



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E
DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale

BIOLOGIA MOLECOLARE EAPPLICATA

**IL RUOLO DELLA FARMACOGENOMICA NEL
METABOLISMO DELLE SOSTANZE D'ABUSO: ANALISI DEI
POLIMORFISMI DEL
CITOCROMO P450 IN CASI DI MORTE PER OVERDOSE DA
OPPIOIDI**

**THE ROLE OF PHARMACOGENOMICS IN DRUGS OF ABUSE
METABOLISM: ANALYSIS OF CYTOCHROME P450
POLYMORPHISMS IN OPIOIDS OVERDOSES DEATH CASES**

Tesi di Laurea Magistrale

di:

SARA PETTI

Relatore

Chiar.ma Prof.ssa

CHIARA TURCHI

Sessione Luglio 2021

Anno Accademico 2020/2021

INDICE:

CAPITOLO PRIMO: INTRODUZIONE

1.1. Cenni storici

1.2. Farmacogenomica: farmacocinetica e farmacodinamica

1.3. Ragioni delle variazioni farmacocinetiche:

1.3.1. Trasporto

1.3.2. Metabolismo

1.4. La superfamiglia del citocromo P450

1.4.1. Nomenclatura

1.4.2. Famiglia CYP1

1.4.3. Famiglia CYP2

1.4.3.1. Sottofamiglia CYP2B

1.4.3.2. Sottofamiglia CYP2C

1.4.3.3. Sottofamiglia CYP2D

1.4.4. Famiglia CYP3

1.4.5. Variazioni biogeografiche

1.5. Applicazioni nel contesto medico-legale post-mortem

1.6. Nuovi oppioidi sintetici

1.6.1. Fentanyl

1.6.2. Tramadol

1.6.3. Codeina

1.6.4. Metadone

CAPITOLO SECONDO: SCOPO DELLA TESI

CAPITOLO TERZO: TECNICHE DI ANALISI

3.1. Estrazione del DNA QIAamp® DNA Mini kit

3.2. Estrazione del DNA con DNA IQ™ Casework Pro Kit

3.3. Quantizzazione dell'estratto con Qubit© 2.0 Fluorometer

3.4. Next Generation Sequencing

3.5. Quantizzazione delle librerie con *Agilent 2200 TapeStation nucleic acids system*

CAPITOLO QUARTO: MATERIALI E METODI

4.1. Campioni

4.2. protocollo di estrazione con *QIAamp® DNA Mini kit*

4.3. Protocollo di estrazione con *DNA IQ™ Casework Pro kit*

4.4. Procedura di quantizzazione con *Qubit© 2.0 Fluorometer*

4.5. Preparazione delle librerie

4.5.1. Amplificazione delle regioni di interesse

4.5.2. Digestione parziale degli ampliconi

4.5.3. Ligazione dei barcode

4.5.4. Purificazione delle librerie

4.5.5. Ulteriore amplificazione con Platinum™ PCR SuperMix HiFi

4.5.6. Ulteriore purificazione

4.5.7. Quantizzazione delle librerie con *Agilent 2200 TapeStation nucleic acids system*

CAPITOLO QUINTO: RISULTATI

CAPITOLO SESTO: DISCUSSIONE

BIBLIOGRAFIA

Capitolo primo

INTRODUZIONE

1.1. Cenni storici

La variazione interindividuale nella risposta a uno xenobiotico fu probabilmente descritta per la prima volta da Pitagora nel 510 a.C. quando notò che alcuni individui sviluppavano un'anemia emolitica dopo l'ingestione di fave.

All'inizio del secolo scorso, Garrod e Oxon suggerirono che una componente genetica era coinvolta nei processi biochimici, dove la causa delle differenze interindividuali nelle reazioni avverse ai farmaci (ADRs) era dovuta a carenze enzimatiche [1].

Trent'anni dopo, Snyder descrisse il primo studio di popolazione, per identificare le differenze etniche in un tratto farmacogenetico. Dimostrò che il fenotipo "non-taster" per la capacità di gustare il feniltiocarbamato è ereditario [2].

Nel 1953, Bonickee e Reif [3] descrissero per la prima volta le differenze interindividuali nell'eliminazione dell'isoniazide (farmaco per la tubercolosi), e nel 1960, Price Evans presentò la prova che i fenotipi "lento" e "rapido" per l'acetilazione dell'isoniazide erano sotto controllo genetico [4].

Le idee di Garrod e Oxon suggeriscono una relazione tra un difetto genetico e una risposta anomala ai composti xenobiotici. Questo concetto è stato raffinato da Motulsky nel 1957 [5], quando suggerì appunto che la variazione genetica causa differenze interindividuali sia per quanto riguarda l'efficacia di un trattamento farmacologico, sia per le reazioni avverse (ADRs).

In questo stesso periodo venne dunque introdotto il termine "farmacogenetica", coniato da Vogel nel 1959 [6]

Nei 4 decenni successivi cominciarono ad essere identificati i meccanismi molecolari responsabili delle differenze interindividuali.

Negli anni '70, sono state fatte delle osservazioni indipendenti di ADR inaspettate al farmaco antidepressivo debrisoquina e al farmaco antiaritmico sparteina. [7,8]. È stato dimostrato che entrambi sono metabolizzati da una mono-ossigenasi del citocromo P450 (CYP). Circa 10 anni più tardi è stato clonato e caratterizzato il primo gene polimorfico che influenza la risposta ai farmaci, il gene CYP2D6.

Altri importanti polimorfismi P450 sono stati scoperti all'interno della sottofamiglia CYP2C a metà degli anni '90.

Facilitata dai recenti progressi nella tecnologia di genotipizzazione, la ricerca è stata estesa per studiare la variazione genetica non solo degli enzimi che

metabolizzano i farmaci ma anche dei trasportatori e dei recettori. Queste maggiori capacità analitiche hanno portato all'introduzione di un nuovo termine, "farmacogenomica" per definire il più completo approccio whole-genome per identificare i determinanti genetici della risposta ai farmaci [9].

1.2. Farmacogenomica: Farmacocinetica e Farmacodinamica

La farmacogenomica è la scienza che studia come i fattori genetici influenzino la variabilità interindividuale della risposta ai composti farmacologici. Costituisce una pietra miliare della medicina personalizzata che fornisce una guida terapeutica basata sul profilo genomico di un certo paziente. La farmacogenomica ha già applicazioni nella clinica, in particolare in oncologia, ma un ulteriore sviluppo futuro di questo settore è necessario per individuare biomarcatori farmacogenomici come utili strumenti sia nel contesto clinico che in quello forense.

Quando un farmaco viene somministrato a dosi standard, c'è sempre una percentuale sostanziale di pazienti che non risponde, risponde solo parzialmente, o sperimenta reazioni avverse (ADRs). Questo vale per tutte le principali classi di farmaci (per esempio, oppioidi, antidepressivi triciclici, inibitori della ricaptazione della serotonina, inibitori ACE, agonisti del b-

adrenoricettore, statine, ecc.) Per due individui dello stesso peso corporeo a cui viene somministrata la stessa dose, le concentrazioni plasmatiche della data sostanza possono variare sostanzialmente. Lo stesso vale anche nel caso in cui una certa sostanza venga assunta come stupefacente.

Secondo l'OMS, l'ADR è definita come una risposta non voluta ad un farmaco, che si verifica a una dose convenzionale normalmente utilizzata per una malattia nella profilassi, nella diagnosi, nella terapia o per la modificazione delle funzioni fisiologiche. Gran parte di queste ADR sono dovute all'attivazione metabolica del farmaco che porta a prodotti reattivi oppure alla tossicità immunomediata. Generalmente queste reazioni avverse provocano tossicità epatica o viene colpita la funzione cardiaca.

Un evento avverso ai farmaci (ADE), d'altra parte, è definito come ADR e/o eventi causati da errori di medicazione. Nel contesto clinico, ADR e ADE sono difficili da identificare e segnalare. Tuttavia, queste risposte sono di grande interesse medico-legale e con potenziali conseguenze legali. [10]

La variazione della risposta a composti esogeni può avere una causa fisiologica, fisiopatologica, ambientale o genetica (Figura 1). In generale, i potenziali fattori di rischio per le ADR comprendono l'età del paziente, il sesso, le comorbilità, la co-medicazione, le disfunzioni d'organo (specialmente di fegato e reni), la dieta, così come alcune variabili dello stile

di vita, tra cui il fumo e l'assunzione di alcol. Tuttavia, l'assorbimento, la distribuzione, il metabolismo, l'eliminazione e l'interazione di un farmaco con il suo target sono spesso determinati da polimorfismi genetici. In generale, si stima che i fattori genetici rappresentino il 15-30% delle cause per le differenze interindividuali nel metabolismo e nella risposta ai farmaci, ma per alcuni farmaci questa percentuale può arrivare al 95% [11].

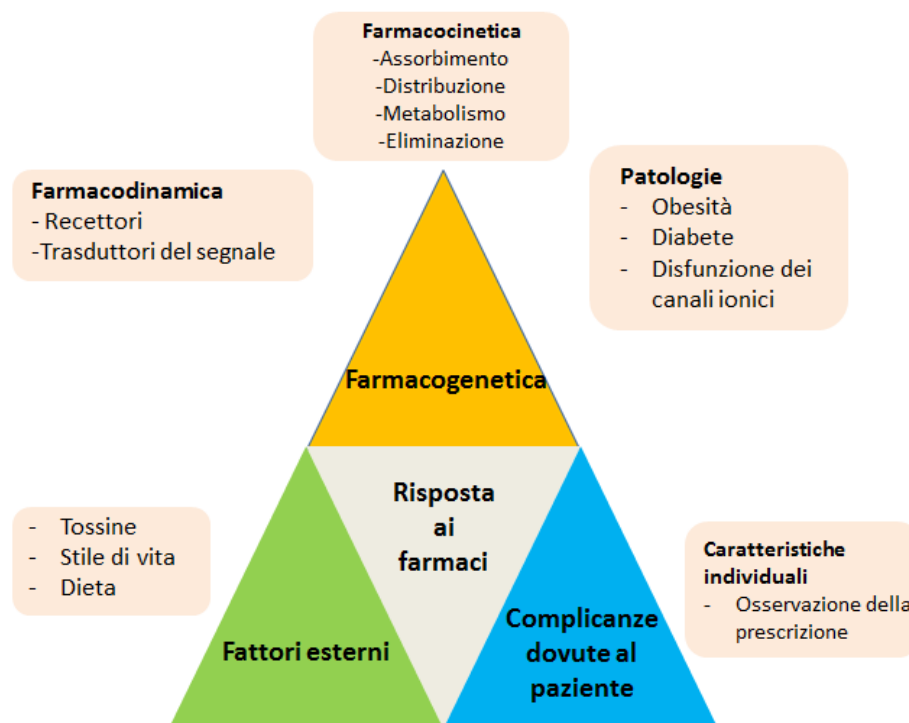


Figura 1 I differenti fattori che influiscono sulla diversità interindividuale per la risposta ai farmaci: oltre al contributo farmacogenetico, hanno un ruolo anche i fattori ambientali con cui gli individui vengono a contatto e il loro comportamento. Ad esempio la risposta ai farmaci varia a seconda che il paziente segua la prescrizione medica o meno, in termini di dose e tempistica.

Risulta dunque utile identificare i biomarcatori farmacogenomici. Secondo il gruppo di lavoro del National Institutes of Health, un biomarcatore è una

caratteristica che viene misurata oggettivamente come indicatore di processi biologici normali, di processi patogeni o di una risposta farmacologica a un intervento terapeutico [12].

In passato venivano considerati parametri fisiologici come temperatura corporea, pressione sanguigna, colore delle urine, frequenza del battito cardiaco o parametri di chimica clinica tra cui creatinina sierica, glucosio urinario o enzimi nel sangue e nelle urine. Oggi il termine biomarcatore si riferisce sempre di più a marcatori molecolari e cellulari.

La maggior parte dei biomarcatori farmacogenetici (farmacogeni) di importanza clinica risiede nei geni coinvolti nella farmacocinetica e farmacodinamica dei farmaci e nei loci legati alla risposta immunitaria di cui in particolar modo geni che codificano il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC). [13,14].

Con il termine farmacocinetica si intende l'applicazione della cinetica al farmaco. Nello specifico si intende lo studio della cinetica di assorbimento, distribuzione, metabolismo ed eliminazione (ADME) di sostanze esogene e alcuni composti endogeni [15]. Ovvero gli effetti che i processi dell'organismo hanno sul farmaco. Lo scopo della farmacocinetica è quello di studiare l'andamento temporale delle concentrazioni e delle quantità di farmaci e metaboliti nei diversi tessuti e sostanze di scarto e di costruire

modelli per interpretare tali dati. Le varianti nei geni ADME e nei target dei farmaci possono causare sia una ridotta efficacia che una tossicità, a seconda del tipo di variazione genetica. Al contrario, le varianti nei geni MHC sono esclusivamente associate a eventi di tossicità mediati dal sistema immunitario [13].

Con il termine farmacodinamica, invece, si intende lo studio degli effetti biochimici e fisiologici dei farmaci sull'organismo, ed il loro meccanismo d'azione. Le varianti di interesse in questo campo sono quelle a carico di geni che codificano per i recettori dei farmaci e per i fattori coinvolti nelle vie di segnalazione, come neurotrasmettitori e molecole di trasduzione del segnale. Ad esempio, sono di particolare interesse i recettori μ -oppioidi e K-oppioidi, codificati rispettivamente dai geni OPRM1, OPRK1. Un ulteriore gene oggetto di studi di farmacodinamica è COMT che codifica per la catecol-O-metil-transferasi, coinvolta nelle vie di segnalazione degli oppioidi. I farmacogeni di interesse presentano un elevato grado di polimorfismo. Con polimorfismo si intende una variazione genetica presente in una popolazione con una frequenza maggiore dell'1%, che quindi non è patogena e si contrappone a quelle che vengono definite mutazioni rare. Le varianti polimorfiche comprendono variazioni nel numero di copie geniche e variazioni di sequenza, nelle regioni codificanti o regolatrici, come

sostituzione di uno o pochi nucleotidi e piccole inserzioni o delezioni. Le varianti polimorfiche a carico di geni associati alla farmacodinamica, così come quelli associati alla farmacocinetica, influenzano gli effetti voluti dai farmaci ma anche gli effetti collaterali, contribuendo alla variabilità interindividuale della risposta. La presente trattazione è incentrata sullo studio dei geni coinvolti nella farmacocinetica e in particolar modo verranno analizzati i geni del sistema citocromo P450 (CYPs).

1.3. Ragioni delle variazioni farmacocinetiche:

1.3.1. Trasporto

I trasportatori e le proteine ad essi associati giocano un ruolo importante nell'assorbimento, nella distribuzione e nell'eliminazione dei farmaci nell'organismo e dunque anche nell'eventuale tossicità. Possono verificarsi interazioni significative tra i trasportatori e i farmaci che possono essere inibitorie, induttive o entrambe e possono coinvolgere trasportatori di influsso ed efflusso. Tali interazioni risultano interessanti se l'eliminazione della sostanza di interesse o la distribuzione in un tessuto bersaglio, sono mediate in modo principale dal dato trasportatore di interesse oppure se l'interazione determina la concentrazione del farmaco in questione, nel sito d'azione [11].

Alcuni esempi sono la pompa di efflusso P-gp (glicoproteina-P), appartenente ai trasportatori della famiglia ATP-binding cassette (ABC), codificata dal gene ABCB1. Essa è presente in diversi tessuti che sono importanti per l'assorbimento, la distribuzione e l'eliminazione dei farmaci. La superfamiglia ABC dei trasportatori di efflusso umani è composta da quasi 50 membri conosciuti, divisi in 7 sottofamiglie. Il più caratterizzato è proprio ABCB1 (o MDR1) che funziona a livello delle cellule endoteliali capillari della barriera emato-encefalica e della barriera del liquido ematocefalo-spinale (la famiglia ABCC è meno studiata). Morfina, metadone, loperamide e fentanil sono stati tutti confermati come substrati della P-gp [16]. Il gene è altamente polimorfico, con oltre 100 SNPs identificati. Il più studiato tra i comuni polimorfismi genetici di ABCB1 è lo SNP non sinonimo dell'esone 26, C3435T, che si osserva con una frequenza del 50-60% nei caucasici, del 40-50% negli asiatici e del 10-30% negli afro-ricani [17]. Ci sono numerosi SNPs osservati nel gene ABCB1, con un significativo linkage disequilibrium, pertanto, la considerazione dell'effetto degli aplotipi, al posto dei singoli SNP, ha maggiori probabilità di prevedere accuratamente l'espressione e la funzione di P-gp [18].

Un altro gruppo importante è quello dei trasportatori di anioni organici (OATPs o OATs). Sono codificati dalla famiglia di geni dei trasportatori di

soluti (SLC). Questi trasportatori indipendenti dal Na⁺ si basano in parte sul co-trasporto e sono responsabili del trasporto di una vasta gamma di composti endogeni e di farmaci. Questa famiglia genica consiste di 9 isoforme umane, di cui SLCO1A2 (solute carrier organic anion transporter 1A2), SLCO1B1 e SLCO1B3 (solute carrier organic anion transporter 1B1 e 1B3) sono i più studiati e implicati nel trasporto degli oppioidi [19].

1.3.2. Metabolismo

Gli enzimi che metabolizzano i farmaci fanno parte del sistema di metabolismo xenobiotico che si verifica praticamente in tutti gli eucarioti e in molti procarioti. Questo sistema protegge l'organismo dai potenziali effetti nocivi dei composti estranei presenti, come quelli introdotti attraverso la nutrizione. Questo metabolismo dei farmaci può essere diviso in reazioni di fase I (per esempio ossidazione, riduzione, idrolisi, alchilazione e dealchilazione) e di fase II (coniugazione). Nelle reazioni di fase I gruppi funzionali dei composti esogeni vengono modificati tramite diverse tipologie di reazioni come ossidazioni e riduzioni. In gran parte si rendono responsabili di questa fase gli enzimi della famiglia P450 (CYP). Gli enzimi di fase II catalizzano reazioni di coniugazione a carico dei prodotti del metabolismo di fase I [9].

1.4. *Sistema del Citocromo P450 (CYP)*

Il sistema del citocromo P450 comprende una famiglia di mono ossigenasi che catalizzano molte reazioni coinvolte nel metabolismo delle sostanze esogene, sintesi del colesterolo, steroidi e altri lipidi. Sono localizzate nel reticolo endoplasmatico ed è noto che metabolizzano la maggior parte dei farmaci comunemente prescritti. I loro substrati includono antidepressivi, antipsicotici, analgesici, agenti di inibizione dei beta adrenergici, antiaritmici e antiemetici [20].

Il sistema del citocromo P450 epatico è responsabile della prima fase del metabolismo e dell'eliminazione di numerose molecole endogene ed esogene e delle sostanze chimiche ingerite. Molte sostanze chimiche ambientali sono lipofile e devono essere metabolizzate per diventare solubili in acqua prima di poter essere eliminate tramite i reni. Gli enzimi P450 convertono queste sostanze in intermedi elettrofili, che vengono poi coniugati da enzimi di fase II (per esempio, UDP glucuronosiltransferasi, N acetiltransferasi) per formare derivati idrofili che possono essere eliminati [11].

Nel genoma umano sono presenti 115 geni CYP di cui 57 attivi, divisi in 18 famiglie e 44 sottofamiglie [21].

Le prime tre famiglie (CYP 1-3) sono generalmente coinvolte nel metabolismo di sostanze esogene come i farmaci, mentre le altre famiglie sono generalmente coinvolte nella biosintesi e nel metabolismo di sostanze endogene. Gli enzimi CYP sono responsabili del 75-80% di tutto il metabolismo di fase I e del 65-70 % della clearance dei farmaci usati più comunemente. [22].

I geni del citocromo P450 sono altamente polimorfici e le variazioni genetiche che li interessano hanno un ruolo molto importante nell'influenzare la risposta ai composti xenobiotici. In particolare è stato osservato un alto grado di polimorfismo tra le famiglie 1-3, in contrasto con il basso grado delle restanti famiglie. Queste variazioni includono polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs), variazioni del numero di copie (CNV), inserzioni e delezioni (indel), che influenzano l'espressione genica e l'attività enzimatica [23].

Tali polimorfismi possono portare ad una perdita di funzione, ovvero un'alterazione del livello di espressione, del meccanismo di trascrizione e traduzione genica o dello splicing con conseguente diminuzione della quantità di prodotto proteico, o una struttura proteica alterata e dunque una proteina non funzionante. Si può anche verificare un'acquisizione di funzione, cioè un aumento del prodotto proteico o della sua attività, determinato dalla presenza

di copie in eccesso del gene o variazioni a livello del promotore. [21]. Ciascun gene CYP presenta lungo la sua intera sequenza più regioni polimorfiche e l'insieme di tutte le varianti, definisce l'aplotipo. Ogni individuo ha due aplotipi CYP, uno per ogni cromosoma, che costituiscono il suo diplotipo. A seconda dei diplotipi, gli individui possono essere associati ad una certa classe funzionale fenotipica di metabolismo (Figura 2) [24]:

- Metabolizzatori ultra-rapidi (UM), hanno più di due copie geniche attive che codificano un certo P450. Oppure hanno una mutazione che porta ad un maggior livello di espressione genica. Dunque l'attività enzimatica è superiore alla norma.
- Metabolizzatori estensivi (EM), hanno due geni pienamente funzionanti, o almeno uno dei due. È la classe fenotipica considerata normale.
- Metabolizzatori intermedi (IM), eterozigoti per un allele difettoso con funzionalità ridotta oppure presentano una combinazione di una variante a funzione ridotta e una nulla. Dunque l'attività enzimatica è ridotta ma non assente.
- Metabolizzatori poveri (PM) sono privi di enzimi funzionali a causa di due copie geniche difettose o assenti. L'attività enzimatica manca del tutto.

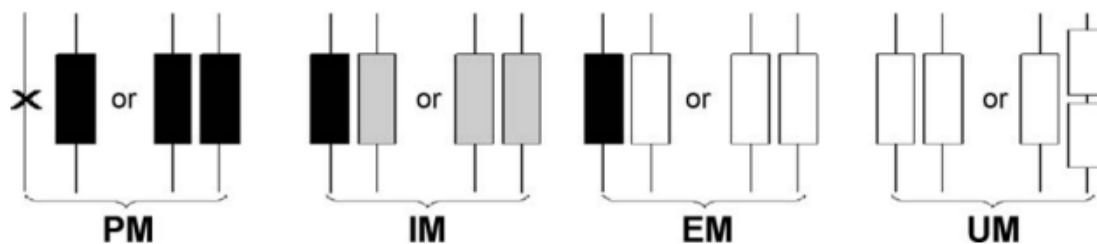


Figura 2: Rappresentazione schematica dei genotipi e i loro relativi fenotipi metabolici previsti.
X: delezione dell'intero gene; **casella nera:** variante nulla; **casella grigia:** variante a funzione ridotta; **casella bianca:** variante funzionale. *Figura tratta da Sajantila A, Palo JU, Ojanperä I, Davis C, Budowle B. Pharmacogenetics in medico-legal context. Forensic Sci Int. 2010 Dec 15;203(1-3):44-52. doi: 10.1016/j.forsciint.2010.09.011. PMID: 21095511.*

La mancanza o l'attività molto bassa di un certo enzima potrebbero determinare l'accumulo di alcuni composti chimici che causano tossicità d'altra parte, l'attività enzimatica ultrarapida può anche provocare tossicità del farmaco se il metabolita è più attivo o reattivo del composto originario.

