). Gli autori hanno osservato una differenza significativa nella pendenza del cambiamento di dose dalla settimana 4 alla settimana 6 negli *ultrarapid* rispetto agli *extensive metabolizer* (settimana 4 vs 1, $p = 0.04$; settimana 5 vs 1, $p = 0.016$; settimana 6 vs 1, $p = 0.02$), con un tasso più lento di cambiamento della dose negli *ultrarapid metabolizer*. Inoltre, è stata osservata una differenza significativa nella pendenza del cambiamento della dose tra *ultrarapid* e *reduced metabolizer* alla settimana 6 ($p = 0.0025$).

Lo studio ha mostrato una minore tollerabilità all'aumento della dose di escitalopram negli *ultrarapid metabolizer*. Questo risultato sembra essere contrario rispetto all'ipotesi che i *reduced metabolizer* possano mostrare un maggior numero di eventi avversi e, di conseguenza, maggiori difficoltà nel rispettare uno schema di titolazione fisso. Gli autori ipotizzano che la minore tollerabilità dell'aumento della dose osservata negli *ultrarapid metabolizer* potrebbe essere associata al raggiungimento dello steady-state in un tempo più breve, più che alla concentrazione finale allo steady-state. Tra i limiti dello studio, gli autori riportano la mancata misurazione delle concentrazioni di escitalopram e dei suoi metaboliti, la ridotta dimensione del campione, l'impossibilità di valutare l'effetto placebo per via del design open-label e la scelta di genotipizzare solo tre varianti del *CYP2C19*.

In conclusione, lo studio suggerisce una minore tollerabilità dell'aumento della dose di escitalopram in pazienti con ASD portatori di varianti del *CYP2C19* che conferiscono lo status di *ultrarapid metabolizer*.

Parole chiave: escitalopram, ASD, CYP2C19

Riferimento bibliografico

[Bishop JR](#) et al. *Pharmacogenet Genomics* 2015 Aug 26 [Epub ahead of print].

IMMUNOMODULAZIONE

STUDIO DELL'INFLUENZA DEL POLIMORFISMO MTHFR C677T SULL'INTERRUZIONE DEL TRATTAMENTO CON METOTREXATO ASSUNTO IN MONOTERAPIA DA PAZIENTI AFFETTI DA ARTRITE REUMATOIDE: RISULTATI DEL PROGETTO EUROPEO GAPAID

A cura della Dott.ssa Sarah Cargnin

Il metotrexato è un farmaco antimetabolita raccomandato dall'EULAR (Lega europea contro le malattie reumatiche) come farmaco di prima linea per la terapia dell'artrite reumatoide (AR). Tale farmaco presenta un buon profilo beneficio/rischio e la sua efficacia nel rallentare il danno strutturale indotto da AR è stata dimostrata da numerosi trials clinici. Tuttavia, a causa dell'insorgenza di eventuali effetti avversi o di scarsa efficacia terapeutica, solo il 55% dei pazienti con AR permane in trattamento con metotrexato per più di due anni consecutivi. Dalla pratica clinica emerge, inoltre, come una significativa efficacia della terapia con metotrexato fin dalle prime fasi della malattia risulti in un consistente miglioramento dell'outcome clinico a lungo termine. Si rende quindi necessaria l'individuazione di fattori predittivi della risposta alla terapia con tale farmaco che consentano di ottimizzare e personalizzare il trattamento farmacologico. In tale contesto, più studi farmacogenetici hanno riportato una plausibile correlazione tra la variante C677T del gene MTHFR

ed il rischio di interrompere il trattamento con metotrexato. Nello specifico, il gene MTHFR codifica per un enzima implicato nel pathway dell'acido folico, una vitamina che svolge un ruolo chiave nella sintesi delle purine e che sembra essere protettiva nei confronti dell'insorgenza di effetti avversi indotti da metotrexato. Il polimorfismo C677T del gene MTHFR risulta in una riduzione dell'attività enzimatica, in un aumento dei livelli plasmatici di omocisteina e in un'alterata distribuzione dei folati. Nonostante tale variante sia stata ampiamente analizzata in relazione alla risposta con metotrexato in più coorti indipendenti di pazienti con AR, non sono ad ora disponibili dati conclusivi riguardo alla sua validità come fattore predittivo della risposta a tale farmaco. Dati i risultati controversi in letteratura, l'obiettivo di questo studio è stato quello di replicare la potenziale associazione tra la variante MTHFR C677T e la risposta a metotrexato in un'ampia coorte di pazienti affetti da artrite reumatoide.