Tabella 1: Principali CYP polimorfici coinvolti nel metabolismo dei farmaci e relative varianti

Enzima	Substrati	Frequenza del polimorfismo	Effetto sulla funzionalità enzimatica	Varianti polimorfiche principali
CYP1A2	Farmaci	Alta	Raro	CYP1A2*1F CYP1A2*1K
CYP2B6	Farmaci	Alta	Riduzione del metabolismo	CYP2B6*5, CYP2B6*6 CYP2B6*16
CYP2C8	Alcuni farmaci	Alta	Riduzione del metabolismo	CYP2C8*3
CYP2C9	Farmaci	Relativamente rara nei caucasici	Molto significativa	CYP2C9*2 CYP2C9*3
CYP2C19	Farmaci	Alta	Molto significativa	CYP2C19*2 CYP2C19*3 CYP2C19*17
CYP2D6	Farmaci	Molto alta	Molto significativa	CYP2D6*2 CYP2D6*4 CYP2D6*5 CYP2D6*10 CYP2D6*17
CYP3A4	Farmaci	Bassa	Nessuna o minima	CYP3A4*1B
CYP3A5	Farmaci	Alta	Significativa	CYP3A5*3 CYP3A5*6 CYP3A5*7

1.4.1. Nomenclatura

Data la crescente identificazione e caratterizzazione dei geni CYP umani polimorfici, è stata ideata una specifica nomenclatura, definita “star allele nomenclature” in modo da ottenere un sistema unificato e uniformato. Utilizzata per la prima volta da un gruppo di esperti a metà degli anni ‘90, per il gene CYP2D6, che aveva un numero crescente di varianti alleliche, è stata poi ampliata negli anni 2000 a tutti i geni CYP. Attualmente la piattaforma di riferimento è PharmVar. Il Consorzio Pharmacogene Variation (PharmVar) è un archivio centrale per la variazione farmacogenetica (PGx) che si concentra sulla struttura dell'aplotipo e sulla variazione allelica. Le informazioni contenute in questa risorsa facilitano la ricerca di base e clinica, nonché l'interpretazione dei risultati dei test farmacogenetici [25]. L'idea è di associare un numero, preceduto da un asterisco (*, star) per designare un allele. Il quale è definito da tutte le variazioni di sequenza presenti nella lunghezza del gene, inclusi polimorfismi a singolo nucleotide ed inserzioni/delezioni. Ad esempio, l'allele CYP2D6*10 è caratterizzato da due variazioni polimorfiche: rs1065852 (100C>T) e rs1135840 (4181G>C). Si tratta di un allele a funzionalità ridotta. Quando la variante di sequenza caratterizzata si trova in associazione con altre varianti non causative (per esempio silenti), le diverse combinazioni sono definite come sub-alleli e indicate con una lettera, oltre al numero. Ad esempio CYP2D6*10A è

definito dai due polimorfismi principali descritti sopra, ma anche da rs1058164 (1662G>C). Anche quando diversi polimorfismi causativi sono presenti sullo stesso allele, il numero allelico è determinato dalla variante che causa la conseguenza più grave, come un difetto di splicing.

Per facilitare il processo di traduzione dal genotipo al fenotipo, ogni genotipo può essere convertito in un Activity Score (AS), che viene poi tradotto in fenotipo. In breve, viene assegnato un valore a ciascun allele [26]:

- 0, se non ha funzione
- 0,15-0,5 se ha funzione ridotta
- 1, se ha funzione normale

Sommando il valore di ciascun allele, si ottiene l'AS del diplotipo. Ad esempio CYP2D6*1/*5 è definito dall'allele *1, con funzione normale e quindi un AS pari a 1 e *5 privo di funzione, con AS pari a 0. Dunque l'Activity Score di questo genotipo è 1.

A questo punto, a seconda del valore, si identificherà la classe fenotipica. Ad esempio per CYP2D6 [26,27]:

- metabolizzatore povero per $AS=0$
- metabolizzatore intermedio per $0 \leq AS \leq 1,25$
- metabolizzatore esteso (normale) per $1,25 \leq AS \leq 2,25$

- metabolizzatore ultrarapido per $AS \geq 2,25$

Per ciascun gene CYP, il PharmGKB fornisce delle tabelle di riferimento per calcolare l'AS, che verranno utilizzate in fase di interpretazione dei risultati. PharmGKB è una risorsa completa che raccoglie, cura e diffonde la conoscenza dell'impatto della variazione genetica sulla risposta ai farmaci [28].

1.4.2. Famiglia CYP1

La famiglia CYP1 comprende due sottofamiglie tra cui tre sono i geni funzionali: CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1. CYP1A1 e CYP1B1 sono espressi principalmente a livello extra-epatico, mentre CYP1A2 rappresenta circa il 4-16% di tutti i CYPs epatici ed è responsabile del 8-10% del metabolismo dei farmaci mediato dai CYPs [29.30].

Il gene CYP1A2 della sottofamiglia CYP1A si trova in un cluster con CYP1A1 sul cromosoma 15. I due geni condividono una regione fiancheggiante l'estremità 5' di circa 23kb che contiene elementi regolatori condivisi. Sono posizionati uno dietro l'altro e la trascrizione avviene nelle direzioni opposte. Il gene CYP1A2 si estende per circa 7,8 kb, presenta sette

esoni e sei introni. Nella regione 3'-UTR del trascritto sono presenti quattro elementi Alu, fiancheggiati da una sequenza ripetuta diretta.

La proteina codificata da questo gene è di 515 residui con una massa molecolare di 58.294 Da [31]. CYP1A2 è altamente espresso in modo costitutivo nel fegato ed è inducibile nel polmone, pancreas, tratto gastrointestinale e cervello. Si localizza nel reticolo endoplasmatico e la sua espressione è indotta da alcuni idrocarburi policiclici aromatici (PHAs). Il substrato endogeno dell'enzima è sconosciuto, tuttavia è in grado di metabolizzare alcuni PHA a intermedi cancerogeni. Altri substrati xenobiotici per questo enzima includono caffeina, aflatoossina B1 e paracetamolo. Ma anche antidepressivi, antipsicotici e altri.

Si stima che la componente genetica contribuisca alla variazione dell'attività di CYP1A2 per circa il 75%, il resto è dovuto a fattori ambientali come fumo (induzione) e uso di contraccettivi orali nelle donne (inibizione) [32].

Sono state riportate molte varianti per il CYP1A2, attualmente sulla piattaforma PharmVar sono caratterizzati 21 alleli principali, di cui CYP1A2 comprende a sua volta ventuno suballeli (CYP1A2*1A – A2*1W). Si tratta di variazioni di un singolo o pochi nucleotidi, definiti nel complesso SNVs. Ad oggi non sono stati riportati polimorfismi del numero di copie per

CYP1A2. CYP1A2*1A è considerato l'allele di riferimento a cui vengono confrontate tutte le varianti [33].

È stato dimostrato che il CYP1A2 è importante per il dosaggio di diversi antipsicotici e sia per l'efficacia del farmaco che per le reazioni avverse al farmaco.

1.4.3. Famiglia CYP2

È la famiglia più grande, rappresenta circa il 30% delle isoforme CYP umane. [34]. Il fegato presenta cinque sottofamiglie di CYP2 che metabolizzano i farmaci (A-E) di cui i geni più importanti nell'ambito farmacologico sono proprio quelli che mostrano il più alto grado di polimorfismo.

1.4.3.1. Sottofamiglia CYP2B

Il gene più rappresentativo è CYP2B6. Costituisce circa l'1-10% del pool totale dei CYP epatici e ha un contributo di circa il 7-8% al metabolismo dei farmaci. [35]

È espresso anche nel cervello, quindi può essere un fattore importante nel metabolismo dei farmaci che agiscono sul SNC e per effetti collaterali neurologici dei trattamenti farmacologici.

È altamente inducibile da diversi farmaci e altri xenobiotici. La trascrizione di CYP2B6 è regolata dai recettori nucleari PXR e CAR, codificati

rispettivamente dai geni NR1I2 e NR1I3. Attivano la trascrizione legandosi all'elemento di risposta prossimale (PREM a -1,7 km a monte del sito di inizio della trascrizione) e all'elemento di risposta distale (XREM a -8,5 kb) nel promotore CYP2B6 [36].

Il locus genico oltre a CYP2B6 contiene anche lo pseudogene CYP2B7 (Figura 3). Sono posizionati ad una distanza di 41.6 kb. Entrambi sono composti da nove esoni e condividono un'elevata similarità di sequenza. L'allineamento delle due sequenze geniche mette in evidenza le poche differenze: nove nucleotidi nell'esone 1, nove nucleotidi nell'esone 2, sei per l'esone 3, tredici differenze nell'esone 4, due nell'esone 5, quattro nel 6, dieci nel 7, tre nell'8 e cinque nell'esone 9.

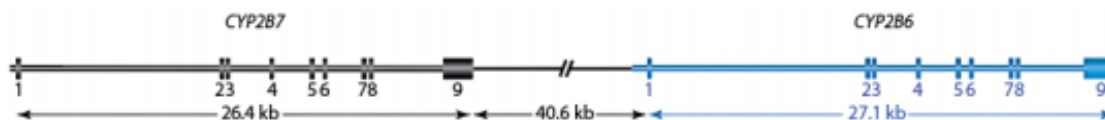


Figura 3: Locus genico di CYP2B6. Entrambi i geni sono codificati sul filamento positivo. *Figura tratta dal documento "Structural Variation" di PharmVar:*
https://a.storyblok.com/f/70677/x/090e5f7e50/cyp2b6_variation_v1-2.pdf

CYP2B6 Comprende 38 alleli star, ciascuno con almeno un suballele. Essi includono varianti caratterizzate da polimorfismi a singolo nucleotide o piccole inserzioni e delezioni (indel), indicati nell'insieme con SNVs (figura 4), ma anche variazioni del numero di copia (CNVs) determinate da delezioni

e duplicazioni. In realtà non è noto se questi eventi interessano l'intero locus genico o solo parte di esso.

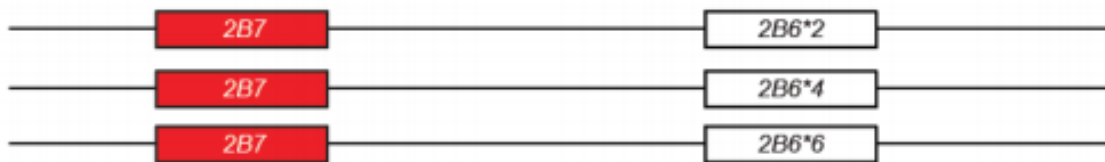


Figura 4: Alcuni esempi di varianti alleliche di CYP2B6. CYP2B6*2 è un allele funzionale; 2B6*4 ha un funzione incrementata; 2B6*6 ha una funzionalità ridotta. Figura tratta dal documento "Structural Variation" di PharmVar:

https://a.storyblok.com/f/70677/x/090e5f7e50/cyp2b6_variation_v1-2.pdf

Inoltre sono note delle varianti caratterizzate da un ibrido dei due geni, definite come CYP2B7-2B6 oppure CYP2B6-2B7.

Nel primo caso la porzione 5' è derivata dal CYP2B7 e la porzione 3' è da CYP2B6 (Figura 5). Si ritiene che questo ibrido sia il prodotto di un evento di grande delezione tra CYP2B6 e CYP2B7, facilitato da elementi Alu ripetitivi nell'introne 4. CYP2B6*29 è descritto nel database PharmVar come gene ibrido CYP2B7-2B e in effetti condivide un'identità di sequenza completa con gli esoni da 1 a 4 di CYP2B7 e con gli esoni da 5 a 9 di CYP2B6. È annotato come un allele a funzionalità ridotta.

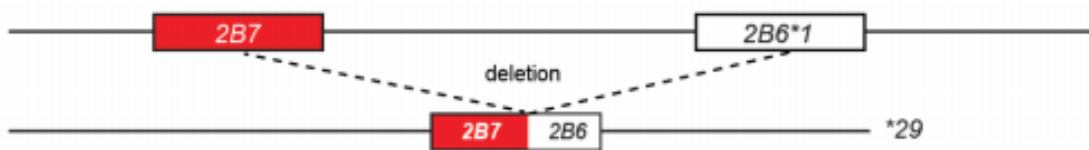


Figura 5. Gene ibrido CYP2B7-2B6. Figura tratta dal documento “Structural Variation” di PharmVar: https://a.storyblok.com/f/70677/x/090e5f7e50/cyp2b6_variation_v1-2.pdf

Per quanto riguarda le varianti CYP2B6-2B7, ovviamente la prima porzione deriva dal CYP2B6 e la porzione terminale da CYP2B7. Si pensa che siano state prodotte da un evento di crossing-over ineguale e un evento di duplicazione, facilitati ancora una volta dagli elementi Alu. L’allele CYP2B6*30 presenta questo ibrido come una copia aggiuntiva tra CYP2B6 e CYP2B7 (Figura 6).

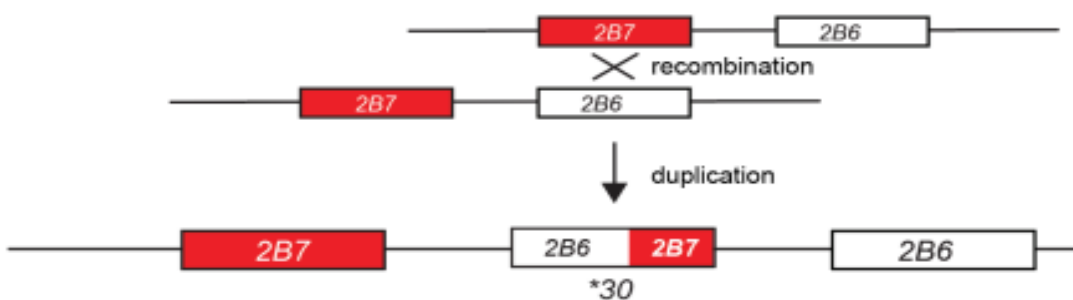


Figura 6: Allele CYP2B6*30 definito da una copia aggiuntiva del gene ibrido 2B6-2B7. Figura tratta dal documento “Structural Variation” di PharmVar: https://a.storyblok.com/f/70677/x/090e5f7e50/cyp2b6_variation_v1-2.pdf

Il prodotto proteico si localizza nel reticolo endoplasmatico e la sua espressione è indotta dal fenobarbital. L’enzima è noto per metabolizzare

alcuni xenobiotici, come i farmaci antitumorali ciclofosfamide e ifosfamide ma anche ketamina, metadone, fentanyl e altri [37].

1.4.3.2. Sottofamiglia CYP2C

Questa sottofamiglia include quattro geni funzionali: CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19. Il CYP2C9 è l'isoforma più espressa nel fegato, CYP2C8 e CYP2C19 sono espressi con un livello 2 e 10 volte inferiore, rispettivamente. CYP2C18, invece, è espresso principalmente nella pelle. [38]

Il locus genico di riferimento della sottofamiglia CYP2C contiene tutti e quattro i geni (Figura 7) per un totale di 486 Kb. Tale locus mappa sul cromosoma 10q24. Tutti sono composti da nove esoni e condividono un alto grado di similarità nella sequenza.



Figura 7: locus genico CYP2C. Comprende quattro geni nel seguente ordine: centromero-CYP2C18-CYP2C19-CYP2C9-CYP2C8-telomero. Figura tratta dal documento "Structural Variation" di PharmVar: https://a.storyblok.com/f/70677/x/9225fa2a03/variation_cyp2c19.pdf

Per quanto riguarda CYP2C8 è il gene più piccolo (31 kb, 9 esoni) [39]. Data la stretta vicinanza di con CYP2C9, esiste un linkage disequilibrium tra questi geni [40].

Ad oggi sono stati identificati oltre 450 polimorfismi a singolo nucleotide (SNP). Sono stati descritti 18 alleli, la maggior parte dei quali includono diversi suballeli. CYP2C8*1 (o *1A) si riferisce all'allele wild-type o di riferimento.

CYP2C8 è un enzima metabolizzante di fase I che svolge un ruolo fondamentale nella biotrasformazione di xenobiotici e composti endogeni strutturalmente diversi. Circa il 5% dei farmaci comunemente utilizzati è metabolizzato da questo enzima [41]. Rappresenta il 7% del contenuto di CYP nel fegato ed è espresso in misura minore nel rene, nella ghiandola surrenale, nella ghiandola mammaria, nel cervello, nell'ovaio, nell'utero e nel duodeno [39]. La proteina codificata si localizza nel reticolo endoplasmatico e la sua espressione è indotta dal fenobarbital. Svolge un ruolo nell'ossidazione di una miriade di xenobiotici e composti endogeni come i FANS (es. ibuprofene, diclofenac), statine (es. fluvastatina, simvastatina acida), calcioantagonisti (es. verapamil), antidiabetici, oppioidi (es. morfina, metadone) e altri [39].

CYP2C9 è espresso principalmente nel fegato e il livello di espressione è segnalato come il secondo più alto tra le isoforme del CYP, dopo il CYP3A4. In misura minore è espresso anche nel duodeno e nell'intestino tenue. Il CYP2C9 è indotto dalla rifampicina [42]. È stato dimostrato che il trattamento con rifampicina aumenta costantemente la clearance dei farmaci eliminati dal

CYP2C9. È invece inibito da amiodarone, fluconazolo e sulfafenazolo tra gli altri farmaci [42].

Il gene che codifica per l'enzima CYP2C9 è altamente polimorfico, comprende varianti funzionali di grande importanza farmacogenetica. I cambiamenti nell'attività metabolica dovuti alle varianti genetiche nel CYP2C9 giocano un ruolo importante nelle ADRs. Sono stati caratterizzati 71 alleli principali, che includono molti suballeli.

È stato stimato che sia responsabile della clearance metabolica fino al 15%-20% di tutti i farmaci sottoposti a metabolismo di Fase I [43].

L'enzima è noto per metabolizzare molti xenobiotici, tra cui fenitoina, tolbutamide, ibuprofene e l'anticoagulante S-warfarin. Altri substrati sono anche gli analgesici, antipiretici, antinfiammatori [42].

L'enzima citocromo P450, famiglia 2, sottofamiglia C, polipeptide 19 (CYP2C19) è espresso prevalentemente nel fegato e, in misura minore, nell'intestino tenue. L'espressione costitutiva di CYP2C19 è ampiamente mediata dai fattori nucleari epatici 4 alfa (HNF4alpha, HNF4A) e 3 gamma (HNF3gamma, FOXA3) [45,46], e l'attivazione trascrizionale è mediata dai recettori nucleari sensibili ai farmaci CAR (NR1I3), PXR (NR1I2) e GRalpha (NR3C1) [47], che suggeriscono la regolazione da parte di ormoni endogeni e

farmaci come la rifampicina [44]. Tra le molecole che hanno un effetto inibitorio, invece, vi sono alcuni inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina (SSRI; ad es. fluoxetina, fluvoxamina) [44].

Come altri geni CYP450, la variazione genetica in CYP2C19 e la sua espressione epatica variabile contribuiscono alla variabilità fenotipica interindividuale nel metabolismo dei substrati.

La maggior parte delle varianti alleliche porta uno o più SNVs (figura 8).

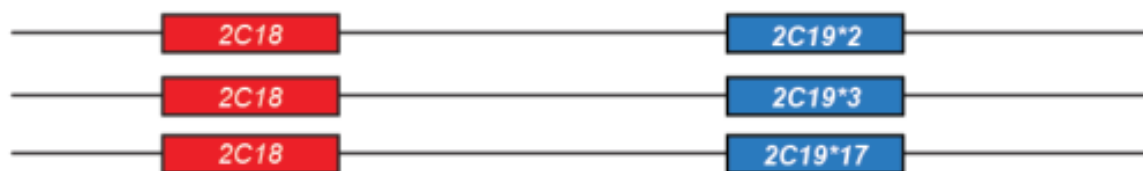


Figura 8: alcuni esempi di varianti alleliche del CYP2C19. Figura tratta dal documento "Structural Variation" di PharmVar: https://a.storyblok.com/f/70677/x/9225fa2a03/variation_cyp2c19.pdf

Riguardo alle varianti del numero di copie (CNV), sono stati descritti numerosi eventi di delezione e duplicazione che interessano il locus CYP2C. Ad esempio l'allele CYP2C19*36 è definito da una grande delezione che comprende anche il gene CYP2C18 ed è una variante nulla. Sono state identificate anche diverse delezioni parziali a carico di CYP2C19, il numero di esoni rimanenti può variare ma una caratteristica in comune è la mancanza dell'esone 1 (Figura 9). Poiché questo esone codifica per gli amminoacidi che guidano la sintesi proteica verso il reticolo endoplasmatico, queste varianti,

designate collettivamente come CYP2C19*37, molto probabilmente producono proteine non funzionali.

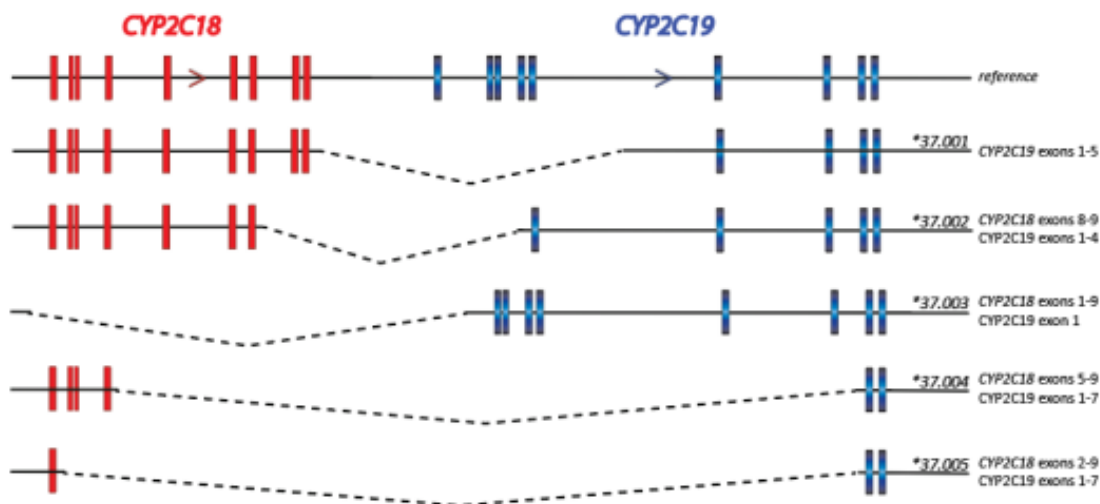


Figura 9 delezioni parziali che coinvolgono l'esone 1 di CYP2C19. Figura tratta dal documento "Structural Variation" di PharmVar: https://a.storyblok.com/f/70677/x/9225fa2a03/variation_cyp2c19.pdf

CYP2C19 contribuisce al metabolismo di un gran numero di farmaci e classi di farmaci clinicamente rilevanti come antidepressivi, benzodiazepine, mefenitoina, inibitori della pompa protonica (PPI) e il profarmaco antiplastrinico clopidogrel.