Il progetto europeo GAPAD ha previsto l'arruolamento di 269 pazienti caucasici affetti da AR, diagnosticata sulla base dei criteri proposti dall'*American College of Rheumatology*. Nello specifico, 133 pazienti sono stati reclutati presso il Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale dell'Università di Pisa mentre i restanti 136 sono stati arruolati presso il Dipartimento di Reumatologia ed Immunologia dell'Università di Pécs (Ungheria). Dei 269 pazienti totali, 197 risultavano essere caratterizzati in maniera esaustiva relativamente alla risposta al trattamento con metotrexato. Nello specifico, la terapia con metotrexato è stata definita come fallimentare in caso di interruzione del trattamento per inefficacia terapeutica o insorgenza di eventi avversi (*pazienti non-responders*). Al contrario, sono stati definiti *responders* i pazienti che non hanno manifestato nessuna interruzione del trattamento. Per ogni paziente arruolato è stato raccolto un campione di sangue periferico da cui è stato estratto il DNA germinale. La genotipizzazione della variante MTHFR C677T è stata effettuata mediante Real-Time PCR.

L'analisi di associazione è stata condotta su una coorte di 197 pazienti affetti da AR (69 italiani e 128 ungheresi) di cui il 79,2% di sesso femminile e di età media di $44,84 \pm 14,15$ anni al momento dell'insorgenza della malattia. Non sono emerse differenze statisticamente significative tra i pazienti italiani e quelli ungheresi arruolati per lo studio, sia in termini di variabili cliniche che demografiche. Dei 197 pazienti totali, 85 (43,1%) presentavano un'interruzione del trattamento con metotrexato. Pazienti *responders* (n=112) e *non responders* (n=85) alla terapia con metotrexato (assunto in mono o politerapia) sono risultati essere comparabili in quanto a caratteristiche demografiche e cliniche. Nello specifico, erano 68 su 197 i pazienti trattati con metotrexato in monoterapia, 48 dei quali *responders* al trattamento. Dall'analisi di confronto tra *responders* e *non-responders* al metotrexato assunto in monoterapia è emerso come una più giovane età al momento dell'insorgenza della malattia fosse correlata ad un maggior rischio di interrompere il trattamento (*responders*: $51,2 \pm 14,0$ anni; *non-responders*: $39,7 \pm 16,1$ anni; $P=0,006$). I genotipi per la variante MTHFR C677T sono risultati essere in equilibrio di Hardy-Weimberg. Dall'analisi di associazione tra la variante in studio e la risposta alla terapia con metotrexato condotta sull'intera coorte di pazienti (n=197), non è emersa nessuna correlazione statisticamente significativa in ciascuno dei modelli genetici analizzati (ad esempio, modello recessivo: OR 1,40 95% CI 0,67-2,93; $P=0,375$). Al contrario, restringendo l'analisi solo ai pazienti in monoterapia con metotrexato, si è evidenziato un trend di associazione tra la variante in studio e la risposta alla terapia nel modello recessivo (OR 3,15 95% CI 0,93-10,67; $P=0,057$).

Dall'analisi ivi condotta non è emersa una correlazione significativa tra la variante MTHFR C677T e la risposta a metotrexato valutata in una coorte di pazienti caucasici affetti da AR ed in trattamento con tale farmaco, sia stato esso assunto in mono o politerapia. Al contrario, è stato riportato un trend di associazione tra il medesimo polimorfismo e la risposta al metotrexato assunto esclusivamente in monoterapia. Una plausibile spiegazione a supporto di tali risultati risiede nel fatto che la variante MTHFR C677T possa modulare la risposta al metotrexato solo se assunto in monoterapia. È possibile, quindi, che risultati discordanti riportati in letteratura da diversi studi farmacogenetici possano essere, almeno in parte, dovuti all'eterogeneità nel trattamento con metotrexato tra le coorti analizzate. In aggiunta a ciò, gli Autori ipotizzano come anche il variare tra gli studi delle definizioni di risposta alla terapia possa fortemente impattare sull'esito delle analisi di associazione genetica. In ultimo, la significatività borderline nell'analisi di associazione tra il polimorfismo e la risposta a metotrexato assunto in monoterapia è stata riscontrata unicamente nel modello genetico recessivo. Studi *in vitro* dimostrano come l'attività dell'enzima MTHFR nei soggetti eterozigoti (CT) per lo SNP C677T si aggiri attorno al 60% mentre quella nei soggetti mutati *wild-type* (TT) sia pari al 30% di quella riportata negli individui *wild-type* (CC) per la variante. Questa evidenza biologica rende plausibile il fatto che il trend di associazione si evidenzi solo nel modello recessivo.

Ulteriori studi prospettici sono quindi necessari al fine di validare MTHFR C677T come fattore predittivo della risposta a metotrexato. Gli Autori suggeriscono, quindi, come tali studi debbano preferibilmente essere condotti su ampie coorti di pazienti di differenti etnie ed in trattamento in monoterapia con metotrexato.

Dal progetto europeo GAPAD emerge un trend di associazione tra la variante MTHFR C677T e la risposta a metotrexato assunto in monoterapia da pazienti caucasici affetti da artrite reumatoide.

Parole chiave: metotrexato, artrite reumatoide, MTHFR

Riferimento bibliografico

[Uribarri M](#) et al. *Clin Exp Rheumatol* 2015 Aug 27 [Epub ahead of print].

ANALISI DEI MICRORNA CIRCOLANTI IN VIVO IN SEGUITO ALLA SOMMINISTRAZIONE DI DESAMETASONE E ADRENOCORTICOTROPINA

A cura delle Dott.sse Marianna Lucafò e Sara De Iudicibus

I microRNA (miRNA) sono piccole molecole di RNA non codificante coinvolte nei meccanismi epigenetici di regolazione a livello post-trascrizionale: essi risultano essere implicati nella modulazione di alcuni processi fondamentali come la proliferazione cellulare, apoptosi, sviluppo, regolazione immunitaria e secrezione ormonale. Recenti studi hanno dimostrato che i miRNA oltre ad essere presenti nei tessuti, vengono anche rilasciati in circolo: la funzione fisiologica dei miRNA circolanti è perlopiù ancora sconosciuta, ma l'ipotesi è che essi possano agire come gli ormoni, convogliando informazioni epigenetiche ai tessuti lontani.

Ci sono alcuni risultati che dimostrano che l'espressione dei miRNA tissutali è influenzata dagli ormoni: i profili di espressione dei miRNA in organi che producono steroidi sono risultati essere modulati dal trattamento con adrenocorticotropina (ACTH), desametasone ed estradiolo, e anche i miRNA circolanti potrebbero subire quindi l'influenza ormonale. In particolare, il miRNA circolante hsa-miR-483-5p è emerso come un biomarker patogenetico del carcinoma adrenocorticale: in questo tipo di tumore, i test di soppressione del desametasone e di stimolazione dell'ACTH vengono utilizzati correntemente come approcci diagnostici.

L'obiettivo di questo studio è valutare l'eventuale variazione di espressione di alcuni miRNA circolanti in seguito a trattamento con ACTH e desametasone: i miRNA selezionati sono 5 (hsa-miR-27a, hsa-miR-200b, hsa-miR-214, hsa-miR-483-5p, e hsa-miR-503), che sono risultati essere modulati in un modello murino da ACTH o desametasone (hsa-miR-27a, hsa-miR-200b, hsa-miR-214, e hsa-miR-503), e/o coinvolti nella patogenesi del carcinoma adrenocorticale (hsa-miR-214, hsa-miR-483-5p, and hsa-miR-503). In particolare, il miRNA-483-5p è risultato essere up-regolato sia nei tessuti colpiti da carcinoma adrenocorticale sia come miRNA circolante nel sangue del paziente.

I miRNA selezionati sono stati studiati in 20 individui: 10 esaminati per diagnosticare un eventuale ipercortisolismo (sindrome di Cushing) utilizzando il test di soppressione del desametasone (1 mg), e altri 10 utilizzando il test dell'ACTH (250 µg) per diagnosticare insufficienza surrenalica o iperplasia surrenalica congenita.

Per ogni paziente è stato effettuato un prelievo di sangue in EDTA, da cui è stato separato ed isolato il plasma per la valutazione dei miRNA circolanti.

In seguito all'estrazione dell'RNA e alla sua retro-trascrizione con kit specifici e standardizzati, l'espressione dei miRNA selezionati è stata quantificata mediante real-time PCR utilizzando specifici kit TaqMan.

In parallelo, la linea di carcinoma adrenocorticale NCI-H295R è stata trattata per 8 ore con desametasone 100 nM, e sono stati quantificati i miRNA selezionati sia sulle cellule che sul terreno.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che solo l'hsa-miR-27a è risultato essere significativamente regolato in vivo da entrambi gli ormoni: in particolare up-regolato dal desametasone e down-regolato dall'ACTH. Inoltre, l'espressione di questo miRNA è risultata significativamente aumentata anche in vitro in seguito a trattamento con desametasone nel medium della linea cellulare NCI-H295R; anche a livello cellulare l'hsa-miR-27a risultava up-regolato dal trattamento, ma in maniera non statisticamente significativa.

Al contrario, l'espressione del hsa-miR-483-5p, proposto in letteratura come marker diagnostico del carcinoma adrenocorticale, non ha subito una modulazione nella sua espressione né da parte dell'ACTH né del desametasone.

In conclusione, in questo studio è stato dimostrato che il miRNA circolante hsa-miR-27a è regolato da ormoni dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene sia in vitro che in vivo. Questi risultati consentono di ipotizzare che la modulazione dell'hsa-miR-27a da parte dell'ACTH e del desametasone possa essere anche coinvolta nei meccanismi patogenetici di alcune malattie, ad esempio l'ipercortisolismo, ma saranno necessari studi più approfonditi per meglio caratterizzare il ruolo di questo miRNA circolante.