1.4.3.3. Sottofamiglia CYP2D

Consiste di un solo gene, codificante la proteina CYP2D6 che rappresenta il 2-5% della composizione dei CYP epatici. È sicuramente il gene più studiato e probabilmente uno dei più importanti in questo contesto.

Tra i CYP è l'unico enzima non inducibile, il che si traduce in una forte variabilità interindividuale [48]. Infatti la sua attività può variare in un range molto ampio, dalla completa assenza fino ad un aumento eccessivo, marcando una forte variabilità interindividuale con possibili conseguenze cliniche significative [49,50].

È coinvolto nel metabolismo del 25% circa dei farmaci di uso comune in clinica [48].

CYP2D6 è altamente polimorfico, attualmente sono descritte 145 varianti alleliche principali che comprendono a loro volta suballeli. I principali e più comuni alleli di mutazione sono CYP2D6*3, *4, *5 e *6, che rappresentano il 93 -97% degli alleli tra fenotipi PM [51]. Gli alleli CYP2D6*1 e CYP2D6*2 rappresentano una normale attività funzionale.

Il gene mappa sul cromosoma 22q13, è lungo 4.382 bp e possiede nove esoni. [26]. Il locus genico comprende anche due pseudogeni CYP2D7 e CYP2D8 che condividono un'elevata similarità di sequenza con CYP2D6. In particolare CYP2D6 e CYP2D7 condividono una regione a valle del nono esone di 0,6 kb (box blu in figura 3 e 4) e delle sequenze ripetute, definite REP6 e REP7 (figura 3). CYP2D7 si distingue per l'inserzione di una T nell'esone 1 che rende il gene non funzionale. Anche altre regioni presentano differenze con CYP2D6 e sono l'introne 6, l'esone 9 e un regione a valle tra

l'esone nove e l'elemento ripetuto che contiene una sequenza "spacer" lunga 1,6 bp, presente CYP2D7 e assente in CYP2D6.

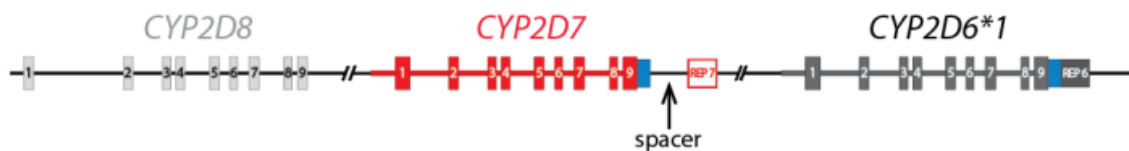


Figura 10: locus genico di riferimento per CYP2D6. Figura tratta dal documento "Structural Variation" di PharmVar: https://a.storyblok.com/f/70677/x/7073c64512/cyp2d6_structural-variation_v2-1.pdf

Attualmente sono stati caratterizzati 145 aplotipi principali, di cui tutti hanno almeno un suballele.

Il locus genico di CYP2D6 è caratterizzato da un insieme di varianti strutturali, che includono varianti a singolo e delezioni/inserzioni (figura 11).

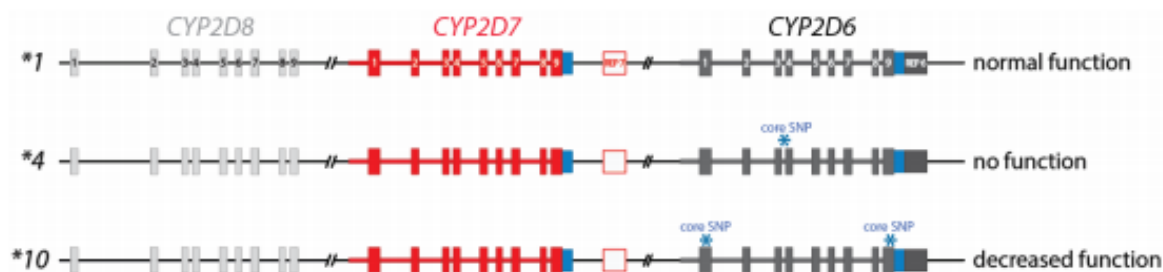


Figura 11 SNVs all' interno del gene CYP2D6. "Structural Variation" di PharmVar: https://a.storyblok.com/f/70677/x/7073c64512/cyp2d6_structural-variation_v2-1.pdf

Una particolare forma di variante allelica è la CYP2D6*2, di cui la maggior parte dei suballeli presentano nell'introne 1 una piccola regione derivante da CYP2D7, questa caratteristica viene indicata come "conversione dell'introne

1” e trattandosi di una piccola porzione non viene considerata come una duplicazione. Essa non provoca un impatto sulla funzionalità. Possono verificarsi anche altri tipi di conversioni, ad esempio per l’allele CYP2D6*82 la porzione di CYP2D7 si ritrova nell’esone 2 e la sua funzionalità è attualmente non nota (figura 12).

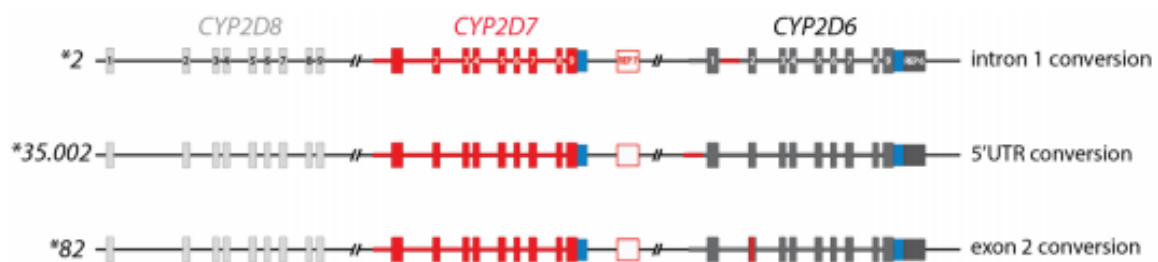


Figura 12: Conversioni di CYP2D6 dovute a piccole inserzioni di porzioni derivanti da CYP2D7.

“Structural Variation” di PharmVar:

https://a.storyblok.com/f/70677/x/7073c64512/cyp2d6_structural-variation_v2-1.pdf

Altre varianti strutturali di CYP2D6 includono duplicazioni, delezioni e riarrangiamenti genici che causano variazioni nel numero di copie (CNV). Esse comprendono delezioni dell’intero gene (CYP2D6*5), duplicazioni e moltiplicazioni dell’intero gene (CYP2D6*1xN, CYP2D6*2xN...). Ad oggi solo CYP2D5*1,*2,*4 e *41 sono stati descritti con un numero di tre o più copie geniche. Un’ulteriore forma di variazioni strutturali per CYP2D6 sono le copie geniche ibride costituite da porzioni di CYP2D6 e CYP2D7 (figura 13)

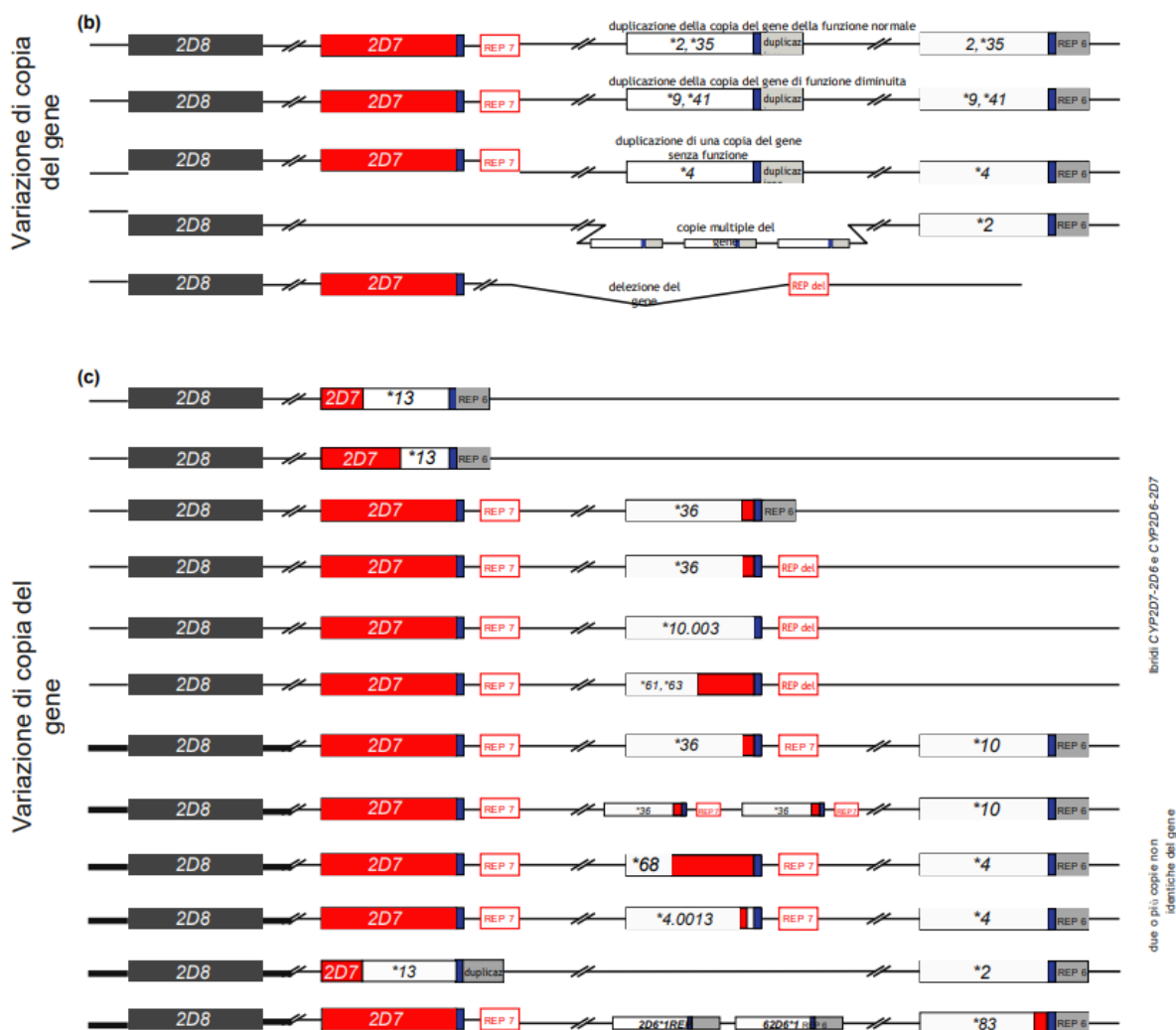


Figura 13: b) esempi di varianti alleliche con copie multiple del gene funzionale ($*2x-N$, $*35xN$), a funzione ridotta ($*9xN$, $*41xN$) o non funzionale ($*4xN$). L'ultima riga rappresenta l'allele di delezione CYP2D6*5. c) rappresenta le varianti strutturali più complesse con i geni ibridi CYP2D7-D6, nelle prime due righe e CYP2D6-D7 nelle successive. Figura tratta da Nofziger C, Turner AJ, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M, Agúndez JAG, Black JL, Dunnenberger HM, Ruano G, Kennedy MA, Phillips MS, Hachad H, Klein TE, Gaedigk A. *PharmVar GeneFocus: CYP2D6. Clin Pharmacol Ther.* 2020 Jan;107(1):154-170. doi: 10.1002/cpt.1643. Epub 2019 Dec 9.

I geni ibridi CYP2D7-D6 sono stati designati come *13. Poiché questi geni ibridi possiedono la porzione iniziale di CYP2D7 con l'inserzione di una T nell'esone 1, sono tutti non funzionali. Si ritiene che siano il prodotto di una grande delezione tra i due geni.

Diversamente, invece, i geni ibridi CYP2D6-2D7 non sono stati raggruppati sotto un'unica designazione. Questa categoria di varianti è accomunata dalla presenza dell'esone nove di CYP2D7 ma viene suddivisa in due gruppi, a seconda della porzione terminale: la categoria A non presenta l'elemento ripetuto e la sequenza spacer tipici di CYP2D7, che sono invece presenti nella categoria B (Figura 11)

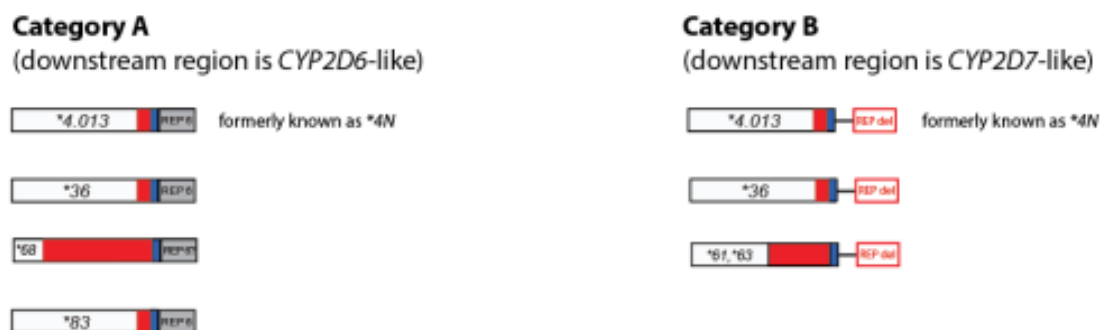


Figura 14: categoria A e B di CYP2D6-2D7. Figura tratta da Nofziger C, Turner AJ, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M, Agúndez JAG, Black JL, Dunnenberger HM, Ruano G, Kennedy MA, Phillips MS, Hachad H, Klein TE, Gaedigk A. *PharmVar GeneFocus: CYP2D6. Clin Pharmacol Ther.* 2020 Jan;107(1):154-170. doi: 10.1002/cpt.1643. Epub 2019 Dec 9.

I polimorfismi del CYP2D6 hanno implicazioni in molte aree terapeutiche diverse, poiché una vasta gamma di farmaci usati clinicamente viene metabolizzata da questo CYP. Esempi di substrati del CYP2D6 possono essere trovati negli antidepressivi, antipsicotici, antiussivi, antiaritmici, analgesici oppioidi (codeina, diidrocodeina, morfina, tramadolo), agenti antitumorali altri farmaci. [48]. La terapia con substrati del CYP2D6 può essere complessa, non solo a causa della variazione genetica, ma anche a

causa delle interazioni farmacologiche. Molti farmaci sono inibitori del CYP2D6, ad esempio le statine [52], e l'assunzione di un farmaco inibitore insieme a un substrato del CYP2D6 può alterare il fenotipo apparente dell'individuo. Questo fenomeno è noto come fenocopia [53].

1.4.4. Famiglia CYP3

Comprende una sola sottofamiglia, CYP3A e quattro geni funzionali: CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP3A43. Essi svolgono un ruolo dominante nelle vie metaboliche dei farmaci, contribuendo per circa il 50 % [21]. Il CYP3A4 è l'enzima più espresso nel fegato adulto, seguito dal CYP3A5. con il CYP3A4 che si ritiene predomini nei bianchi e il CYP3A5 nei neri/afroamericani Mentre il CYP3A7 in quello fetale e viene down-regolato dopo la nascita.

Gli aplotipi CYP3A4 e CYP3A5 sono strettamente collegati in quanto i due geni sono nello stesso blocco genico, che mappa sul cromosoma 7q22 [54], il quale include anche altri membri della famiglia CYP3A.

Il CYP3A4 è responsabile del metabolismo di circa il 50-60% dei farmaci clinici utilizzati oggi, inclusi paracetamolo, codeina, ciclosporina A, diazepam ed eritromicina. È importante per il metabolismo degli ormoni steroidei [55]. Il gene è lungo circa 27 kb e contiene 13 esoni e 12 introni.

Il gene CYP3A5 È espresso nel fegato e nell'intestino e rispetto a CYP3A4 è espresso in maniera predominante nei tessuti extraepatici.

Il gene si trova sul filamento cromosomico negativo, consiste di nove esoni e codifica per una proteina di 502 aminoacidi. L' espressione del CYP3A5 è altamente polimorfica, con 25 varianti alleliche di CYP3A5 (alleli numerati *1-*9) riportate da vari ricercatori ed elencate sul sito web del Pharmacogene Variation Consortium [https://www.pharmvar.org/gene /CYP3A5](https://www.pharmvar.org/gene/CYP3A5) . Il CYP3A5 funzionale è codificato dall'allele CYP3A5*1. Tra le varianti alleliche più studiate c'è CYP3A5*3 (rs776746) che, insieme a CYP3A5*5 e 3A5*6, sono caratterizzate da variazioni che determinano difetti nel meccanismo di splicing ed associati ad una mancata funzionalità.

I substrati della famiglia CYP3A includono una lunghissima lista, tra cui immunosoppressori, chemioterapici (come tamoxifene e paclitaxel), antidepressivi, antipsicotici, benzodiazepine, statine, stimolanti (come cocaina e caffeina), oppioidi (tra cui fentanyl, metadone e tramadol) [57].

1.4.5. Variazioni biogeografiche

Il fenotipo del metabolismo dei farmaci è in parte determinato dall'ereditarietà di vari alleli, che presentano variazioni tra i diversi gruppi etnici. Per esempio, la frequenza del fenotipo CYP2D6 PM è molto più alta nei gruppi di

popolazione di origine caucasica occidentale (5-10%) che nelle popolazioni dell'Estremo Oriente o nei gruppi etnici asiatici (0-2%) [58].

Le principali varianti polimorfiche umane degli alleli CYP2D6 e la loro distribuzione globale sono descritte nella tabella 1.

Un altro esempio è relativo alla frequenza dei CYP2C19 PM che è più bassa nei caucasici occidentali (2-4%) rispetto alle frequenze osservate tra gli orientali (15- 25%), dove raggiunge il 60- 70% nelle isole del Pacifico [59].

Diversi studi dimostrano che i vari geni coinvolti nella farmacocinetica presentano eterogeneità globale e differenze etniche, ogni gene è caratterizzato da un peculiare modello geografico di variazione che influenza le variazioni osservate nei loci farmacogenetici. [11].

Variante maggiore	allele	Mutazione	Conseguenza	Frequenza allelica	(%)	Asiatici	Africa ni neri	Etiopi e sauditi
CYP2D6*2xn		Duplicazione/multiplicazione genica	Aumento dell'attività enzimatica	1-5	0-2	2		10-16
CYP2D6*4		Splicing difettoso	Enzima inattivo	12-21	1	2		1-4
CYP2D6*5		Delezione del gene	Nessun enzima	2-7	6	4		1-3
CYP2D6*10		P34S, S486T	Enzima instabile	1-2	51	6		3-9
CYP2D6*17		T107I, R296C, S486T	Alterata affinità per i substrati	0	0	20-35		3-9

Tabella 2: Principali varianti polimorfiche umane degli alleli CYP2D6 e le loro frequenze biogeografiche. Tabella tratta da: Musshoff F, Stamer UM, Madea B. *Pharmacogenetics and forensic toxicology. Forensic Sci Int.* 2010 Dec 15;203(1-3):53-62. doi: 10.1016/j.forsciint.2010.07.011. Epub 2010 Sep 9. PMID: 20828952.

1.5. Applicazioni nel contesto medico-legale post-mortem

L'interpretazione dei risultati forensi-tossicologici è un compito di grande importanza che richiede la conoscenza di molti aspetti diversi della tossicologia analitica, ma anche della farmacocinetica e farmacodinamica. [60]

Le concentrazioni dei farmaci devono essere confrontate con lo stesso tipo di valori di riferimento sia per i livelli terapeutici che tossici. Il rapporto tra la concentrazione urinaria o sanguigna del farmaco e dei metaboliti (rapporto P/M) può essere utile per decidere se un'assunzione è stata acuta (rapporto elevato) o è il risultato di un uso cronico. Tuttavia, oltre alla dose assunta, anche altre variabili influenzano il rapporto P/M, comprese le interazioni tra diversi composti e le variazioni genetiche, come descritto in precedenza. Tale rapporto metabolico fornisce informazioni sul fenotipo della capacità metabolica di un individuo, per la sostanza in questione. Per queste ragioni, la genotipizzazione è diventata comune nella tossicologia forense [11].

L'autopsia medico-legale è il metodo principale per determinare la causa di morte (CoD) e il modo di morte (MoD). Secondo la definizione accettata a livello internazionale, la causa di morte sottostante (CoD) è (a) la malattia o il trauma, che ha iniziato il susseguirsi di eventi morbosi che portano

direttamente alla morte o (b) le circostanze dell'incidente di violenza che ha prodotto la ferita fatale [61].

Il modo di morte (MoD) è il modo o le circostanze che hanno portato alla sottostante CoD medica ed è discretamente classificato come: naturale, professionale, accidentale, suicidio, omicidio o guerra. In alcuni paesi il MoD include anche il trattamento medico come classe aggiuntiva. [9]

In alcuni casi un'autopsia completa accompagnata da indagini tossicologiche non è sufficientemente esaustiva per determinare la CoD e il MoD, per cui la genotipizzazione post-mortem può essere utile nell'interpretazione dei risultati. È stato dunque coniato il termine "autopsie molecolari" [62].

La farmacogenetica post-mortem si è concentrata prevalentemente sulla variazione genetica degli enzimi CYP in relazione alle intossicazioni da "drugs". In particolar modo il gene CYP2D6 che è altamente variabile nella sua sequenza di DNA tra gli individui, influenza il metabolismo di molti farmaci comunemente prescritti, molti dei quali sono anche tipicamente trovati nello screening tossicologico forense.

La genotipizzazione del CYP2D6 è stata utilizzata in modo interessante anche per analizzare i casi con MoD classificati come suicidio. La presenza della

duplicazione di CYP2D6 si verifica frequentemente nei casi di intossicazione mortale [63].

In particolare, è stato visto che la frequenza di copie soprannumerarie di CYP2D6 è circa dieci volte superiore in soggetti appartenenti a gruppi di autopsie con MoD classificato come suicidio, rispetto a quelli associati a morte naturale [64].

1.6. Oppioidi: nuovi oppioidi sintetici

Gli oppioidi sono sostanze derivate dall'oppio, che viene estratto dalla pianta papaver somniferum. Essi possono anche essere sintetizzati in parte in laboratorio (oppioidi semisintetici) o essere di origine completamente sintetica e, come quelli naturali, agiscono sulle cellule nervose e sui processi mentali. Si parla, dunque, di sostanze psicoattive.