Parole chiave: miRNA circolanti, in vivo, desametasone, ACTH, biomarker

Riferimento bibliografico

[Igaz I](#) et al. *Int J Endocrinol* 2015,589230.

TOSSICOLOGIA

PREVALENZA DELLE VARIANTI GENETICHE DELLE CHERATINE 8 E 18 IN PAZIENTI CON DANNO EPATICO FARMACO-INDOTTO

A cura della Dott.ssa Lucia Gozzo

Le cheratine (K) rappresentano un sottogruppo di filamenti intermedi (IF) riscontrati in particolare negli epitelii. Ogni tipo cellulare contiene specifici *pattern* di espressione delle cheratine di tipo I (relativamente acide) e II (relativamente basiche). Ad esempio, le cheratine K1/K10 e K5/K14 sono tipiche rispettivamente dei cheratineociti basali e soprabasali, mentre le cheratine K8/K18/K19/K20 sono tipiche degli epitelii ghiandolari. Gli epatociti adulti contengono solo le cheratine K8/K18. Queste proteine hanno un ruolo citoprotettivo, dimostrato anche dal fatto che mutazioni dei geni che le sintetizzano predispongono allo sviluppo di più di 60 patologie (*Haines RL, Lane EB. J Cell Sci. 2012;125:3923-8*). Mutazioni o perdita delle cheratine K8/K18 predispongono ad un danno grave da diversi fattori, inclusi i farmaci (*Strnad P et al. Plos One 2012, 7:e32669*). Studi su modelli animali suggeriscono un'associazione tra mutazione di cheratine e suscettibilità all'epatotossicità da sostanze chimiche e studi sull'uomo rivelano l'associazione tra varianti K8/K18 ed epatotossicità da acetaminofene (*Strnad P et al. Gastroenterology 2010,139:828-35*). Studi di associazione hanno identificato le varianti di cheratine iper-rappresentate nei pazienti con insufficienza epatica terminale, insufficienza epatica acuta, epatite cronica C o cirrosi biliare primaria, e quelle che predispongono ad *outcome* clinici negativi.

È stato ipotizzato che le varianti K8/K18 possano contribuire alla suscettibilità al danno epatico farmaco-indotto idiosincrasico (*idiosyncratic drug-induced liver injury*, DILI), causa principale di insufficienza epatica acuta. Il DILI rappresenta inoltre la causa principale di interruzione dei programmi di sviluppo clinico di nuovi farmaci. Diversi studi suggeriscono una componente genetica alla base dell'insorgenza di DILI, in particolare per la presenza di varianti degli antigeni leucocitari e degli enzimi che metabolizzano i farmaci (*Fontana RJ. Gastroenterology 2014,146:914-28*).

In questo studio è stata condotta un'analisi su 800 soggetti con DILI arruolati nello studio *DILI Network*, e sono state identificate diverse nuove varianti K8/K18.

Tra l'agosto 2004 e l'aprile 2009 sono stati reclutati 808 soggetti presso 8 ospedali degli Stati Uniti partecipanti al DILIN. I casi sono stati suddivisi in *pattern* epato-cellulare, colestatico o misto.

Per valutare l'importanza delle varianti K8/K18 sono stati valutati 800 soggetti con DILI ben caratterizzato. Tra i soggetti esaminati, il 72% era di origine caucasica, mentre nell'11% dei casi erano soggetti ispanici ed afro-americani. Nel 63% dei pazienti, il DILI era molto probabile o definito, mentre in meno del 5% lo *score* era improbabile. Circa il 55% dei casi si presentava con danno epato-cellulare all'esordio, mentre il 25 ed il

20% presentava rispettivamente un *pattern* colestatico e misto. Il DILI fatale era stato registrato nel 9% dei pazienti ed il 55% aveva richiesto ospedalizzazione. L'analisi degli *hotspot* mutazionali delle cheratine K8/K18 ha rivelato varianti esoniche in 101 pazienti (12,6%) ed introniche in 15 pazienti (1,9%). Varianti amino-acidiche sono state riscontrate in 86 soggetti (10,8%), di cui la più frequente era la variante K8 R341H (40 soggetti, 5%), particolarmente comune negli ispanici (9/88, 10,2%). Nei soggetti afro-americani le varianti più frequenti erano la K8 A333A (13/87, 14,9%) e la K8 G434S (10/87, 11,5%). La variante K8 IVS6+46A>T rappresentava la più comune variante intronica (1,3%). Sono state riscontrate 8 nuove varianti mai descritte, incluse 5 alterazioni amino-acidiche (K8 K393R, K8 A351V, K8 A358V, K8 I346V, K18 D89H).

Per valutare se le varianti riscontrate erano sovra-rappresentate in pazienti con DILI, le frequenze sono state confrontate con dati presenti in *database* pubblici. Tutte le varianti comuni, come anche le varianti amino-acidiche, sono state riscontrate con frequenze simili in controlli della stessa etnia, e risultati analoghi sono stati ottenuti quando sono stati presi in considerazione pazienti con alti *score* di casualità.

I farmaci più frequentemente coinvolti in questa coorte erano l'amoxicillina/acido clavulanico, l'isoniazide e la nitrofurantoina, ed in tutti i casi è stata riscontrata una distribuzione simile delle varianti K8/K18. Ulteriori analisi hanno rivelato una distribuzione simile delle varianti tra i pazienti con diversi gradi di casualità del DILI o con diverso grado di severità, come anche per un diverso *pattern* di danno epatico. Comunque è stato riscontrato un *trend* di associazione tra alcune varianti amino-acidiche ed il DILI fatale/grave (14%) rispetto al DILI lieve/moderato (9,7%; P = 0,09). Questo *trend* diventa significativo quando si analizzano solo i pazienti con alto *score* di casualità (14,3% versus 8,7%; P = 0,05). Le varianti K8 K393R e K18 D89H risultano conservate tra le specie e sono state riscontrate in pazienti con DILI fatale e DILI colestatico, mentre non sono state rilevate in >300 asiatici e >5.000 caucasici del *database* dei controlli. La variante K8 A358V risulta conservata in diverse specie ma non in altre cheratine del gruppo II, ed è stata riscontrata in un soggetto con DILI grave. La variante non conservata K8 A351V è stata osservata in pazienti con DILI lieve. È stata infine condotta una valutazione dell'impatto delle nuove varianti sull'architettura delle cheratine, trovando che K8 K393R e K18 D89H causano più frequentemente un'alterazione del *network* di filamenti. Questi dati suggeriscono che è probabile che le varianti rare K8/K18, risultanti in un'alterazione della struttura del citoscheletro di cheratine, predispongano al DILI grave.

I risultati di questo studio dimostrano che la frequenza di varianti delle cheratine non è aumentata in pazienti con DILI, in contrasto con ciò che è stato riscontrato in pazienti con epatite cronica C, cirrosi biliare primaria e insufficienza epatica acuta. Il mancato riscontro di un'associazione potrebbe essere dovuto al numero limitato di casi attribuiti ad un singolo farmaco, considerato che la coorte di 800 pazienti includeva 250 farmaci, erbe e supplementi dietetici. Studi precedenti suggeriscono che le varianti K8/K18 predispongono solo ad alcuni tipi specifici di danno epatico. Pur non essendo stata riscontrata un'aumentata frequenza delle varianti comuni nei soggetti con DILI, è stato riscontrato un chiaro *trend* di associazione tra queste varianti ed i casi più gravi. A causa del basso numero di pazienti analizzati, ulteriori studi sono necessari per confermare questa osservazione, simile a quella dei pazienti con insufficienza epatica acuta in cui la presenza delle varianti K8/K18 era associata con *outcome* negativo. Inoltre, sono state individuate diverse varianti non note che è probabile abbiano un'importanza biologica. Le varianti K8 K393R e K18 D89H sono le prime descritte localizzate nel dominio più conservato, risulterebbero letali a livello embrionale nell'uomo e rappresenterebbero i più importanti *hotspot* mutazionali in cheratine epidermiche e altri IF associati a malattia. Considerazioni strutturali, esperimenti su colture cellulari, dati su topi transgenici ed il fatto che i pazienti con le varianti K8 K393R/K18 D89H siano affetti da DILI fatale, sottolineano l'importanza di queste sostituzioni nell'*outcome* del DILI. Sebbene l'esatta patogenesi del DILI rimane ancora da chiarire, l'assenza di K8/K18 risulta in multiple disfunzioni cellulari che probabilmente contribuiscono allo sviluppo/progressione del danno epatico. Ad esempio, le cheratine sono importanti proteine meccano-protettive e la mutazione K18 R90C risulta in fragilità degli epatociti (Ku NO et al. *Hepatology* 2007,46:1639-49). Inoltre, K8/K18 sono geni con funzione anti-apoptotica (Omary MB et al. 2009,119:1794-805) e possono proteggere gli epatociti dalla necrosi come dimostrato in topi transgenici che esprimono la variante K18 D238E/D397E che non può essere clivata dalle caspasi durante l'apoptosi (Weerasinghe SVW et al. *J Cell Sci* 2014,127:1464-75). Le cheratine inoltre modulano la posizione degli organuli, e alterazioni delle K8/K18 comportano disfunzione mitocondriale e suscettibilità allo stress ossidativo (Zhou Q et al. *Hepatology* 2005,41:517-25; Tao GZ et al. *J Cell Sci* 2009,122:3851-5). Le cheratine agiscono anche come piattaforme di vie di segnalazione, essendo importanti nella localizzazione

delle proteine, nella modulazione della sintesi proteica, nella crescita e proliferazione cellulare (Snider NT, Omary MB *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014,15:163–77).