Alla categoria degli oppioidi appartengono sia sostanze d'abuso come l'eroina, legate unicamente al consumo illegale e stupefacente, sia farmaci come la morfina o il fentanyl, utilizzati per controllare il dolore. L'abuso di tali farmaci, ovvero l'utilizzo al di fuori del controllo e della prescrizione medica, può provocare dipendenza e condurre a conseguenze gravi, fino anche alla morte.

Qualsiasi sostanza oppioide può essere soggetta ad abuso e causare dipendenza se assunta in quantità e modalità non prescritte dal medico.

Secondo le stime dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), circa 0,5 milioni di morti sono attribuibili al consumo di droga, di cui circa il 70% è correlato ad oppioidi. Sempre secondo l'OMS, nel 2017 più o meno 27 milioni di persone nel mondo hanno abusato di oppioidi portando a circa 115.000 morti per overdose, la maggior parte negli USA. [65,66,67]. Le sostanze in causa sono principalmente illegali, come l'eroina. Purtroppo però l'abuso di sostanze legali, è un fenomeno in aumento, soprattutto negli Stati Uniti. Di fatti l'incidenza di morte da overdose causata da oppioidi è aumentata del 120% tra il 2010 e il 2018 e due terzi dei decessi riguardano fentanyl e analoghi.

Il motivo di questo sostanziale incremento può essere dovuto a diversi fattori, tra cui l'aumento dell'impiego di oppioidi nella gestione del dolore cronico così il cambiamento dei costituenti delle droghe con comparsa di oppioidi molto potenti sul mercato delle droghe illecite ma anche l'utilizzo sempre più comune di queste sostanze da parte di individui giovani e/o poco esperti.

[66, 68]

Secondo i dati pubblicati dall'Osservatorio europeo delle droghe e delle tossicodipendenze di Lisbona (EMCDDA, European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction) emergono cambiamenti significativi del fenomeno del consumo di droga anche in Europa. L'entrata degli oppioidi sintetici nel mercato illecito europeo ha provocato centinaia di morti sia nell'Europa settentrionale che orientale. In Italia, negli ultimi due anni, si sono registrati due decessi dovuto al consumo di questi stupefacenti [69].

Per quanto riguarda il metabolismo, tutti gli oppioidi sono metabolizzati principalmente dal sistema del citocromo P450 (CYP). In particolar modo, il principale responsabile, come già detto, è l'enzima codificato dal gene CYP2D6. Tra i substrati oppioidi ci sono codeina, tramadol, diidrocodeina, ossicodone, idrocodone, etilmorfina e almeno una parte del metadone. Il fenotipo CYP2D6 PM influenza gli analgesici oppioidi in diversi modi: [70] riduce gli effetti analgesici della codeina, diminuisce l'eliminazione del metadone e riduce l'efficacia del tramadol.

Altre isoforme coinvolte nel metabolismo degli oppioidi sono: CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5.

Nel metabolismo degli oppioidi sono coinvolte, in misura minore, anche le UDP-glucuronosiltransferasi (UGT). Predomina l'UGT2B7 di cui sono noti diversi polimorfismi a singolo nucleotide nella regione del promotore

(variation in opioid responsiveness). Le varianti alleliche funzionali di tale gene ne alterano l'attività enzimatica, andando ad influenzare la clearance epatica della morfina.

A proposito del trasporto di oppioidi, nel tratto gastrointestinale e negli epatociti, hanno la capacità di influenzare la biodisponibilità di questi composti che siano stati somministrati per via orale, limitando o facilitando l'assorbimento intestinale e facilitando l'eliminazione biliare. In particolare, l'espressione dei trasportatori a livello della barriera ematoencefalica ha il potenziale di influenzare significativamente l'efficacia clinica e la sicurezza degli oppioidi, il cui principale sito d'azione si trova nel sistema nervoso centrale (SNC).

Si riconoscono due principali famiglie di trasportatori, rilevanti per la farmacocinetica degli oppioidi: la superfamiglia di trasportatori di efflusso ATP binding cassette (ABC) e la superfamiglia di trasportatori di influsso SLC (Solute Carrier).

1.6.1. Fentanyl

Nell'ambito dell'abuso di oppioidi, la classe che desta maggior preoccupazione è quella dei fentanili. Si tratta di una famiglia di oppioidi

sintetici, con una potenza da 100 a 1000 volte più elevata di quella della morfina e dell'eroina e infatti gli effetti si verificano con una rapida insorgenza. Questo è dovuto alla elevata lipofilità che permette un'azione più marcata sul sistema nervoso centrale. [71]

Sono sostanze sintetiche prodotte in laboratori casalinghi. Si vendono come sostituti a basso costo dell'eroina. Sono tanto potenti, quanto tossici e provocano un'overdose difficilmente reversibile. Nello specifico, il Fentanyl, è utilizzato in ambito clinico per l'anestesia e l'analgesia ma allo stesso tempo è una delle droghe più acquistate sul mercato clandestino delle droghe nel dark web.

Il Fentanyl è stato implicato come uno dei principali responsabili dell'aumento del numero di morti per overdose da oppioidi.

Questo composto esercita un effetto analgesico attraverso il legame al recettore μ -oppioide, codificato dal gene OPRM1 e viene trasportato nelle cellule da un trasportatore ATP-dipendente, codificato dal gene ABCB1. La principale via metabolica di questo oppioide avviene nel fegato e consiste in una reazione di N-dealchilazione che converte il fentanyl in norfentanyl. Il principale metabolizzatore è il CYP3A4, un ulteriore catalizzatore di questa conversione è il CYP3A5. [72]

La maggior parte della popolazione caucasica è portatrice dell'allele CYP3A5*3, con conseguente riduzione dell'attività enzimatica [11].

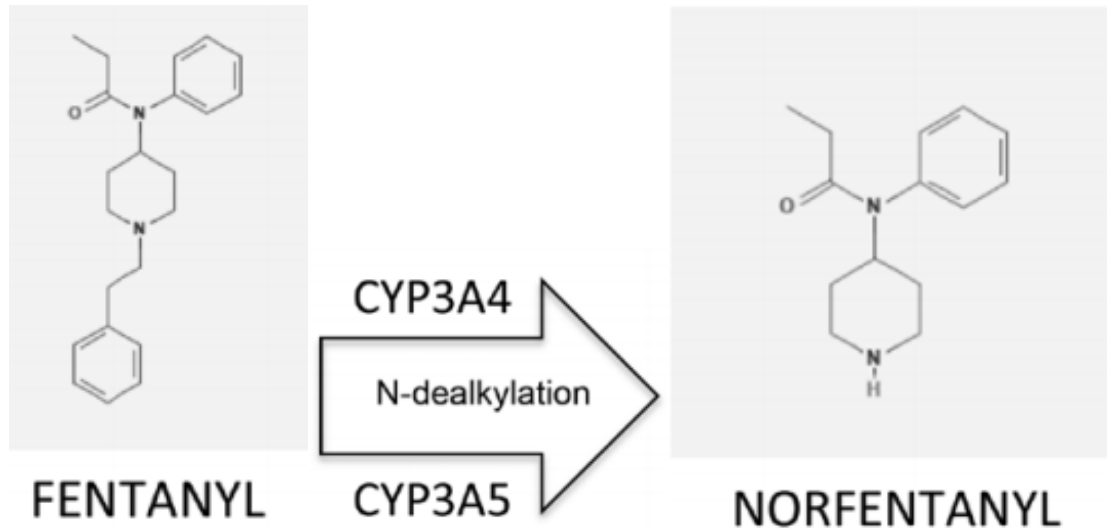


Figura 15 Principale via metabolica del Fentanyl. Figura tratta da: Glenn S. Gerhard, Scott Kaniper and Barbara Paynton *Fentanyl overdoses and pharmacogenetics. Pharmacogenetics and Genomics 2019 Wolters Kluwer Health, Inc. Pharmacogenetics and Genomics 2019, 30:5–8*

In uno studio condotto da M. Jin et al., basato su esami autoptici per decessi legati al fentanyl, è stata messa in evidenza la correlazione tra il metabolismo alterato di questo oppioide e la presenza di omozigosi per CYP3A5*3, insieme a CYP3A4*1A. I risultati suggeriscono che la genotipizzazione di questi due aplotipi può essere utile nelle autopsie molecolari.

1.6.2. Tramadol

È un altro esempio di oppioide sintetico con uso clinico per le sue proprietà antidolorifiche ma che viene assunto anche come sostanza stupefacente. È metabolizzato dal CYP2D6 per generare un prodotto farmacologicamente attivo, l'O-desmetiltramadolo (ODT), un analgesico agonista del recettore degli oppioidi. Il metabolita ha una maggior affinità per i recettori μ -oppioidi, rispetto al Tramadol. Dunque è il principale responsabile dell'effetto analgesico.

La variabilità della risposta è quindi strettamente legata al genotipo CYP2D6. I pazienti che sono CYP2D6 UM hanno elevati livelli plasmatici di O-desmetiltramadolo e dunque sono a maggior rischio di effetti avversi.

Anche l'enzima CYP2C19 è coinvolto in vie metaboliche secondarie.

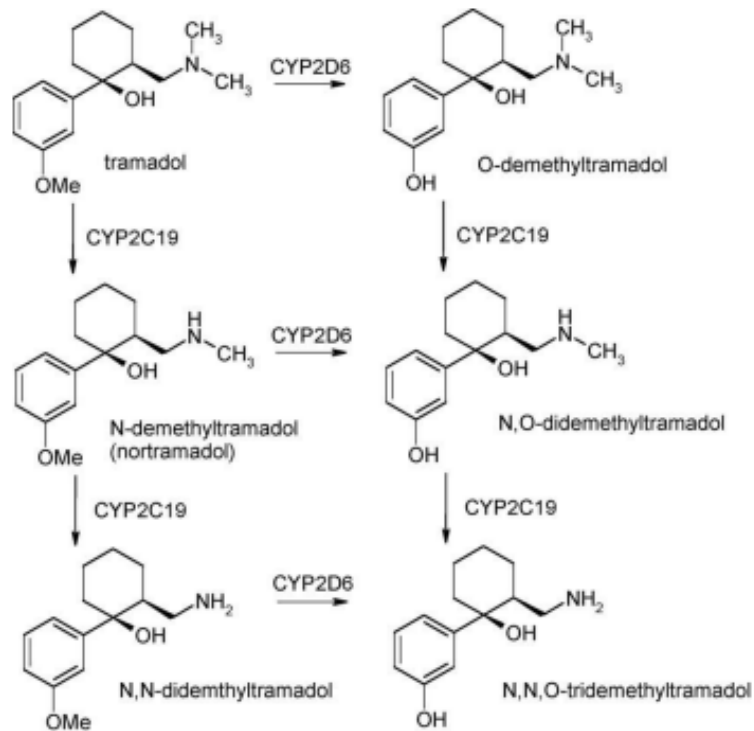


Figura 16: vie metaboliche del tramadol. Figura tratta da: Musshoff F, Stamer UM, Madea B. *Pharmacogenetics and forensic toxicology. Forensic Sci Int.* 2010 Dec 15;203(1-3):53-62. doi: 10.1016/j.forsciint.2010.07.011. Epub 2010 Sep 9. PMID: 20828952.

1.6.3. Codeina

Il metabolismo di questo oppioide coinvolge in maniera principale l'enzima CYP3A4 che catalizza la conversione di codeina in norcodeina.

Secondariamente, tramite l'enzima CYP2D6 la codeina viene demetilata e convertita in morfina. La codeina ha lievi effetti analgesici sul sistema nervoso centrale (SNC) ma un aumento dell'attività enzimatica di questo metabolizzatore può provocare grave tossicità della morfina, anche con

piccole dosi di codeina. È dunque il caso di individui con fenotipo CYP2D6 UM.

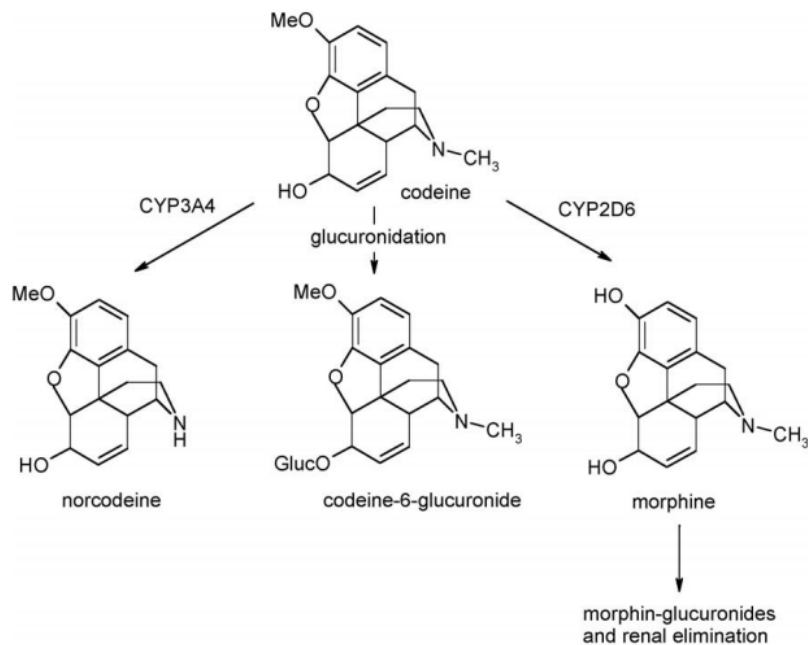


Figura 17: Metabolismo della codeina. Questa molecola viene metabolizzata in norcodeina dal CYP3A4 e in codeina-6-glucuronide dalla glucuronidazione, per circa l'80%. La conversione in morfina tramite il CYP2D6 rappresenta il 10% delle vie metaboliche. *Figura tratta da: Musshoff F, Stamer UM, Madea B. Pharmacogenetics and forensic toxicology. Forensic Sci Int. 2010 Dec 15;203(1-3):53-62. doi: 10.1016/j.forsciint.2010.07.011. Epub 2010 Sep 9. PMID: 20828952.*

1.6.4. Metadone

È un ulteriore caso di oppioide sintetico, esso viene impiegato in medicina per il trattamento di dolore cronico e per il trattamento della dipendenza da oppiacei.

Tra i fattori farmacocinetici, la glicoproteina-P (P-gp) codificata dal gene ABCB gioca un ruolo cruciale nell'assorbimento, distribuzione ed eliminazione. In termini di metabolismo sono significativi gli enzimi del

sistema citocromo P450. Più nello specifico, i principali CYP coinvolti sono CYP2B6, CYP3A4, CYP2C19 e CYP2D6. In maniera minore anche CYP1A2, CYP3A5, CYP2C8, CYP2C9 [73]. Catalizzano una N-demetilazione del metadone con formazione di 2-etilidene-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina (EDDP), che è inattivo. In particolare CYP2B6 è quello che produce la maggior quantità di EDDP [74]. Gli alleli CYP2B6*6 sono risultati significativamente associati a una maggiore concentrazione di metadone post mortem. Questa variante allelica determina un metabolismo lento, dunque accumulo plasmatico di metadone con conseguenti effetti letali.

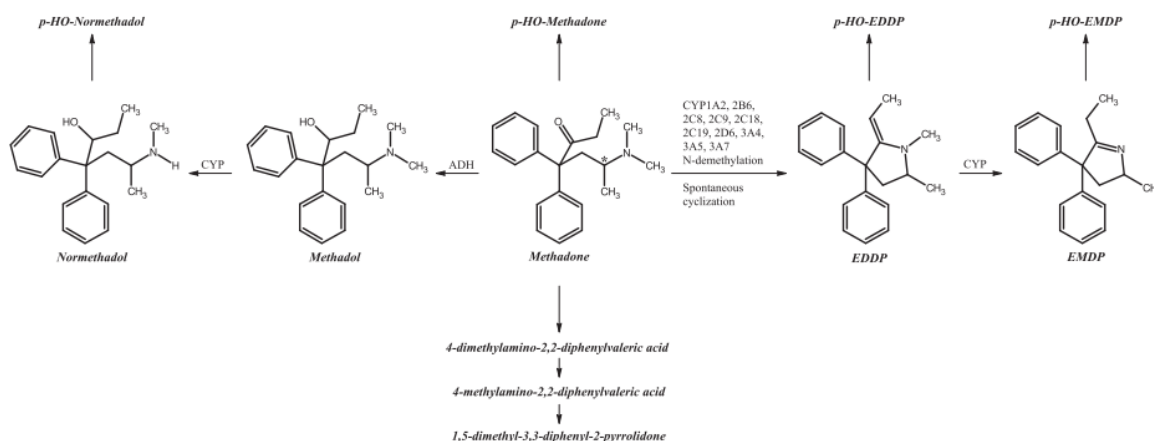


Figura 18. Metabolismo del metadone. ADH: alcol-deidrogenasi. EDDP: “-etil-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina. EMDP: 2-etil-5-metil-3,3-difenil-1-pirrolina. *Figura tratta da: Ahmad T, Valentovic MA, Rankin GO. Effects of cytochrome P450 single nucleotide polymorphisms on methadone metabolism and pharmacodynamics. Biochem Pharmacol. 2018 Jul;153:196-204. doi: 10.1016/j.bcp.2018.02.020. Epub 2018 Feb 16. PMID: 29458047; PMCID: PMC6148365*

Capitolo secondo

SCOPO DELLA TESI

Lo studio presentato in questo elaborato di tesi ha l'obiettivo di indagare il ruolo della farmacogenomica nel metabolismo di alcuni composti esogeni. Nello specifico sono inclusi quattordici campioni di sangue prelevato durante autopsie di soggetti deceduti, la cui causa di morte è correlata agli oppioidi, comunemente prescritti per il loro effetto analgesico ma che spesso vengono assunte in maniera abusiva e non controllata per l'effetto di euforia che provocano. Spesso la determinazione della causa di morte non è semplice, per mancanza di dati tossicologici evidenti, in quanto c'è una importante diversità interindividuale nel rispondere all'assunzione di farmaci. Tra i fattori che influenzano questa variabilità c'è la componente genetica che contribuisce per circa il 30%. Per questo motivo è importante individuare dei biomarcatori affidabili che possano fornire supporto all'interpretazione di situazioni poco chiare nel contesto post-mortem ma non solo. L'identificazione di chiare relazioni tra un genotipo e la tossicità di un composto avrebbero importanti risvolti anche in campo clinico per guidare il dosaggio da parte dei medici. Nell'ampio panorama della farmacogenomica, questa ricerca si è focalizzata sull'ambito farmacocinetico e in modo particolare sulla superfamiglia genica del citocromo P450 epatico. Infatti i geni appartenenti a questo gruppo sono

noti per essere implicati nel metabolismo della maggior parte dei farmaci comunemente prescritti. Inoltre le famiglie CYP1, CYP2 e CYP3 sono altamente polimorfiche, per cui sono stati studiati otto geni appartenenti a queste prime tre famiglie: CYP1A2, CYP2B6, CYP2D6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5. Dunque si è voluto indagare se e come questi polimorfismi possano influenzare il metabolismo di alcuni oppioidi per approfondire il loro ruolo come biomarcatori farmacocinetici. Il metodo di analisi utilizzato è stato il *massive parallel sequencing*, dunque sono state allestite librerie di DNA per poi sequenziarle con la tecnologia *Ion Torrent S5™ System*. I dati di sequenziamento sono poi stati convertiti in aplotipi con l'aiuto di Allele Typer™ Software e successivamente si è passati ad una interpretazione per ricavare le tipologie di metabolizzatori: lenti, intermedi, normali o rapidi in modo da ricercare correlazioni con i dati tossicologici dei campioni.

Capitolo terzo

TECNICHE DI ANALISI

3.1. Estrazione del DNA QIAamp® DNA Mini kit

Per l'isolamento del DNA è stato utilizzato il *QIAamp® DNA Mini kit* della *QIAGEN® (QIAamp® DNA Mini and Blood Mini, May 2016, QIAGEN®)*. Il metodo prevede due fasi principali: una di lisi cellulare e una di purificazione (figura 19). Il primo passaggio permette il rilascio del materiale genomico tramite lisi enzimatica con la proteinasi K, favorita ulteriormente da un trattamento ad elevata temperatura. Con la purificazione, poi, si separano gli acidi nucleici da tutto il resto degli elementi cellulari come proteine, lipidi, polisaccaridi e da sostanze interferenti. Questa seconda fase prevede a sua volta quattro step: il passaggio del lisato attraverso una colonnina fornita dal kit, all'interno della quale il DNA si lega ad una matrice di silice, due lavaggi con wash buffers e infine l'eluizione con un buffer apposito o acqua distillata. Il legame selettivo è basato sulla capacità degli acidi nucleici di adsorbirsi alla membrana silicea in presenza di Sali caotropici. Questi Sali, presenti nel buffer di lisi AL aggiunto al campione insieme alla proteinasi K, hanno una duplice funzione. In quanto agenti denaturanti contribuiscono alla denaturazione della struttura tridimensionale delle proteine e inoltre fanno da ponte tra la carica negativa dell'ossigeno siliceo e le cariche negative del

fosfato degli acidi nucleici. Con questo kit si ottiene il DNA purificato, privo di nucleasi o altre proteine, contaminanti o inibitori. Partendo da un campione di sangue, come nel caso di questo studio, nell'eluito si ottengono frammenti di circa 20-30 kb che possono arrivare fino a 50 kb con una resa, in termini di concentrazione, nel range di 1-10 ng/ml.

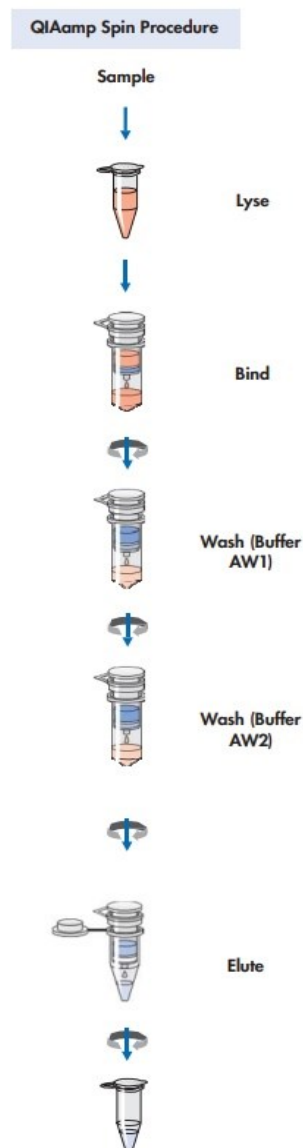


Figura 19 Estrazione del DNA con QIAamp® DNA Mini kit.

3.2. Estrazione del DNA con DNA IQ™ Casework Pro Kit

Si tratta di un kit progettato per l'estrazione ottimale da campioni forensi come tracce di sangue, sperma, capelli, tessuti e tutti i campioni con un basso quantitativo di materiale genomico. In questo studio è stato utilizzato per migliorare la resa di alcuni estratti poco concentrati ottenuti con il metodo manuale delle colonnine. La bassa resa probabilmente è dovuta al fatto che si tratta di campioni di sangue raccolti in tempi non recenti rispetto all'analisi e conservati in condizioni non ottimali, privi di anticoagulante.

Le fasi di lisi, estrazione e purificazione sono automatizzate, grazie allo strumento Maxwell® 16 e cartucce *ready to use*, fornite dal kit (figura 20). L'isolamento del DNA è basato su una resina costituita da biglie magnetiche a cui rimane adeso l'acido nucleico ma non gli altri elementi cellulari, che vengono eliminati tramite dei lavaggi.



Figura 20 cartucce ready to use del kit DNA IQ™ Casework Pro Kit for Maxwell® 16.

3.3. Quantizzazione dell'estratto con Qubit© 2.0 Fluorometer

Per quantificare il DNA presente nell'estratto è stato utilizzato il fluorimetro Qubit© 2.0 (Invitrogen). Lo strumento è in grado di rilevare la fluorescenza di composti specifici per le diverse classi di biomolecole. A seconda del kit, quindi, è in grado di quantizzare proteine o acidi nucleici, a singolo o doppio filamento. In questo caso è stato usato il kit Qubit™ dsDNA HS Assay Kit, specifico per il DNA a doppio filamento grazie ad un colorante che emette il segnale quando si intercala tra le basi. Ad una specifica concentrazione del colorante, l'intensità del segnale di fluorescenza è direttamente proporzionale alla concentrazione di DNA nella soluzione. Lo strumento converte il segnale fluorescente in una misura della concentrazione, sulla base di una retta standard (figura 21). Infatti nel kit sono presenti due standard a concentrazioni note, uno con basse quantità di DNA, l'altro con concentrazione elevata, intorno ai 500ng/ml.

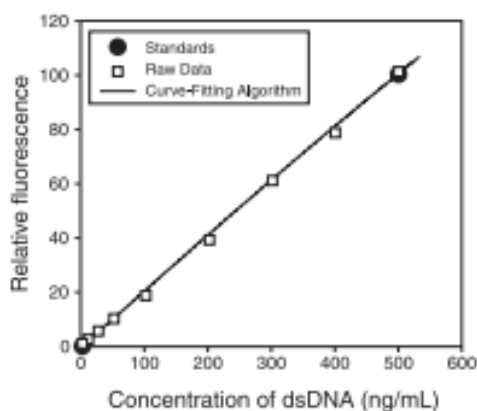


Figura 21 Esempio della costruzione di retta di taratura per la quantizzazione di dsDNA con Qubit© 2.0

Il campione viene diluito in una working solution costituita da un buffer e il composto fluorescente, per questo la concentrazione letta in prima istanza è quella del campione diluito. Selezionando la quantità di estratto aggiunta alla working solution, lo strumento calcola in automatico la concentrazione iniziale del campione con la seguente formula:

$$QF\ value \times \frac{200}{x}$$

Dove QF value è il valore diluito letto dal Quibit©;

200 è il fattore di diluizione

ed x il numero di microlitri aggiunti.

3.4. Next Generation Sequencing

Il sequenziamento di nuova generazione è una tecnologia per determinare la sequenza di DNA o RNA. È stato introdotto sul commercio nel 2005 ed è definito anche Massive Parallel Sequencing in quanto permette di sequenziare molti frammenti di acido nucleico contemporaneamente, al contrario dei metodi tradizionali basati sull'elettroforesi, come il metodo Sanger. I metodi di NGS consentono l'analisi di centinaia o migliaia di geni contemporaneamente e in campioni diversi, nonché l'analisi di diverse

caratteristiche genomiche in una sola corsa di sequenziamento, dalle varianti a singolo nucleotide (SNVs), al numero di copie geniche e varianti strutturali. Gli studi possono essere eseguiti in modo rapido ed economico. Negli ultimi anni l'analisi genetica è stata rivoluzionata grazie alla velocità, produttività e accuratezza delle tecnologie di sequenziamento massivo parallelo.

Per questo studio è stata impiegata la tecnologia *Ion Torrent S5™ System by Thermo Fisher*.

Indipendentemente dalla metodologia dello strumento utilizzato, gli esperimenti NGS condividono alcuni steps, raffigurati nella Figura seguente:

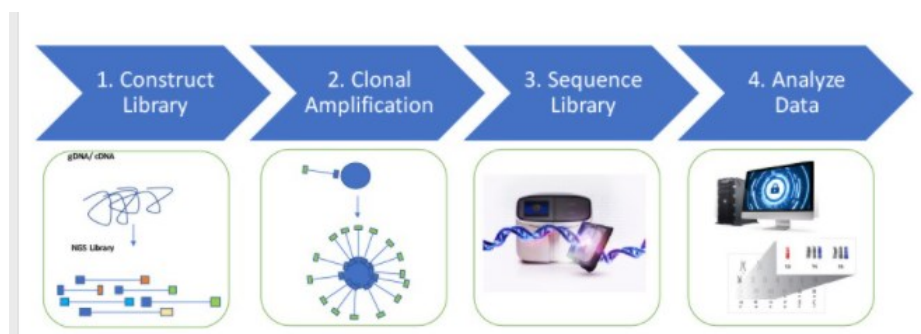


Figura 22 Workflow dei metodi NGS. Gli steps comprendono: 1. Costruzione di una libreria, 2. Amplificazione clonale, 3. Sequenziamento, 4. Analisi dei dati. Figura tratta da: <https://www.thermofisher.com/>

- *Costruzione di una libreria*

La prima fase consiste nella costruzione di una “libreria” di sequenziamento che può essere di DNA o cDNA. Il materiale genetico viene processato per ottenere frammenti a doppio filamento. A seconda dell'applicazione specifica,

la produzione dei frammenti può avvenire con taglio fisico, digestione enzimatica o amplificazione basata su PCR delle regioni di interesse. Quest'ultimo metodo è quello utilizzato nel presente lavoro, grazie ad uno specifico pannello costituito da un pool di primer specifici per i polimorfismi utili alla ricerca (i dettagli nel capitolo quarto).

Successivamente i frammenti risultanti vengono ligati a sequenze adattatrici specifiche per la tecnologia in questione che saranno necessari per la fase di amplificazione clonale. Oltre agli adattatori è importante anche un barcode molecolare diverso per ogni campione presente nella stessa corsa, in modo da distinguerli in fase di analisi. Nello specifico per l'Ion Torrent S5™ System vengono create librerie paired-end, con adattatori ad entrambe le estremità delle regioni da analizzare, così da poter ottenere un sequenziamento del dsDNA in entrambe le direzioni. Una schematizzazione dei passaggi di costruzione delle librerie Ion Torrent è raffigurata nell'immagine sottostante.

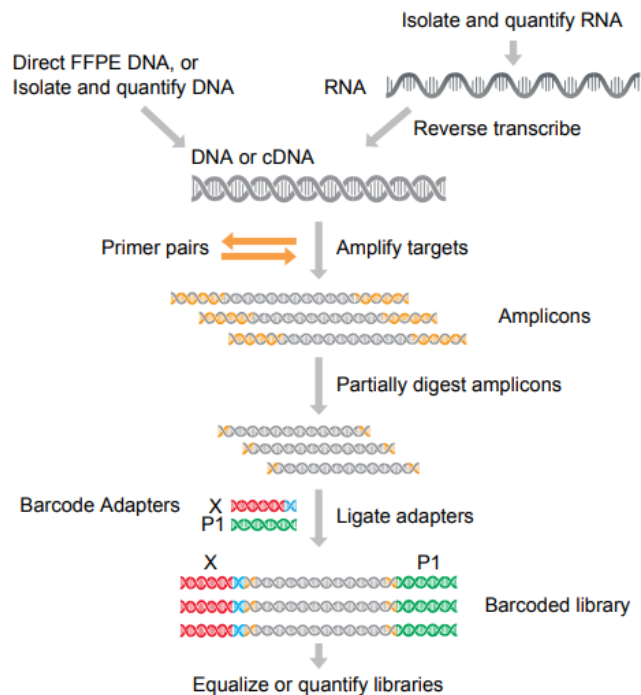


Figura 23 Passaggi per la costruzione di librerie con Ion Torrent S5™ System. Figura tratta da User Guide: Ion AmpliSeq Library Kit 2.0, revision F.0

Una volta ottenute le librerie possono essere quantizzate e uniformate in termini di concentrazione molare (dettagli nel paragrafo 3.4).

- *Amplificazione clonale*

Prima del sequenziamento la libreria deve essere fissata a una superficie solida e amplificata ottenendo dei cloni, così da aumentare il segnale rilevato dallo strumento. L'amplificazione clonale può avvenire tramite *Bridge PCR* o *Emulsion PCR*, nel primo caso ogni singola molecola di DNA è legata a una cella di flusso, nel secondo ad una biglia e ogni biglia idealmente è contenuta in una micella dell'emulsione. La tecnologia Ion Torrent sfrutta la seconda tipologia amplificazione clonale (figura 24).

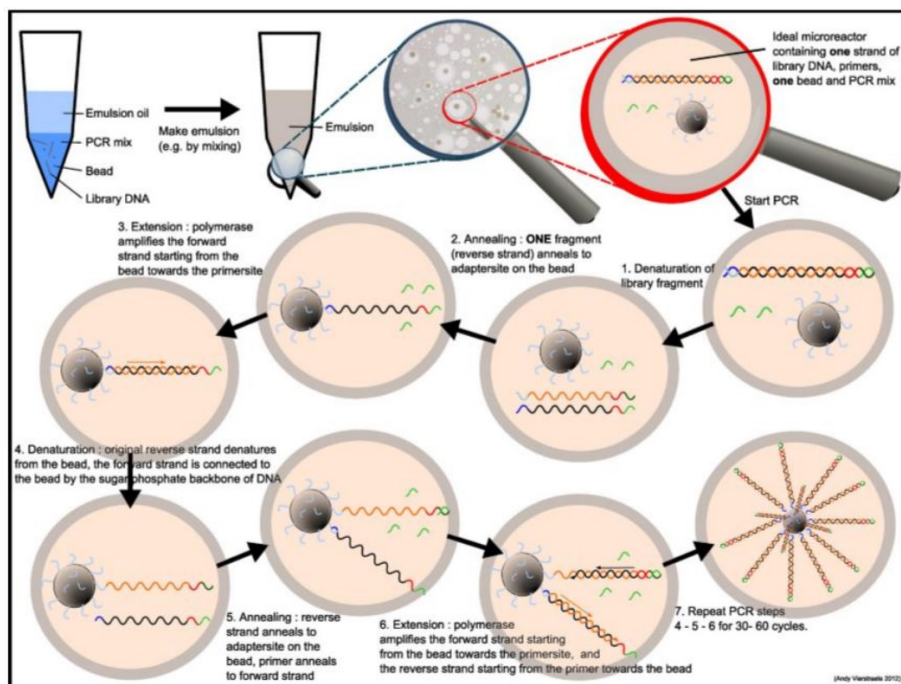


Figura 24 PCR in emulsione: idealmente in ogni goccia dell'emulsione è presente una sferetta con un frammento di DNA a singolo filamento e tutti gli elementi necessari per la reazione di PCR. Sulla sferetta sono adesi oligonucleotidi complementari agli adattatori aggiunti ai frammenti e fungono anche da primers. Dopo i classici cicli di un programma di PCR la sfera risulterà ricoperta da milioni di copie con la stessa sequenza. Figura tratta da: "Next Generation Sequencing for Dummies", Andy Vierstraete, Departmento of Biology, Ghent University. Version March 14th 2018.

Dopo i classici cicli di un programma di PCR la sfera, definita ISP, risulterà ricoperta da milioni di copie con la stessa sequenza. Nel lavoro qui riportato, questa fase viene automatizzata con *Ion Chef™ Instrument*, insieme anche al processo di arricchimento e caricamento del chip di sequenziamento. Questo permette di velocizzare notevolmente i tempi di lavoro.

Idealmente il risultato della PCR in emulsione consiste in ISPs associate a milioni di copie dello stesso amplicone, definite monoclonali. In realtà, però, si ha anche la produzione di gocce di emulsione con particelle prive di frammenti legati, così come gocce contenenti due ISPs e la produzione di

ISPs policlonali, ovvero biglie ricoperte da frammenti appartenenti ad ampliconi diversi e dunque con sequenze diverse. Quest'ultima situazione è sicuramente quella più problematica e la formazione di questi prodotti è inevitabile ma in fase di analisi è possibile filtrare le reads che ne derivano.

- *Sequenziamento*

Tutte le librerie dei singoli campioni vengono sequenziate contemporaneamente nello strumento di sequenziamento. Ogni metodologia NGS utilizza un proprio sistema di rilevamento per la lettura della sequenza ma tutte hanno in comune lo stesso principio: il sequenziamento per sintesi. Ovvero si ha la polimerizzazione di un filamento di DNA, sulla base di un filamento stampo e all'aggiunta di ogni nucleotide si avrà un certo tipo di segnale rilevato dallo strumento. La maggior parte sfrutta un segnale di tipo ottico, lo Ion Torrent S5™ System, invece, esegue un rilevamento elettrico. il principio basilare è che quando un nucleotide viene incorporato dalla DNA polimerasi al filamento nascente, si ha il rilascio di un atomo di idrogeno come sottoprodotto (Figura 25). Il rilascio di ioni H⁺ comporta deboli alterazioni del pH che determinano piccole differenze di potenziale registrate da un Ion Sensitive transistor a effetto di campo incorporato nel Chip.

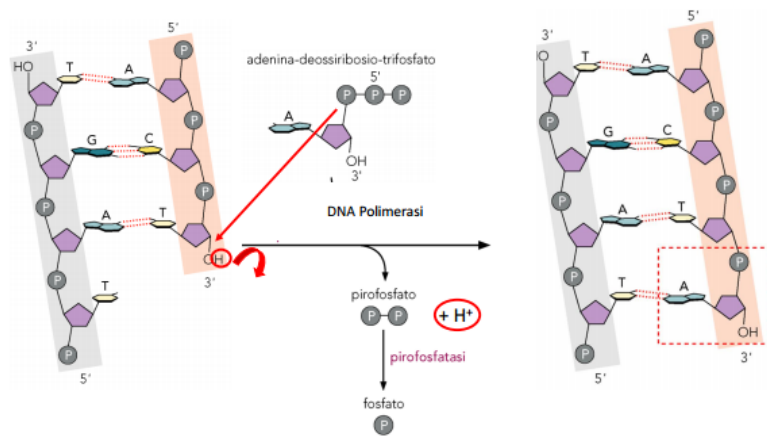


Figura 25 Illustrazione di un nucleotide che viene incorporato in un filamento di DNA, producendo lo scarto di un atomo di idrogeno.

Nello specifico, l' *Ion Chip* è costituito da uno strato superiore in cui sono presenti i pozzetti con dimensioni tali da contenere una sola sfera dell'amplificazione clonale e i reagenti per la reazione di sequenziamento. Al di sotto vi è un secondo strato contenente dei semiconduttori che trasmettono il segnale allo strato sottostante, costituito da una piastra di sensori (Figura 26). Ogni sensore corrisponde ad un pozzetto e ha la capacità di registrare le piccole variazioni di pH convertendole in variazione di potenziale (ΔV).

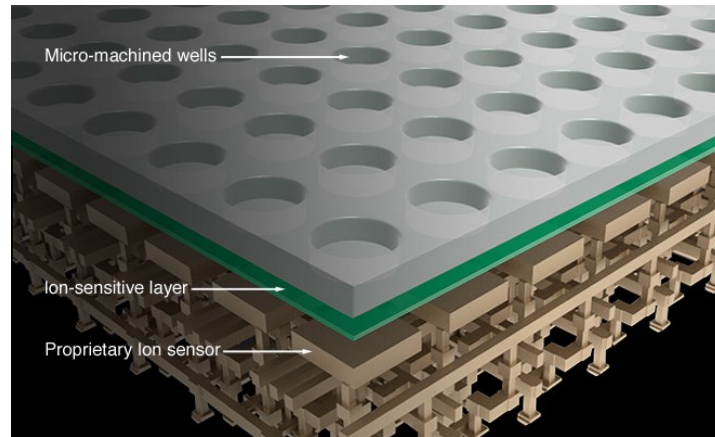


Figura 26 Struttura dell' Ion Chip. Figura tratta da: <https://www.thermofisher.com/>

Ciclicamente viene aggiunto un tipo di nucleotide alla volta e se viene incorporato al DNA nascente si avrà la variazione di potenziale, la cui intensità è proporzionale al numero di monomeri incorporati. Ad esempio l'aggiunta di due timine sarà riscontrabile graficamente in un picco che è il doppio rispetto all'aggiunta di una singola unità (Figura 27). Se, invece, il nucleotide aggiunto al pozzetto non è complementare allo stampo non viene incorporato, quindi non si ha rilascio di H^+ e il segnale rimane piatto.

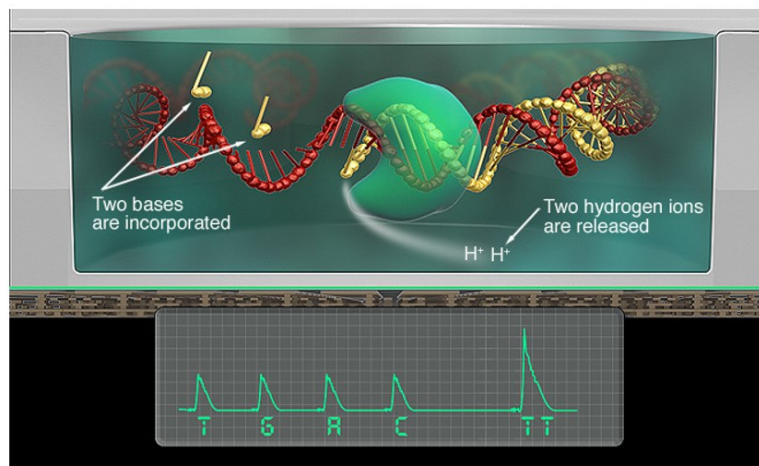


Figura 27. intensità della variazione di potenziale all'incorporazione di nucleotidi al filamento nascente. Figura tratta da: <https://www.thermofisher.com/>

- *Analisi dei dati*

Ogni corsa di sequenziamento genera una grande mole di complessi dati, costituiti da *reads*, ovvero letture dei brevi frammenti. Ogni piattaforma dispone di propri algoritmi e strumenti di analisi ma condividono tre fasi principali: analisi primaria, secondaria e terziaria. L'analisi primaria è l'elaborazione dei segnali grezzi derivanti dai rilevatori degli strumenti in dati digitalizzati, definiti base calling. L'output di questa analisi primaria è un file in formato FASTAQ contenente le chiamate di base, assemblate in reads, e associate a un punteggio di qualità detto Phred Quality Score e basato sul codice ASCII. Si tratta di singoli caratteri che rappresentano la qualità di ciascuna base. L'analisi secondaria prevede il filtraggio e l'eliminazione delle reads a bassa qualità e in seguito l'allineamento a un genoma di

riferimento e l'identificazione delle varianti. Il risultato che si ottiene è un file dove vengono riportate le reads con le coordinate del mapping sul genoma di riferimento. Nel caso di questo studio è stato utilizzato il genoma hg19 come riferimento. L'analisi terziaria implica l'interpretazione dei risultati e l'estrapolazione di informazioni significative per il contesto di ricerca. La piattaforma Ion Torrent dispone di un software intuitivo che semplifica l'analisi. Nello specifico è stato utilizzato il Torrent Suite™ Software 5.10, revisione A.0 .

3.5. Quantizzazione delle librerie con *Agilent 2200 TapeStation nucleic acids system*

Una volta terminata la preparazione manuale delle librerie, prima di caricarle sul *Ion Chef™ Instrument* è necessario sottoporle ad un controllo di qualità e una quantizzazione. Questo viene effettuato tramite l'Agilent 2200 TapeStation nucleic acids system. Si tratta di un sistema di elettroforesi capillare automatizzata. Fornisce risultati in termini di dimensione, concentrazione e integrità. Rispetto ai metodi tradizionali permette di ridurre i tempi dell'analisi, ridurre l'errore manuale e anche una riduzione del costo per campione. Infatti necessita di piccoli volumi di campione, 1-2 µl per il DNA e i tempi di analisi sono di pochissimi minuti.

La corsa elettroforetica avviene su una ScreenTape (Figura 28). Essa è costituita da: una camera tampone situata nella parte superiore del canale che contiene tamponi ottimizzati per la separazione efficace di frammenti di acidi nucleici o proteine, dagli elettrodi integrati che applicano una corrente elettrica alle estremità del dispositivo ScreenTape e ovviamente dal gel. Come in una classica elettroforesi, all'applicazione del voltaggio, i frammenti di acidi nucleici migreranno dal polo negativo verso quello positivo con una velocità proporzionale al peso molecolare.

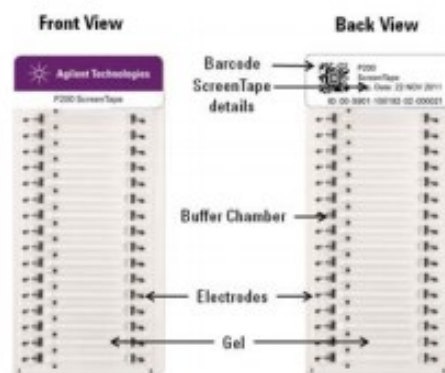


Figura 28 Dispositivo ScreenTape per Agilent TapeStation 2200

Oltre ai campioni viene inserito anche un Genomic Ladder che, come quello utilizzato nella classica elettroforesi su gel, è costituito da una miscela di frammenti di DNA con peso molecolare noto e permette di determinare le dimensioni dei frammenti analizzati. Inoltre durante la preparazione del campione viene aggiunto un buffer contenente due standard interni, a concentrazione nota che servono al sistema per determinare la quantità di

campione. I passaggi di preparazione sono illustrati nella figura 29 e la procedura specificata nel capitolo quarto

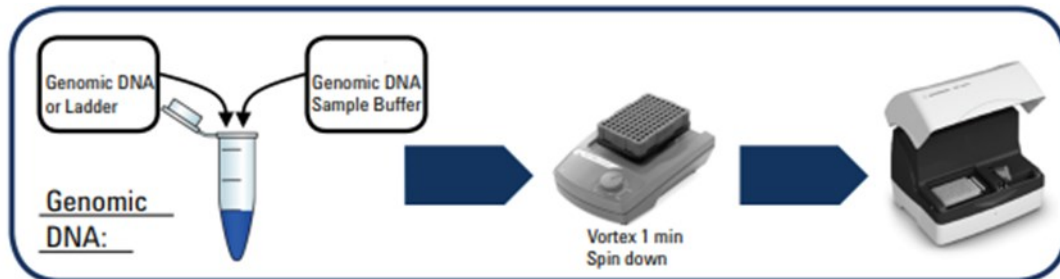


Figura 29 Illustrazione dei passaggi per elettroforesi automatizzata con Agilent TapeStation 2200. Figura tratta da: <https://www.thermofisher.com/>

I risultati delle corse vengono mostrati con un'immagine rappresentativa del gel e un grafico che indica la dimensione e la concentrazione

Le librerie amplificate tipicamente hanno concentrazioni tra i 2000 e i 10000 pM e dovrebbero mostrare un picco nel range di 120-400 bp, nel caso specifico di questo lavoro è stato stimato che gli ampliconi dovrebbero avere un'ampiezza media di 205 bp. e La molarità non è, però, indice di qualità e possono essere sequenziate anche librerie di 1000 pM con buoni risultati. Viene considerata la molarità perché sulla base di essa verrà poi calcolato il fattore di diluizione per portare tutte le librerie a 100 pM. Successivamente i vari campioni delle librerie vengono uniti in un'unica libreria combinata. Quest'ultima ulteriormente diluita a 40 pM viene poi caricata nel *Ion Chef™ Instrument*.