In conclusione, per la prima volta sono state descritte nuove varianti delle cheratine *K8/K18* che portano ad alterazione del *network* di filamenti citoscheletrici. Le varianti comuni sono state trovate espresse in percentuali simili in soggetti con DILI e nei controlli della stessa etnia. Le varianti rare individuate, invece, possono predisporre all'insorgenza di DILI in un sottogruppo di pazienti.

Parole chiave: danno epatico farmaco-indotto, *K8/K18*

Riferimento bibliografico

[Usachov V](#) et al. *BMC Medicine* 2015, 13:196.

LE METANALISI DEL MESE

POLIMORFISMI DEL GENE ST13 SONO ASSOCIATI ALLE ESACERBAZIONI DELL'ASMA NEI BAMBINI E ADOLESCENTI IN TERAPIA CON CORTICOSTEROIDI

A cura della Dott.ssa Valeria Conti

I corticosteroidi, o glucocorticoidi (GC), per via inalatoria sono considerati il trattamento di prima linea per ridurre l'infiammazione delle vie aeree e migliorare la funzione polmonare nei pazienti asmatici. Tuttavia, circa il 10% degli individui trattati manifestano sintomi severi nonostante l'uso regolare di GC. È stato suggerito che la variabilità nella risposta alla terapia inalatoria con corticosteroidi (*Inhaled Corticosteroids, ICS*) possa essere causata anche da polimorfismi in geni coinvolti nella formazione e funzione del complesso GC-recettore. Lo scopo di questo studio è stato valutare se la suscettibilità genetica potesse essere associata a un aumento del rischio d'intensificazione della patologia asmatica nonostante la terapia con ICS.

Gli autori hanno eseguito una metanalisi di tre studi osservazionali tra loro indipendenti. Il primo è lo studio *PACMAN* (*The Pharmacogenetics of Asthma Medication in Children*) condotto su bambini e adolescenti d'età compresa tra i 4 e i 12 anni. Il secondo e il terzo studio sono, rispettivamente, lo studio *BREATHE* che includeva pazienti di età compresa tra i 3 e i 22 anni e il *PAGES* (*The Pediatric Asthma Gene Environment Study*) condotto su pazienti da 2 a 16 anni. Altre tre coorti di pazienti asmatici (anche in questo caso, bambini e adolescenti) sono state utilizzate per validare i risultati ottenuti. Le terapie anti-asma sono state classificate in base alle linee guida della *British Thoracic Society* (BTS) secondo lo schema seguente: step 0: nessun trattamento nel mese precedente la valutazione; step 1: SABA (Short Acting Beta Agonist) al bisogno; step 2: step 1 più terapia regolare con ICS; step 3: step 2 più LABA (Long Acting Beta Agonist) e step 4: step 3 più trattamento per via orale con anti-leucotrieni.

Per la genotipizzazione sono stati presi in considerazione dieci geni coinvolti nella formazione del complesso GR-recettore, nel trasporto dei GC e nella trasduzione del segnale GC-mediato. Altri sette geni sono stati scelti in considerazione di uno studio eseguito in precedenza che aveva mostrato un loro possibile coinvolgimento nell'influenzare la suscettibilità e la severità dell'asma e la risposta terapeutica. Il DNA genomico è stato isolato da campioni di saliva e lo screening è stato eseguito tramite la piattaforma *Sequenom Mass Array*.

Mettendo in relazione i dati clinici di pazienti asmatici bambini e adolescenti collezionati nel corso di tre studi osservazionali con i risultati di uno screening genetico su geni coinvolti nella formazione e funzione del complesso GC-recettore, gli autori hanno dimostrato che polimorfismi nel gene ST13 potrebbero essere associati alle esacerbazioni dell'asma nonostante un regolare trattamento con ICS. Su un totale di diciassette geni analizzati soltanto due varianti a singolo nucleotide (*Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs*) sono state associate con l'evenienza di riacutizzazione della patologia. In particolare, gli SNPs rs138335- e

rs138337-ST13 erano associati con un aumento del rischio di intensificazione dei sintomi patologici nelle tre coorti analizzate (*PACMAN*, *BREATHE* e *PAGES*).

Dalla metanalisi eseguita su sei coorti indipendenti tra loro (tre di validazione) è emerso che il polimorfismo rs138335 rimaneva associato con un rischio aumentato (OR=1,22; P=0,013) della necessità di visite ospedaliere specialistiche e di ricorso a una terapia corticosteroidica per via orale (OR=1,22; P=0,0017). I due SNPs sono in linkage disequilibrium e si trovano entrambi nelle regioni introniche del gene ST13 che codifica per una *Hip70 interacting protein*, denominata "hip". Hip fa parte del complesso GC-recettore ed è coinvolta nella maturazione funzionale del recettore.