Capitolo quarto

MATERIALI E METODI

4.1. Campioni

Il materiale di partenza di questo studio consiste in matrici di sangue prelevato durante riscontri autoptici di quattordici individui maschi, italiani, la cui causa di morte è correlata ad abuso di oppioidi e maggiori dettagli vengono riportati nel capitolo sesto. I campioni sono stati conservati in provette, privi di anticoagulante. Nella tabella 3 viene riportato l'elenco dei campioni con indicando il relativo codice e suddivisi a seconda del metodo utilizzato per l'estrazione del DNA.

Tabella 3 Elenco dei campioni utilizzati nello studio, suddivisi in base al metodo di estrazione del DNA utilizzato.

CAMPIONI ESTRATTI CON <i>QIAamp® DNA Mini kit</i>	CAMPIONI ESTRATTI CON <i>DNA IQ™ Casework Pro Kit Maxwell® 16</i>
PHG-A1	PHG-A4
PHG-A2	PHG-A5
PHG-A3	PHG-A14
PHG-A6	
PHG-A7	
PHG-A8	
PHG-A9	
PHG-A10	
PHG-A11	
PHG-A12	
PHG-A13	

4.2. Protocollo di Estrazione con *QIAamp*® DNA Mini kit

Il materiale di partenza è sangue privo di anticoagulante. È stato seguito il protocollo *QIAamp*® DNA Mini and Blood Mini Handbook, Fifth Edition, May 2015, *QUIAGEN*®.

- Preparare una provetta da 1.5 ml per ogni campione, contrassegnandola con il codice relativo.
- Pipettare 200 µl di Buffer AL nella provetta da 1.5 ml.
- Aggiungere 20 µl di proteinasi K.
- Aggiungere 200 µl di campione.
- Vortexare per 15 secondi.
- Incubare a 56 °C per 10 minuti in agitazione su *Eppendorf Thermomixer*.
- Breve centrifugazione per raccogliere tutto il materiale sul fondo della provetta.
- Aggiungere 200 µl di etanolo (96-100%).
- Vortexare per 15 secondi.
- Breve centrifugazione
- Preparare una *QIAamp MinElute coloumn* per ogni campione, segnando il relativo codice. Sono già dotate di collection tubes da 2 ml.

- Trasferire tutto il lisato all'interno della colonnina, facendo attenzione a non toccare la membrana con il puntale.
- Centrifuga a 8000 rpm per 1 minuto.
- Trasferire la colonnina in un nuovo collection tube e buttare quello contenente il filtrato.
- Aggiungere 500 μ l di buffer AW1, sempre con attenzione a non toccare la membrana.
- Centrifugare a 8000 rpm per 1 minuto.
- Spostare la colonnina in un nuovo collection tube e buttare quello con il filtrato.
- Aggiungere 500 μ l di buffer AW2, senza toccare la membrana.
- Centrifugare a 14000 rpm per 3 minuti.
- Trasferire la colonnina in un nuovo collection tube e buttare quello con il filtrato.
- Centrifugare a massima velocità per un minuto, in modo da eliminare dal filtro eventuali contaminanti residui.
- Porre la colonnina in una provetta da 1.5 ml e buttare il collection tube.
- Aggiungere 100 μ l di Buffer AE o acqua distillata.
- Incubare a temperatura ambiente (15-25 °C) per 1 minuto.
- Centrifugare a 8000 rpm per 1 minuto.

- Gettare la colonnina.

Il DNA eluito si trova nella provetta da 1.5 ml.

4.3. Protocollo di estrazione del DNA con *DNA IQ™ Casework Pro Kit*

- Posizionare le cartucce *ready to use* sul supporto magnetico del Maxwell® 16.
- Aggiungere il campione nel pozzetto 1.
- Aggiungere il plunger nel pozzetto 8.
- Posizionare gli elution tubes, forniti dal kit, nella posizione apposita del supporto (figura 30)
- Aggiungere 50 µl di Elution Buffer sul fondo degli elution tubes e lasciarli aperti con il tappo rivolto verso l'operatore.
- Caricare il supporto con le cartucce e gli elution tubes sullo strumento Maxwell® 16.
- Assicurarsi che lo strumento sia settato su LEV (Low Elution Volume) e avviare la corsa.

Al termine della procedura le cartucce possono essere gettate e il campione è pronto per le fasi successive.



Figura 30 Supporto magnetico del Maxwell® 16 con cartucce ready to use ed elution tubes del kit DNA IQ™ Casework Pro Kit. Il puntale indica l'aggiunta di Elution Buffer.

4.4. Procedura di quantizzazione con Qubit© 2.0 Fluorometer

- Preparare una provetta da 0.5 ml per ogni campione, considerando anche i due standard e contrassegnarle con i codici relativi.
- Preparare la working solution diluendo il Qubit© dsDNA HS Reagent con il Qubit© dsDNA HS Buffer, con un fattore 1:200. Si può preparare una mix con 1 µl di Qubit© dsDNA HS Reagent e 199 di Qubit© dsDNA HS Buffer, moltiplicando per il numero di campioni.
- Aliquotare 190 µl di working solution nelle provette degli standard
- Aggiungere 10 µl di standard #1 e standard #2 nelle rispettive provette.
- Vortexare per 2-3 secondi, evitando la formazione di bolle.
- Aliquotare 198 µl di working solution nelle provette per i campioni.
- Aggiungere 2 µl di estratto.

- Vortexare per 2-3 secondi, evitando la formazione di bolle.
- Incubare a temperatura ambiente per 2 minuti.
- Procedere con la lettura dei campioni

4.5. Preparazione delle librerie

4.5.1. Amplificazione delle regioni di interesse

È stato acquistato un pannello di primers dalla ditta Invitrogen by ThermoFisher: *Ion AmpliSeq™ Pharmacogenomics Panel*. Si tratta di un singolo pool di primers utilizzato per eseguire la PCR multiplex in vista dell'allestimento di librerie a DNA. Permette di ottenere ampliconi nelle regioni di interesse di questo studio, ovvero permette di valutare SNPs, indel e CNV nei principali geni DME, cioè quelli coinvolti nel metabolismo dei farmaci. Permette di analizzare un totale di 136 SNPs e gli ampliconi hanno un'ampiezza media di 205 bp.

Procedura:

- Allestire la mix per la PCR con le quantità riportate nella tabella 4
- Mantenere 5X Ion AmpliSeq™ HiFi Mix in ghiaccio.

Tabella 4: Quantità della mix di PCR

5X Ion AmpliSeq™ HiFi	2 µl
Ion AmpliSeq™ Pharmacogenomics Panel	2 µl
DNA	X µl
Acqua nucleasi-free	Per arrivare a 10 µl
Volume totale	10 µl

La quantità di DNA è aggiunta in base alla concentrazione dell'estratto, in modo da ottimizzare le fasi successive. La quantità suggerita dal kit è di 1 ng (300 copie). Nella tabella 5 sono esplicitate le quantità di campione e di acqua che sono state aggiunte.

Tabella 5 Quantità di campione e di acqua aggiunti alla mix di PCR

Campione	Quantità di DNA	Quantità di acqua
PHG-A1	1 µl	5 µl
PHG-A2	1 µl	5 µl
PHG-A3	1 µl	5 µl
PHG-A4	6 µl	-
PHG-A5	2 µl	4 µl
PHG-A6	2 µl	4 µl
PHG-A7	1 µl	5 µl
PHG-A8	2 µl	4 µl
PHG-A9	2 µl	4 µl
PHG-A10	1 µl	5 µl
PHG-A11	1 µl	5 µl
PHG-A12	4 µl	2 µl
PHG-A13	1 µl	5 µl
PHG-A14	6 µl	-

Le provette vengono caricate sul *Veriti™ 96-Well Thermal Cycler* e impostate seguenti condizioni di amplificazione:

Tabella 6: Programma di amplificazione

Step	Temperatura	Tempo	Numero di cicli
Attivazione dell'enzima	99 °C	2 minuti	18
Denaturazione	99 °C	15 secondi	
Annealing ed estensione	60 °C	4 minuti	
	10 °C	∞	

4.5.2. Digestione parziale degli ampliconi

Con questo passaggio si va a digerire parzialmente le estremità degli ampliconi, presenti nelle provette, costituite dai primer forward e reverse che fiancheggiano la regione di interesse.

- Aggiungere 1 µl di FuPa reagent ad ogni campione, arrivando ad un volume totale di 11 µl.
- Vortexare e centrifugare
- Caricare le provette sul *Veriti™ 96-Well Thermal Cycler* con le seguenti condizioni:

Tabella 7 Condizioni per la reazione di digestione degli ampliconi

Temperatura	Tempo
50 °C	10 minuti
55°C	10 minuti
60°C	20 minuti
10°C	massimo un'ora

4.5.3. Ligazione dei barcode

È necessario legare un barcode diverso per ogni libreria, in modo da poter distinguere i campioni in fase di analisi.

- Diluizione dei barcode:

Tabella 8 Diluizione dei barcode

Ion P1 Adapter	1 µL
Ion Xpress™ Barcode X	1 µL
Acqua nucleasi-free	2 µL
Volume totale	4 µL

Dove X indica il codice del barcode scelto, per ogni campione.

- Reazione di ligasi: i reagenti vengono aggiunti alle librerie seguendo il preciso ordine indicato nella tabella seguente

Tabella 9 Mix per la reazione di ligasi

Ordine di aggiunta	Componente	Volume
1	Switch Solution	2 µL
2	Barcode diluito	1 µL
3	DNA ligasi	1 µL
	Volume totale	15 µL

- Le provette vengono caricate sul *Veriti™ 96-Well Thermal Cycler* con il seguente programma:

Tabella 10 Programma del termociclatore per reazione di ligasi

Temperatura	Tempo
22 °C	30 secondi
68 °C	5 minuti
72 °C	5 minuti
10 °C	Fino a 24 ore

4.5.4. Purificazione delle librerie

Con questo passaggio si eliminano tutti gli elementi contaminanti in eccesso derivanti dai passaggi precedenti. Viene fatto utilizzando una resina costituita da biglie magnetiche a cui si legano gli ampliconi ma non i contaminanti, che possono dunque essere allontanati.

- Trasferire i campioni in provette da 1.5 mL.
- Vortexare per qualche minuto *Agencourt™ AMPure™ XP Reagent* in modo da risospendere tutte le biglie.
- Aggiungere 22.5 µL di *Agencourt™ AMPure™ XP Reagent*, facendo attenzione che il colore del reagente nel puntale sia uniforme. In caso contrario risospendere vortexando per qualche secondo. È importante che sia uniforme anche nel campione, quindi spipettare 4-5 volte prima di rilasciare la resina.

- Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti.
- Nel frattempo preparare etanolo al 70%: 230 μL di etanolo e 100 μL di acqua nucleasi-free, per ogni campione.
- Terminati i 5 minuti, trasferire le provette in un rack magnetico.
- Incubare a temperatura ambiente per 3 minuti, o fino a che la soluzione non risulti limpida.
- Rimuovere e buttare il surnatante, senza toccare il pellet
- Aggiungere 150 μL di etanolo al 70%
- Ruotare le provette sul rack magnetico per 5-6 volte in modo da lavare le biglie magnetiche. Controllare che migrino correttamente.
- Rimuovere e buttare tutto il surnatante di etanolo.
- Ripetere il lavaggio con etanolo al 70% aggiungendo nuovamente 150 μL , ruotare le provette 5-6 volte e rimuovere il surnatante
- Centrifugare brevemente, posizionando la provetta in modo da avere il precipitato sulla parte esterna della centrifuga.
- Eliminare l'etanolo che si è depositato sul fondo
- Lasciare le provette aperte a temperatura ambiente per circa 2 minuti, o fino a che non sia evaporato tutto l'etanolo presente (la resina si diventa opaca e scompare il classico odore di etanolo). Questo è necessario per

eliminare tutto l'etanolo che interferisce con i passaggi successivi.
Evitare, però, di far seccare eccessivamente la resina.

4.5.5. Ulteriore amplificazione con Platinum™ PCR SuperMix HiFi

- Aggiungere 25 µL di Platinum™ PCR SuperMix HiFi, cercando di bagnare tutta la resina.
- Aggiungere 1 µL di Library Amplification Primer Mix.
- Vortexare e centrifugare
- Incubare a temperatura ambiente per 2 minuti, sul rack magnetico.
- Trasferire ogni campione in una provetta da 0.2 mL, senza pescare le biglie.
- Posizionare le provette sul *Veriti™ 96-Well Thermal Cycler* con il seguente programma:

Tabella 11 Programma di amplificazione con Platinum™ PCR SuperMix HiFi

Temperatura	Tempo	Cicli
98 °C	2 minuti	5
98 °C	15 secondi	
64 °C	1 minuto	
10 °C		

4.5.6. Ulteriore purificazione

Avendo effettuato un secondo passaggio di amplificazione, è necessaria una seconda purificazione delle librerie. In questo passaggio si utilizza

nuovamente la resina *Agencourt™ AMPure™ XP Reagent*. Consiste in due step di purificazione: il primo prevede un rapporto biglie/volume di campione di 0.5X. In questo modo il DNA ad alto peso molecolare si lega alle biglie mentre i primers in eccesso e gli ampliconi rimangono in soluzione. Viene recuperato il surnatante. Il secondo step, invece, è a un rapporto 1.2X biglie/volume di campione che permette agli ampliconi di rimanere adesi alle biglie, mentre i primer rimangono in soluzione. Dunque sarà eliminato il surnatante.

Primo step di purificazione:

- Trasferire i campioni in provette da 1.5 ml
- Aggiungere 12.5 μ L *Agencourt™ AMPure™ XP Reagent* con le stesse accortezze usate per la purificazione precedente.
- Incubare 5 minuti a temperatura ambiente.
- Trasferire le provette sul rack magnetico.
- Incubare 5 minuti a temperatura ambiente.
- Trasferire il surnatante in nuove provette da 1.5 ml

N.B. il surnatante contiene gli ampliconi, va conservato.

Secondo step di purificazione

- Aggiungere 30 μ L *Agencourt™ AMPure™ XP Reagent*

- Incubare 5 minuti a temperatura ambiente
- Nel frattempo preparare etanolo al 70%: 230 μL di etanolo e 100 μL di acqua nucleasi-free, per ogni campione.
- Trasferire sul rack magnetico e incubare 3 minuti a temperatura ambiente.
- Pescare e buttare il surnatante.
- Aggiungere 150 μL di etanolo al 70%.
- Ruotare le provette sul rack magnetico per 5-6 volte, controllando che le biglie migrino correttamente.
- Rimuovere e buttare tutto il surnatante di etanolo.
- Centrifugare brevemente, posizionando la provetta in modo da avere il precipitato sulla parte esterna della centrifuga.
- Eliminare l'etanolo che si è depositato sul fondo
- Lasciare le provette aperte a temperatura ambiente per circa 2 minuti, o fino a che non sia evaporato tutto l'etanolo residuo.
- Aggiungere 25 μL di TE in modo da risospendere le biglie del pellet e rimuoverle dal rack magnetico.
- Vortexare
- Incubare per 2 minuti a temperatura ambiente.

- Posizionare nuovamente le provette sul magnete e incubare 2 minuti a temperatura ambiente.
- Trasferire il surnatante in provette da 2 ml, senza toccare il precipitato.

Gli ampliconi sono stati risospesi nel TE.

4.5.7. Quantizzazione delle librerie con *Agilent 2200 TapeStation nucleic acids system*

- Porre 2 μ L di Buffer in provette da 0.2 ml codificate con i nomi dei campioni. Prepararne una anche per il *Genomic DNA Ladder*.
- Aggiungere 2 μ L di campione e di *Genomic DNA Ladder* nelle rispettive provette codificate.
- Vortexare per 1 minuto.
- Caricare i campioni e la *screentape* sullo strumento e avviare la corsa.

A questo punto, avendo la molarità delle librerie, è possibile calcolare il fattore di diluizione per portarle tutte a una concentrazione uniforme di 100 pM. Il fattore diluizione viene determinato dividendo per 100 la concentrazione molare ottenuta dal sistema TapeStation.

Le librerie possono essere conservate a 4-8 °C per circa un mese. Per tempi più lunghi vengono conservate a -20 °C.

Per procedere con il sequenziamento:

- unire le librerie dei diversi campioni in un'unica libreria combinata.
- Diluire la libreria combinata a 40 pM: 15 μ l di acqua e 10 μ l di libreria 100 pM.
- Caricare lo *Ion Chef™ Instrument* aggiungendo 25 μ l di libreria combinata nell'apposita posizione e tutti i consumabili necessari (figura31).

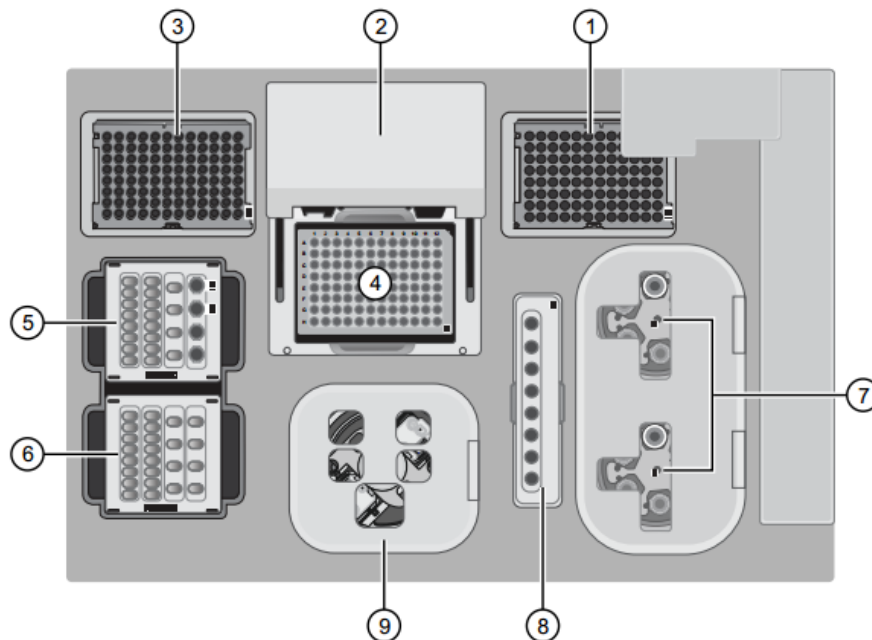


Figura 31 Posizioni dei consumabili necessari all' *Ion Chef™ Instrument*: 1- punte usate. 3- punte pulite. 4-piastra per PCR inserita in un termociclatore con relativo coperchio (2). 5 e 6 posizione per le cartucce dei reagenti, dove viene aggiunta la libreria. 7-centrifughe in cui inserire provette vuote. 8 cartuccia per l'arricchimento. 9- posizione per il chip.

Una volta terminato il lavoro di questo strumento spostare il chip nel *Ion Torrent S5™ System* e avviare la corsa.

Capitolo quinto

RISULTATI

5.1. Selezione dei target

Il pannello *Ion AmpliSeq™ Pharmacogenomics Panel* utilizzato per amplificare le regioni di interesse contiene 119 coppie di primers che permettono di analizzare 136 regioni polimorfiche. Per questo studio sono stati selezionati alcuni di questi polimorfismi, concentrando l'attenzione sui geni CYP e dunque sono state analizzate le varianti che definiscono gli allotipi di questi geni. I target sono riassunti nella tabella seguente.

Tabella 12: Sono indicate tutte le regioni analizzate. Nella prima colonna è indicato il gene, seguito dal cromosoma su cui mappa e la posizione sul genoma di riferimento hg19 (GRCh17), nella quarta colonna è riportato il numero ID di riferimento della variante e nell'ultima colonna è indicato il tipo di variazione.

GENE	CROMOSOMA	POSIZIONE SU hg19	ID	VARIAZIONE
CYP3A5	chr7	99250236	rs28365083	C > A
CYP3A5	chr7	99250393	rs41303343	InsT
CYP3A5	chr7	99258139	rs28383479	G > A
CYP3A5	chr7	99262835	rs10264272	G > A
CYP3A5	chr7	99270539	rs776746	A > G
CYP3A5	chr7	99273810	rs200579169 (28383469)	InsG
CYP3A5	chr7	99273815	rs28383468	C > T
CYP3A5	chr7	99273821	rs55817950	C > T
CYP3A4	chr7	99355806	rs67666821	insA
CYP3A4	chr7	99358524	rs4986910	T > C
CYP3A4	chr7	99359670	rs4986909	C > T
CYP3A4	chr7	99359800	rs12721629	C > T
CYP3A4	chr7	99364034	rs4646438	insA
CYP3A4	chr7	99365983	rs55785340	T > C
CYP3A4	chr7	99366081	rs4987161	T > C
CYP3A4	chr7	99366316	rs35599367	C > T
CYP3A4	chr7	99367427	rs4986907	G > A
CYP3A4	chr7	99382096	rs2740574	A > G

CYP2C19	chr10	96521657	rs12248560	C > T
CYP2C19	chr10	96522463	rs28399504	A > G
CYP2C19	chr10	96534922	rs17878459	G > C
CYP2C19	chr10	96535173	rs41291556	T > C
CYP2C19	chr10	96535210	rs72552267	G > A
CYP2C19	chr10	96535246	rs17884712	G > A
CYP2C19	chr10	96540410	rs4986893	G > A
CYP2C19	chr10	96541615	rs6413438	C > T
CYP2C19	chr10	96541616	rs4244285	G > A
CYP2C19	chr10	96541756	rs72558186	T > A
CYP2C19	chr10	96612495	rs56337013	C > T
CYP2C9	chr10	96698494	rs67807361	C > A
CYP2C9	chr10	96701715	rs72558187	T > C
CYP2C9	chr10	96702047	rs1799853	C > T
CYP2C9	chr10	96702066	rs7900194	G > T
CYP2C9	chr10	96702066	rs7900194	G > A
CYP2C9	chr10	96707539	rs72558190	C > A
CYP2C9	chr10	96708974	rs2256871	A > G
CYP2C9	chr10	96709037	rs9332130	A > G
CYP2C9	chr10	96709040	rs9332131	DelA
CYP2C9	chr10	96731936	rs72558192	T > C
CYP2C9	chr10	96740981	rs28371685	C > T
CYP2C9	chr10	96741053	rs1057910	A > C
CYP2C9	chr10	96741054	rs56165452	T > C
CYP2C9	chr10	96741058	rs28371686	C > G
CYP2C8	chr10	96798749	rs10509681	A > G
CYP2C8	chr10	96818106	rs11572103	A > T
CYP1A2	chr15	75038220	rs2069514	G > A
CYP1A2	chr15	75039613	rs35694136	DelT
CYP1A2	chr15	75041341	rs2069526	T > G
CYP1A2	chr15	75041351	rs12720461	C > T
CYP1A2	chr15	75041917	rs762551	C > A
CYP1A2	chr15	75042204	rs72547511	C > G
CYP1A2	chr15	75042637	rs72547513	C > A
CYP1A2	chr15	75044195	rs56276455	G > A
CYP1A2	chr15	75044552	rs72547515	G > A
CYP1A2	chr15	75044578	rs72547516	A > T
CYP1A2	chr15	75045575	rs55889066	G > A
CYP1A2	chr15	75045612	rs56107638	G > A
CYP1A2	chr15	75047169	rs28399424	C > T
CYP1A2	chr15	75047245	rs72547517	G > A
CYP1A2	chr15	75047426	rs2470890	T > C
CYP2B6	chr19	41497129	rs34223104	T > C
CYP2B6	chr19	41497274	rs8192709	C > T
CYP2B6	chr19	41497346	rs35303484	A > G
CYP2B6	chr19	41512841	rs3745274	G > T
CYP2B6	chr19	41515263	rs2279343	A > G
CYP2B6	chr19	41518221	rs28399499	T > C
CYP2B6	chr19	41518370	rs34097093	C > T

CYP2B6	chr19	41522715	rs3211371	C > T
CYP2D6	chr22	42522613	rs1135840	G > C
CYP2D6	chr22	42523610	rs59421388	G > A
CYP2D6	chr22	42523805	rs28371725	G > A
CYP2D6	chr22	42523858	rs5030867	A > C
CYP2D6	chr22	42523943	rs16947	C > T
CYP2D6	chr22	42524180	rs5030656	DelAAG
CYP2D6	chr22	42524244	rs35742686	DelA
CYP2D6	chr22	42524817	rs72549354	InsG
CYP2D6	chr22	42524947	rs3892097	G > A
CYP2D6	chr22	42525035	rs5030865	G > T
CYP2D6	chr22	42525035	rs5030865	G > A
CYP2D6	chr22	42525086	rs5030655	DelT
CYP2D6	chr22	42525132	rs1058164	G > C
CYP2D6	chr22	42525134	rs61736512	G > A
CYP2D6	chr22	42525772	rs28371706	C > T
CYP2D6	chr22	42525912	rs201377835	G > C
CYP2D6	chr22	42526657	rs72549357 (774671100)	InsT
CYP2D6	chr22	42526670	rs5030862	G > A
CYP2D6	chr22	42526694	rs1065852	C > T
CYP2D6	chr22	42526763	rs769258	G > A
CYP2D6	chr22	42528382	rs1080985	C > G

1.7. Risultati della quantizzazione delle librerie

Tramite *Agilent 2200 TapeStation nucleic acids system* è stato effettuato un controllo di qualità per verificare che gli ampliconi avessero una taglia intorno alla media attesa di 205 bp ed è stata fatta una quantizzazione in termini di molarità in modo da poter calcolare il fattore di diluizione per ottenere le librerie ad una concentrazione di 100 pM. Nelle immagini seguenti viene riportato il risultato delle corse di ogni campione, nello specifico sono presenti: una rappresentazione del gel elettroforetico, un grafico in cui viene riportata la regione di ampiezza degli ampliconi, determinata dallo strumento

sulla base dei due standard e una tabella che riassume i valori della taglia, della concentrazione in pg/μl e la molarità.

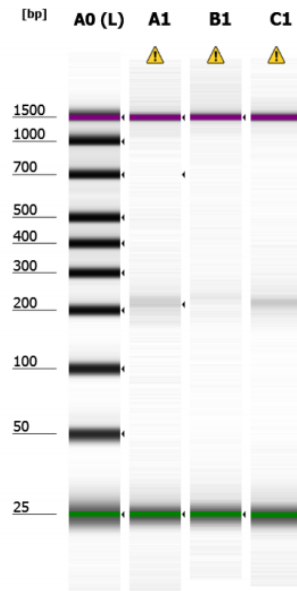
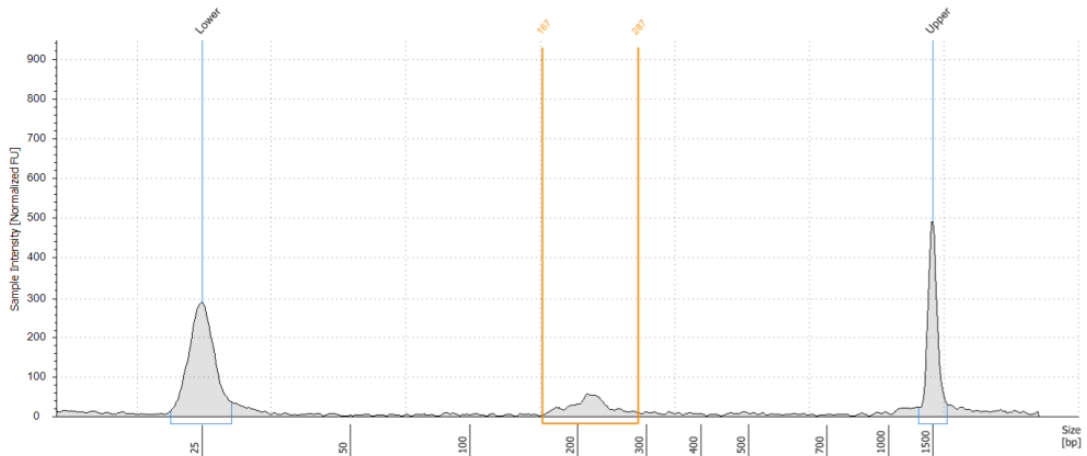


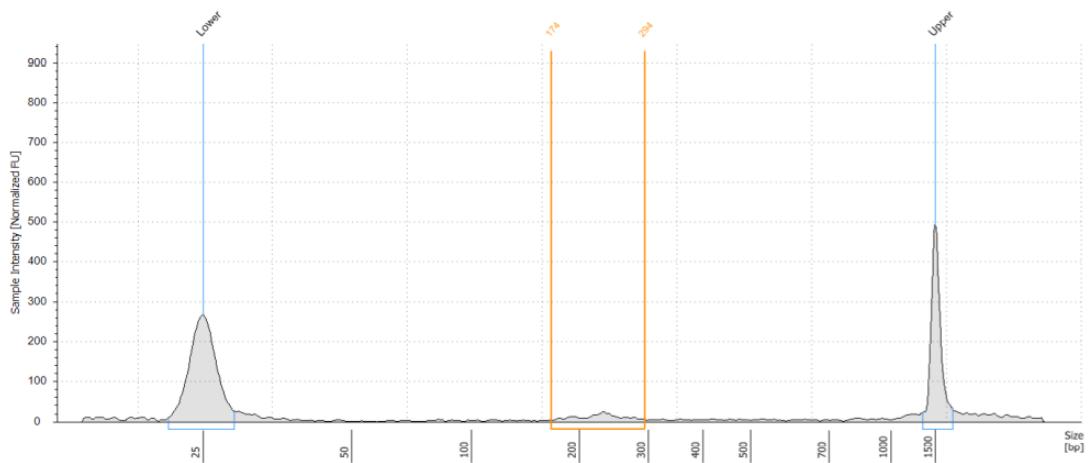
Figura 32 Risultati dell'analisi con Agilent TapeStation™ System. Rappresentazione del gel elettroforetico per i campioni PHG-A1 (A1), PHG-A2 (B1), PHG-A3 (C1). A0(L) corrisponde al ladder.



Region Table

From [bp]	To [bp]	Average Size [bp]	Conc. [pg/μl]	Region Molarity [μmol/l]	% of Total	Region Comment	Color
167	287	220	99.6	797	34.66		■

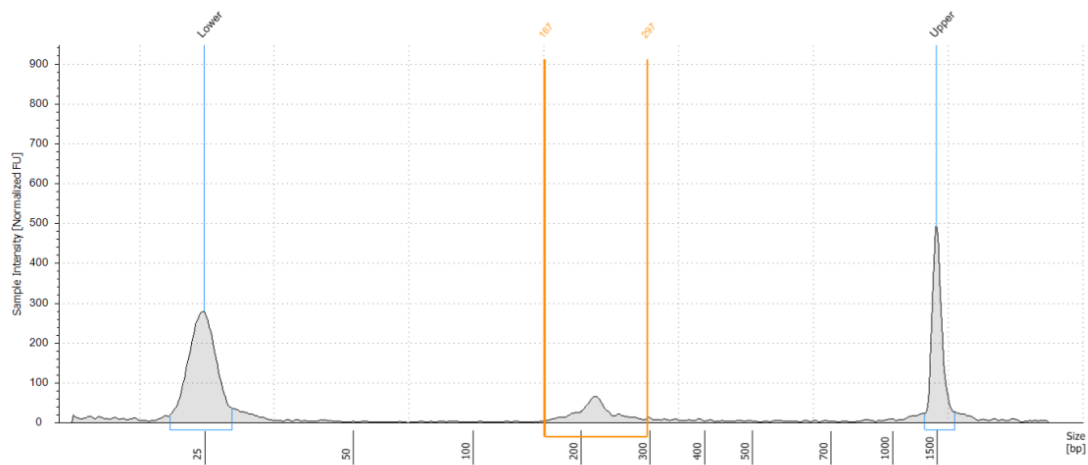
Figura 33 Risultati dell'analisi con TapeStatio System™ del campione PHG-A1



Region Table

From [bp]	To [bp]	Average Size [bp]	Conc. [pg/ μ l]	Region Molarity [pmol/l]	% of Total	Region Comment	Color
174	294	232	45.0	356	19.47		■

Figura 34 Risultati dell'analisi con TapeStatio System™ del campione PHG-A2



Region Table

From [bp]	To [bp]	Average Size [bp]	Conc. [pg/ μ l]	Region Molarity [pmol/l]	% of Total	Region Comment	Color
167	297	224	97.0	753	41.95		■

Figura 35 Risultati dell'analisi con TapeStatio System™ del campione PHG-A3

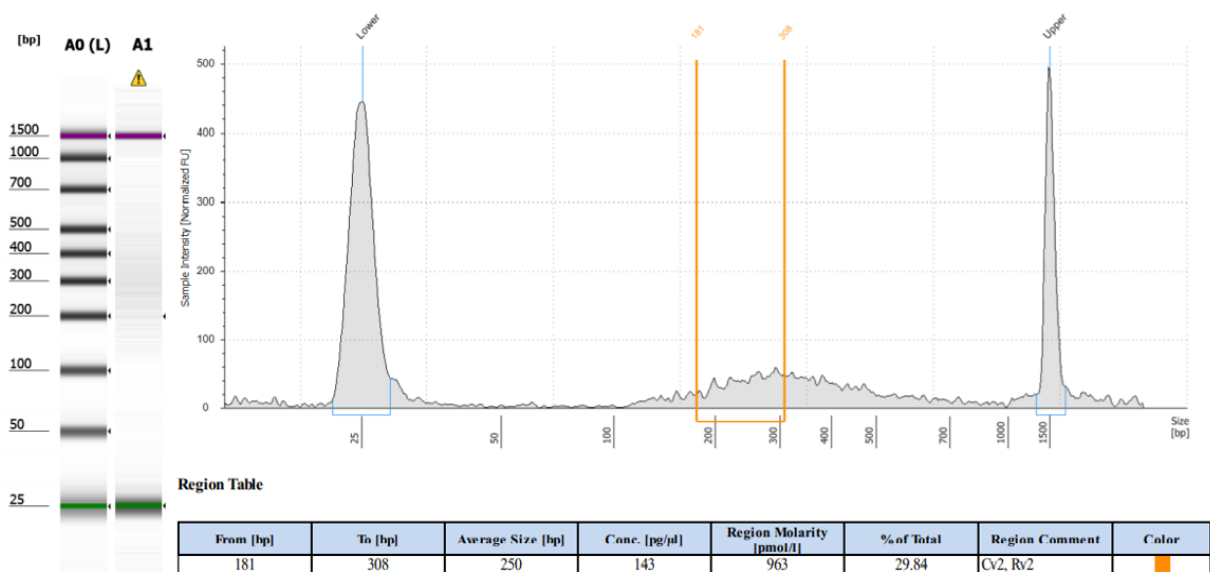


Figura 36 Risultati dell'analisi con Tape Station™ System per il campione PHG-A4. A sinistra è riportata una rappresentazione del gel, sulla destra il grafico con la distribuzione dell'ampiezza degli ampliconi e in basso la tabella riassuntiva con i valori numerici.

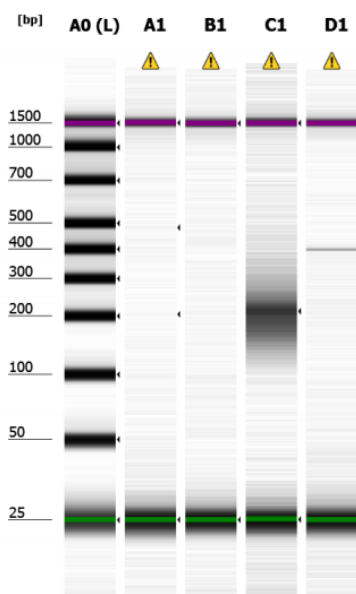
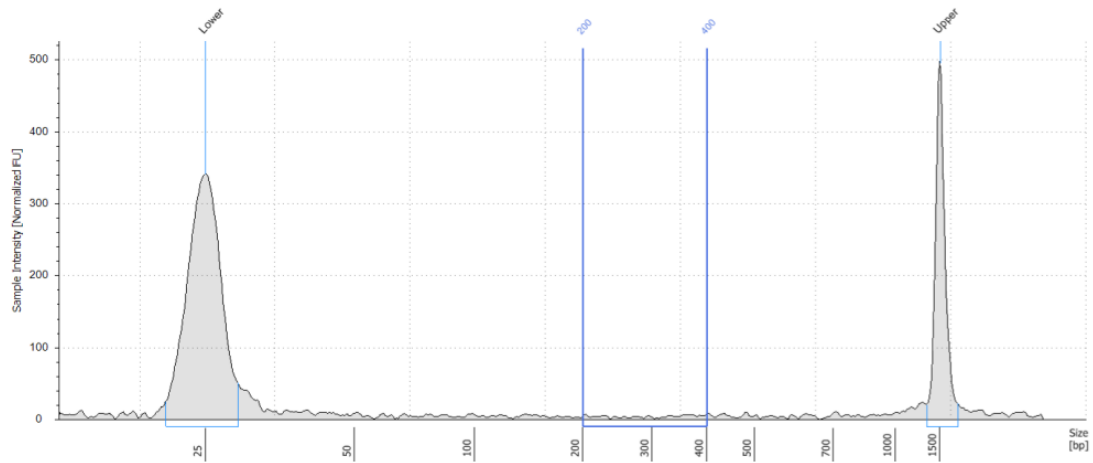


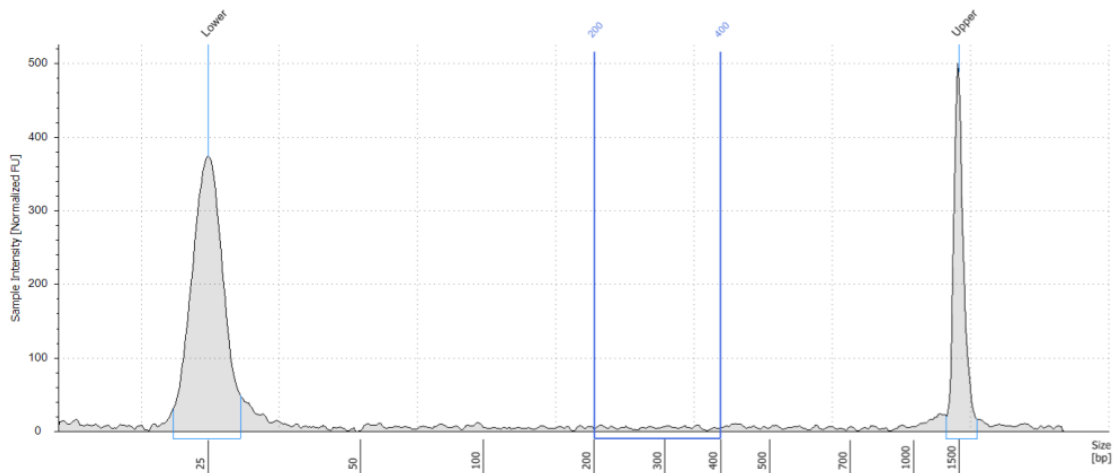
Figura 37 Risultati dell'analisi con Agilent TapeStation™ System. Rappresentazione del gel elettroforetico per i campioni PHG-A5 (A1), PHG-A6 (B1), PHG-A12 (C1), PHG-A14 (D1). A0(L) corrisponde al ladder.



Region Table

From [bp]	To [bp]	Average Size [bp]	Conc. [pg/ μ l]	Region Molarity [pmol/l]	% of Total	Region Comment	Color
200	400	305	16.0	113	6.52	Cv2, Rv2	■

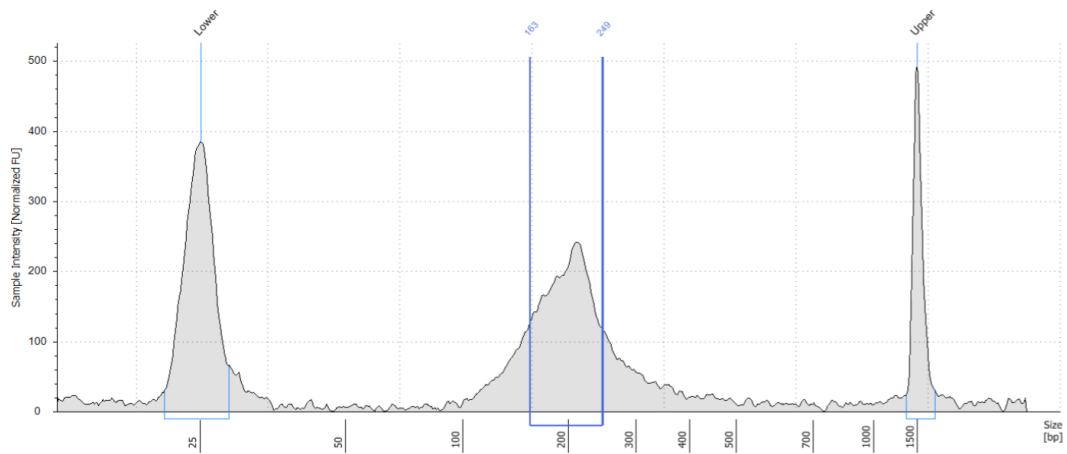
Figura 38 Risultati dell'analisi con TapeStation System™ del campione PHG-A5



Region Table

From [bp]	To [bp]	Average Size [bp]	Conc. [pg/ μ l]	Region Molarity [pmol/l]	% of Total	Region Comment	Color
200	400	291	19.0	146	8.06	Cv2, Rv2	■

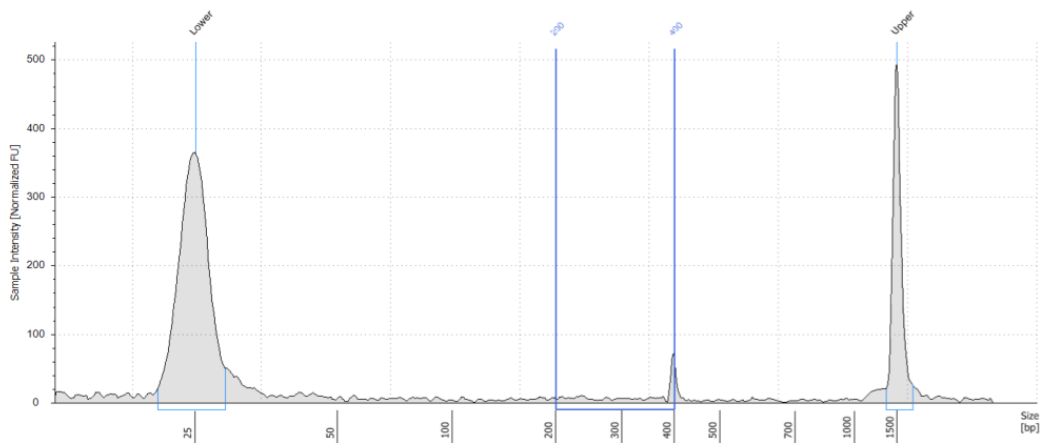
Figura 39 Risultati dell'analisi con TapeStation System™ del campione PHG-A6



Region Table

From [bp]	To [bp]	Average Size [bp]	Conc. [pg/ul]	Region Molarity [pmol/l]	% of Total	Region Comment	Color
163	249	203	587	4560	45.02		■

Figura 40 Risultati dell'analisi con TapeStatio System™ del campione PHG-A12



Region Table

From [bp]	To [bp]	Average Size [bp]	Conc. [pg/ul]	Region Molarity [pmol/l]	% of Total	Region Comment	Color
200	400	323	22.4	271	13.90	Cv2, Rv2	■

Figura 41 Risultati dell'analisi con TapeStatio System™ del campione PHG-A14

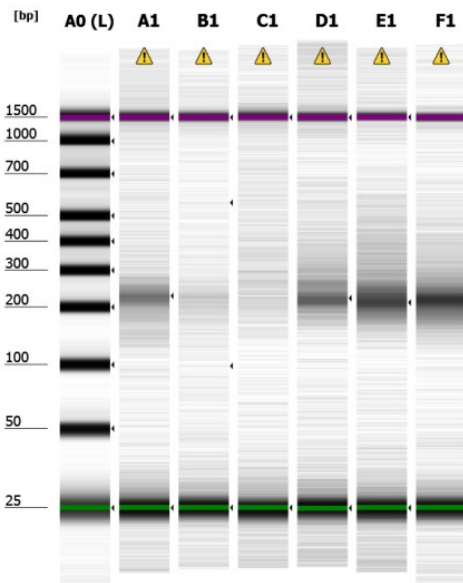
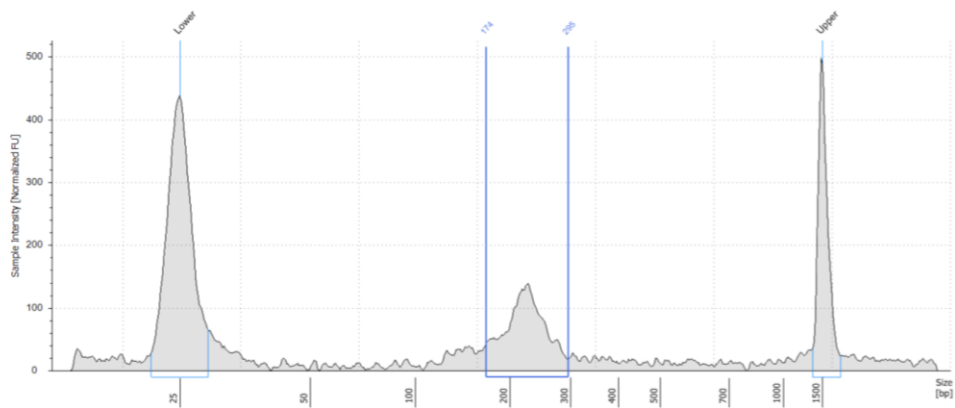


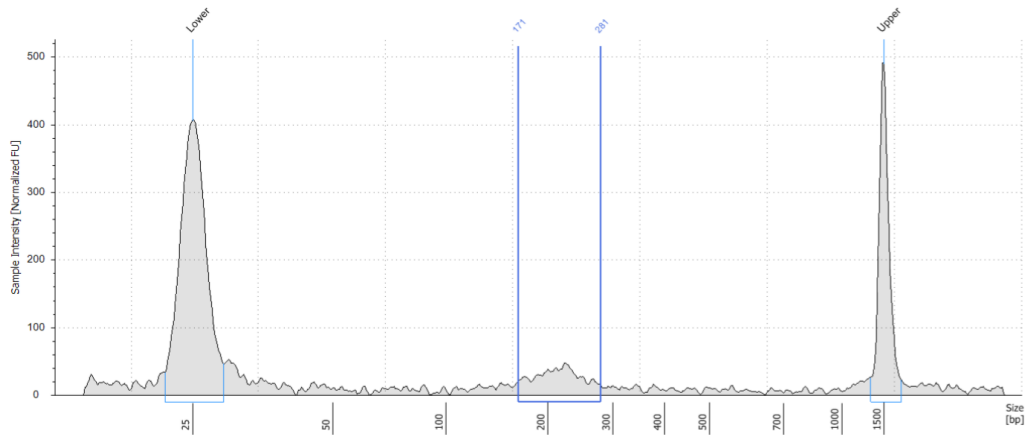
Figura 42 Risultati dell'analisi con Agilent TapeStation™ System. Rappresentazione del gel elettroforetico per i campioni PHG-A7 (A1), PHG-A8 (B1), PHG-A9 (C1), PHG-A10 (D1), PHG-A11 (E1), PHG-A13 (F1). A0(L) corrisponde al ladder.