Questo studio ha molte limitazioni. La prima di queste è che i due SNPs-ST13, sebbene associati con l'*outcome* esacerbazione nella metanalisi eseguita sulle 6 coorti analizzate, non rimangono significativi dopo correzione per test multipli secondo il metodo di Bonferroni e, di conseguenza, non è possibile escludere che i risultati non siano falsi positivi. Altra limitazione è rappresentata dal fatto che, nonostante siano stati analizzati 2876 bambini e adolescenti con asma, l'analisi *post-hoc* ha messo in luce un potere statistico insufficiente dello studio. Per questo motivo gli stessi autori suggeriscono che siano necessarie altre ricerche su larga scala basate su collaborazioni internazionali. Infine, bisogna considerare che le popolazioni analizzate erano eterogenee per età e severità dei sintomi patologici.

Due SNP nel gene ST13 (rs138335 e rs138337) sembrano essere associati con un rischio aumentato di riacutizzazione dell'asma nei bambini e adolescenti nonostante il regolare trattamento con corticosteroidi per via inalatoria, contribuendo a determinare la variabilità nella risposta a tale terapia.

Conflitto d'interessi: lo studio è stato sponsorizzato dalla GlaxoSmithKline (GSK) e da diversi istituti. Gli autori hanno dichiarato di aver svolto incarichi di consulenza per varie case farmaceutiche e di aver ricevuto dei *grants* da esse per svolgere le loro ricerche.

Parole chiave: asma, glucocorticoide, complesso GC-recettore, ST13, SNP

Riferimento bibliografico

[Vijverberget al. Clin Exp Allergy 2015, 45\(6\):1051-9](#)

LA DELEZIONE DEL GENE BIM COME BIOMARCATORE PROGNOSTICO DI RISPOSTA ALLA TERAPIA CON INIBITORI DELLA TIROSIN CHINASI EGFR IN PAZIENTI CON CANCRO DEL POLMONE NON A PICCOLE CELLULE: REVISIONE SISTEMATICA E META-ANALISI

A cura del Dott. Vittorio Simeon

Gli inibitori delle tirosin chinasi (TKIs) del recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) sono la prima scelta terapeutica nel trattamento dei pazienti con cancro del polmone non a piccole cellule (NSCLC) portatori del gene EGFR mutato. Tuttavia, circa il 20-30% di questi pazienti mostra resistenza già alla prima linea di trattamento. L'identificazione di questa popolazione resistente prima dell'inizio della terapia sarebbe di estremo interesse.

Il gene BIM (BCL2-like 11) è un membro pro-apoptotico della famiglia proteica Bcl-2. L'up-regolazione di questo gene è stata correlata all'apoptosi indotta da gefitinib in cellule del cancro del polmone mutate per EGFR. In più, alti livelli di espressione di BIM sono stati associati ad una sopravvivenza libera da progressione (PFS) superiore nei pazienti NSCLC EGFR-mutati e trattati con erlotinib. BIM potrebbe quindi essere considerato un biomarcatore di sopravvivenza in pazienti NSCLC mutati per EGFR. Dopo l'identificazione della delezione intronica del gene BIM nel 2012 da parte del gruppo di [Ng KP](#) e colleghi, sono stati condotti numerosi studi al fine di analizzare l'associazione di questa delezione con la risposta e le sopravvivenza dei pazienti con NSCLC mutati per EGFR ed in terapia con TKIs. La delezione del gene BIM è completamente assente nelle popolazioni africane ed europee, mentre è stata identificata in circa il 12% della popolazione asiatica. La meta-analisi condotta da Nie W e colleghi e pubblicato su *Oncotarget* ha come

scopo, riassumendo le precedenti evidenze, quello di determinare il ruolo predittivo della delezione di BIM nei pazienti con NSCLC in terapia con EGFR-TKIs.

PubMed, Embase e il registro Cochrane sono stati utilizzati per eseguire la ricerca degli studi rilevanti pubblicati fino ad Aprile 2015. Sono stati utilizzati i seguenti termini: ("NSCLC" o "cancro del polmone") e ("BCL2-like protein 11" o "BCL2-like 11" o BIM o BCL2L11). I criteri di inclusione per la meta-analisi prevedevano: 1) studi di coorte; 2) pazienti con NSCLC con mutazioni di EGFR attivanti; 3) terapia EGFR-TKIs; 4) valutazione del ruolo della delezione di BIM sulla PFS come *outcome* primario. È stato calcolato l'hazard ratio (HR) con il 95% di intervallo di confidenza (95% CI) relativo all'*outcome* primario. Per l'analisi è stato utilizzando un modello ad effetti misti. L'eterogeneità statistica tra gli studi è stata valutata utilizzando le statistiche Q e I².

Di novantacinque pubblicazioni selezionate dai motori di ricerca, soltanto cinque studi, in seguito ad ulteriore valutazione del testo e dei criteri di inclusione, sono stati inseriti nella meta-analisi finale. Questi cinque studi sono stati condotti interamente su popolazione asiatica (n=951). Quattro studi includevano pazienti con stadio avanzato della patologia ed uno solo considerava pazienti sia allo stato precoce sia avanzato. In quattro di questi studi è stata dimostrata l'associazione della delezione di BIM con una ridotta PFS. Tre di questi studi riportavano anche il valore di HR con 95% CI. Rispetto ai pazienti *wild type* per il gene BIM, i portatori della delezione mostravano una ridotta PFS nei pazienti con NSCLC trattati con EGFR-TKIs (*adjusted* HR = 2.38, 95% CI 1.66 – 3.41, P<0.001). Non è stata osservata alcuna eterogeneità significativa tra gli studi (I² = 11%). Per quanto riguarda la sopravvivenza generale (OS), due studi presentavano l'OS mediana sia del gruppo di pazienti *wild-type* che di quelli con la delezione. Di questi, solo uno studio indicava una ridotta OS per i pazienti portatori della delezione, mentre il secondo studio in analisi non era in grado di confermare questo risultato. Entrambi gli studi non presentavano i risultati statistici di questo confronto non permettendo di conseguenza la meta-analisi della OS. La delezione del gene BIM è caratterizzata da una delezione di 2903 basi all'interno dell'introne 2. Questa delezione comporta uno *splicing* preferenziale dell'esone 3 sull'esone 4, generando un'isoforma di BIM mancante del dominio BH3 e causando di conseguenza la resistenza ai TKIs. È stato dimostrato che la somministrazione di molecole BH3-mimetiche è in grado di ripristinare la sensibilità ai TKIs. Si ipotizza quindi che la combinazione di EGFR-TKIs con molecole BH3 mimetiche potrebbe essere considerata per il trattamento dei pazienti con NSCLC portatori della delezione di BIM.

Questa è la prima meta-analisi ad aver approfondito l'associazione della delezione di BIM con l'efficacia degli EGFR-TKIs. Non è stata evidenziata alcuna eterogeneità e la qualità degli studi inclusi era molto alta. Ciononostante, questo studio presenta alcune limitazioni. Primo, in questa meta-analisi sono presenti soltanto cinque studi. Sebbene tutti gli studi riportino la PFS, soltanto due studi hanno analizzato anche la OS. Di conseguenza è ancora poco chiaro il ruolo di questa delezione come marker prognostico di OS. Secondo, tutti gli studi inclusi avevano un disegno retrospettivo, che può facilmente presentare dei bias (di richiamo o di selezione). Di conseguenza, dovrebbero essere condotti studi prospettici per validare i risultati di questa meta-analisi. Terzo, non è stato possibile eseguire analisi di sottogruppo per età, sesso, abitudine al fumo, e mutazioni di EGFR a causa di dati insufficienti.

In conclusione, la delezione di BIM è stata associata in maniera statisticamente significativa alla mancanza di risposta in pazienti con NSCLC in terapia con EGFR-TKIs. Questa delezione potrebbe quindi essere considerata un buon biomarcatore prognostico di resistenza agli EGFR-TKIs in pazienti con NSCLC ed EGFR mutato.

Rispetto ai pazienti *wild type* per il gene BIM, i portatori della delezione mostravano una ridotta PFS nei pazienti con NSCLC trattati EGFR-TKIs (HR = 2.38, 95% CI 1.66 – 3.41, P<0.001). La delezione di BIM è quindi associata ad una cattiva prognosi e potrebbe essere considerata un buon biomarcatore prognostico di resistenza agli EGFR-TKIs in pazienti con NSCLC ed EGFR mutato.

Parole chiave: BIM, EGFR, TKIs, NSCLC

Riferimento bibliografico

Nie W et al. *Oncotarget* 2015 Jul 27 [Epub ahead of print].



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; 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

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 Cargin (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 Sara De Iudicibus (Università di Trieste) Dott.ssa Lucia Gozzo (Università di Catania) Dott.ssa Marianna Lucafò (Università di Trieste) Dott.ssa Claudia Pisanu (Università di Cagliari) Dott.ssa Gloria Ravegnini (Università di Bologna) Dott. Vittorio Simeon (IRCCS – CROB)

Archivio SIF-Farmacogenetica Edicola Virtuale SIF

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

Contatti: webmaster@sifweb.org

DISCLAIMER – Leggere attentamente

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

RICEZIONE NEWSLETTER

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