Region Table

From [bp]	To [bp]	Average Size [bp]	Conc. [pg/ul]	Region Molarity [pmol/l]	% of Total	Region Comment	Color
174	295	227	266	1870	37.25	Cv2, Rv2	■

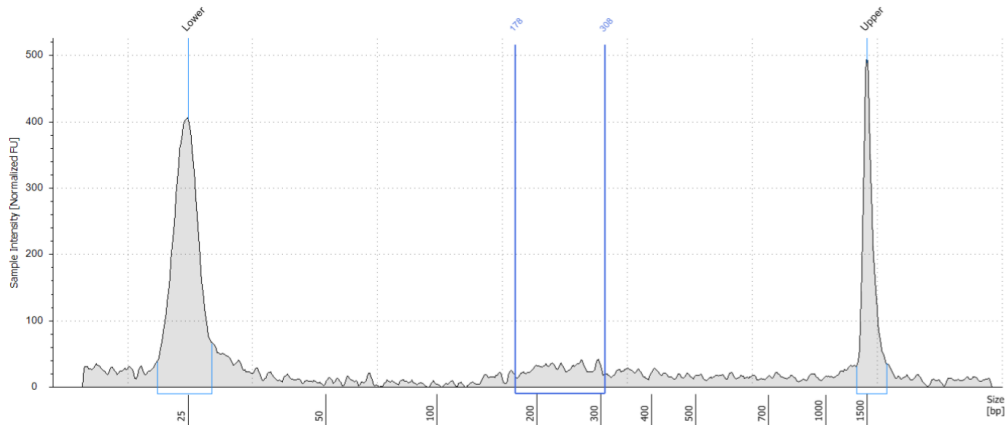
Figura 43 Risultati dell'analisi con TapeStatio System™ del campione PHG-A7



Region Table

From [bp]	To [bp]	Average Size [bp]	Conc. [pg/ μ l]	Region Molarity [μ mol/l]	% of Total	Region Comment	Color
171	281	220	102	762	23.08	Cv2, Rv2	■

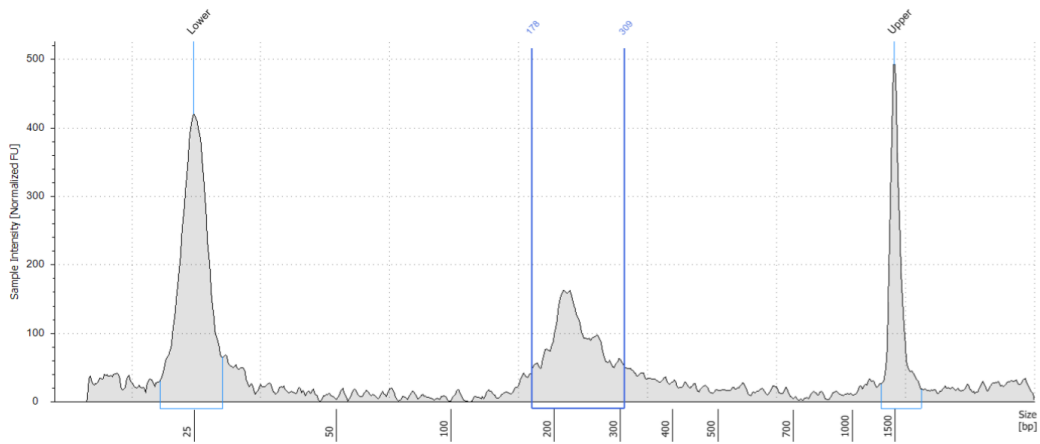
Figura 44 Risultati dell'analisi con TapeStation System™ del campione PHG-A8



Region Table

From [bp]	To [bp]	Average Size [bp]	Conc. [pg/ μ l]	Region Molarity [μ mol/l]	% of Total	Region Comment	Color
178	308	241	106	730	18.91	Cv2, Rv2	■

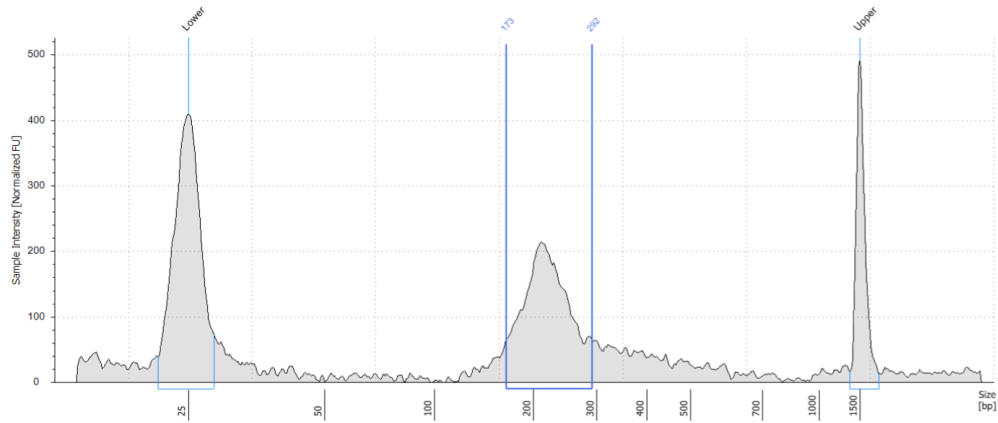
Figura 45 Risultati dell'analisi con TapeStation System™ del campione PHG-A9



Region Table

From [bp]	To [bp]	Average Size [bp]	Conc. [pg/ul]	Region Molarity [pmol/l]	% of Total	Region Comment	Color
178	309	236	348	2380	40.19	Cv2, Rv2	■

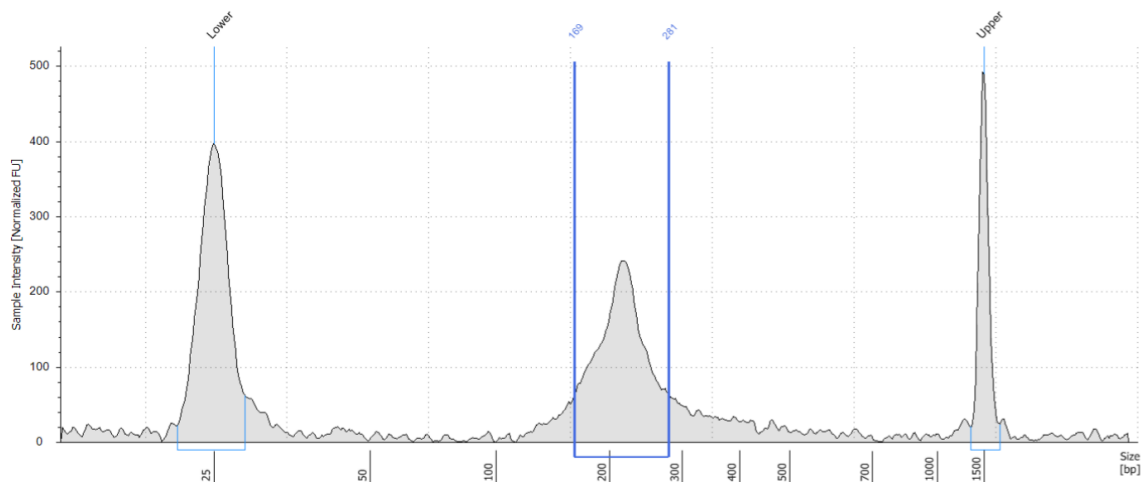
Figura 46 Risultati dell'analisi con TapeStation System™ del campione PHG-A10



Region Table

From [bp]	To [bp]	Average Size [bp]	Conc. [pg/ul]	Region Molarity [pmol/l]	% of Total	Region Comment	Color
173	292	224	547	3890	45.23	Cv2, Rv2	■

Figura 47 Risultati dell'analisi con TapeStation System™ del campione PHG-A11



Region Table

From [bp]	To [bp]	Average Size [bp]	Conc. [pg/ μ l]	Region Molarity [μ mol/l]	% of Total	Region Comment	Color
169	281	219	558	4050	52.54	Cv2, Rv2	

Figura 48 Risultati dell'analisi con TapeStation System™ del campione PHG-A13

Da questi risultati si nota che i campioni PHG-A5, PHG-A6, PHG-A14 non mostrano alcun picco evidente e dunque la molarità è molto bassa. Si è deciso di procedere ugualmente al sequenziamento di questi campioni, senza diluirli. Per tutti gli altri il controllo di qualità conferma un picco che comprende la dimensione di 205 bp, ovvero la dimensione media stimata in base alla lunghezza media degli inserti sommata ad una media di 80 bp degli adattatori aggiunti e parzialmente digeriti durante la preparazione delle librerie.

Nella tabella seguente sono riassunti i risultati ottenuti. Nella prima colonna è indicato il codice del campione, seguito dal codice del barcode utilizzato nella fase di preparazione delle librerie, nella terza colonna è indicata la molarità, nella quinta colonna il fattore di diluizione calcolato e nelle ultime due

colonne sono indicate le quantità di campione e buffer TE utilizzati per la diluizione.

Tabella 13: Risultati della quantizzazione con Agilent 2200 TapeStation System.

Sample	Barcode	Molarità	Fattore di diluizione	ul campione	ul TE
PHG-A1	IonXpress_020	797	7,97	5	34,9
PHG-A2	IonXpress_021	356	3,56	5	12,8
PHG-A3	IonXpress_022	753	7,54	5	32,65
PHG A4	IonXpress_007	963	9,63	5	43,15
PHG A5	IonXpress_008		no dil	no dil	no dil
PHG A6	IonXpress_009		no dil	no dil	no dil
PHG A7	IonXpress_001	1870	18,7	5	88,5
PHG A8	IonXpress_002	762	no dil	no dil	no dil
PHG A9	IonXpress_003	730	7,30	5	31,5
PHG A10	IonXpress_004	2380	23,8	5	114,0
PHG A11	IonXpress_005	3890	38,9	5	189,5
PHG A12	IonXpress_0010	4560	45,6	5	223,0
PHGA13	IonXpress_006	4050	40,5	5	197,5
PHG A14	IonXpress_0011		no dil	no dil	no dil

1.8. Risultati del sequenziamento

I campioni sono stati sequenziati con due corse differenti e poi analizzati tramite il *Torrent Suite™ Software 5.10*. Di seguito si riportano i principali risultati osservabili dai report delle corse.

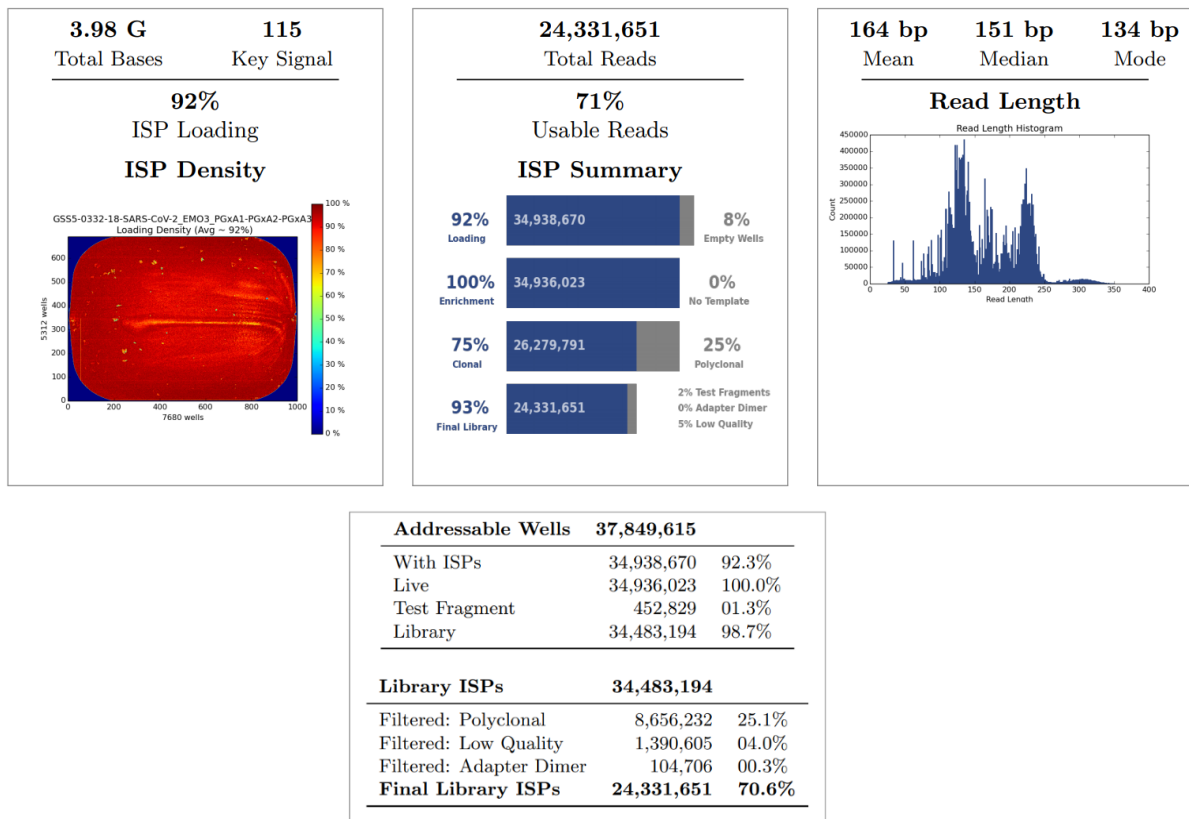


Figura 49 Summary Report della corsa di sequenziamento per i campioni PHG-A1, PHG-A2, PHG-A3

Nella figura a sinistra si può apprezzare l'efficienza di caricamento del Chip che risulta essere del 92%, graficamente le aree rosse sono indice di elevata densità di caricamento, mentre le aree gialle di un caricamento più scarso e quelle blu, assenti in questo caso, indicherebbero aree con mancato caricamento. Il totale delle basi sequenziate è 3,98 Gb. Nel riquadro centrale viene riportato il totale delle Reads: 34,938,670. Di queste è utilizzabile il 71%. Infatti dal totale di circa 34 milioni di reads l'analisi elimina le reads policlonali, che costituiscono il 25 % delle totali, le reads derivanti dai dimeri degli adattatori e le reads di bassa qualità. Nel riquadro in basso sono indicate le percentuali e i valori numerici delle reads filtrate. Nell'istogramma sulla

destra, invece, viene rappresentata la distribuzione della lunghezza delle reads, vediamo che la media è 164 bp, la moda 134 bp e la mediana 151 bp. Il dato è compatibile con l'ampiezza attesa delle regioni di interesse.

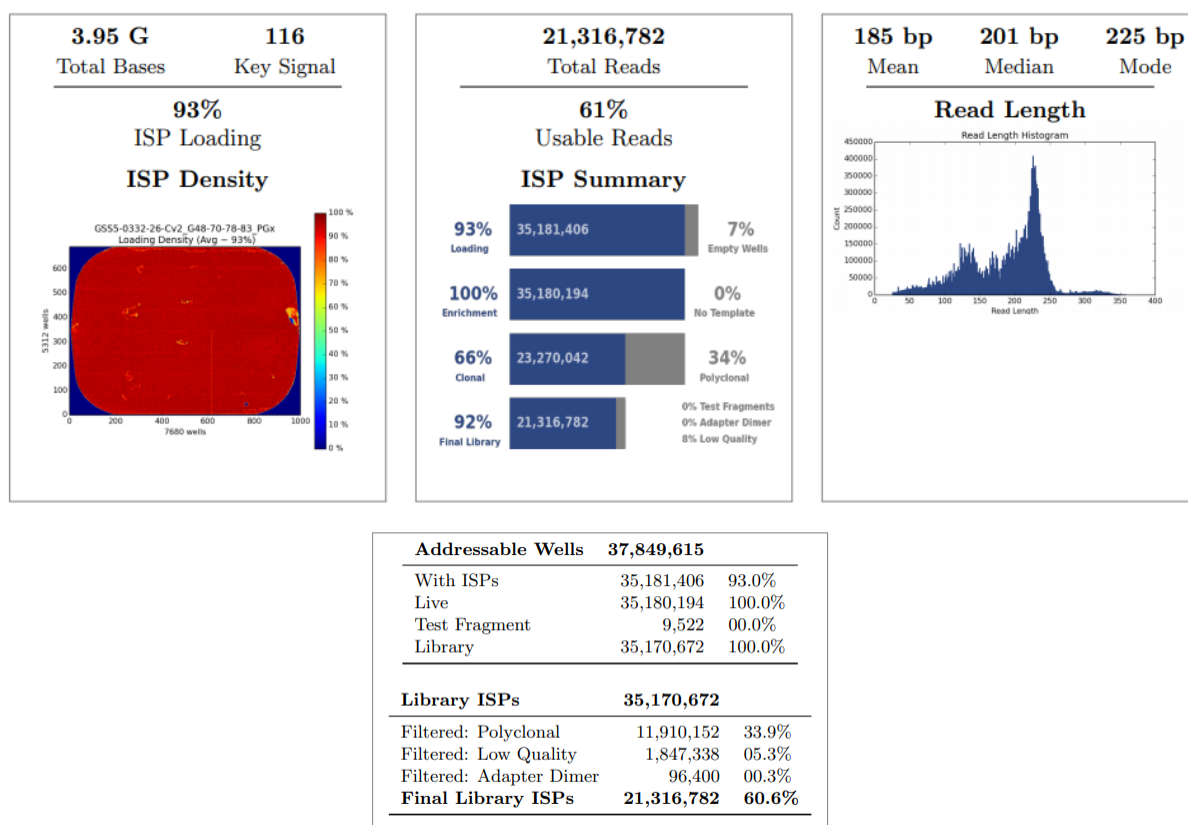


Figura 50 Summary Report della corsa di sequenziamento per i campioni PHG-A4, PHG-A5, PHG-A6, PHG-A7, PHG-A8, PHG-A9, PHG-A10, PHG-A11, PHG-A12, PHG-A13, PHG-A14

Per questa seconda corsa il totale delle basi sequenziate è 3.95 Gb. La percentuale di caricamento è del 93 %. Il totale delle reads è 35,181,406 di cui il 61% è utilizzabile. In questo caso le ISPs policlonali sono circa il 34 % delle totali. La distribuzione della lunghezza delle reads, al contrario della prima corsa, rispetta quella attesa infatti la media è di 185 bp, la moda 225 bp e la mediana 201 bp.

Analisi del coverage

Successivamente è stata fatta l'analisi del coverage. Nello specifico vengono riportati nella tabella 14 i risultati complessivi di tutti i campioni. Sono indicati quattro parametri: Mapped Reads, che indica il numero di reads che mappano all'interno del genoma di riferimento, in questo caso l'hg19; il valore On Target, indice del numero di reads che corrispondono al target di interesse; Mean Depth rappresenta il coverage medio di tutti gli ampliconi; infine l'Uniformity

Tabella 14: Risultati del sequenziamento

Sample Name	Mapped Reads	On Target	Mean Depth	Uniformity
PHG_A1	5239988	81.76%	34938	100.00%
PHG_A2	2486060	79.64%	16401	95.23%
PHG_A3	5101459	80.35%	33634	100.00%
PHG_A7	377734	66.26%	2097	99.38%
PHG_A8	2161264	53.13%	9530	99.38%
PHG_A9	85579	32.62%	234.0	99.38%
PHG_A10	537444	75.45%	3360	99.38%
PHG_A11	303430	64.75%	1605	98.64%
PHG_A13	330073	58.81%	1585	99.38%
PHG_A4	1270	5.91%	0.641	93.23%
PHG_A5	177	6.21%	0.099	98.21%
PHG_A6	158959	77.94%	1064	98.20%
PHG_A12	334620	33.43%	884.8	99.70%
PHG_A14	183946	84.60%	1282	98.87%

I campioni PHG-A4 e PHG-A5 hanno riportato un valore estremamente basso di reads mappate sul genoma di riferimento, di cui una bassa percentuale

mappa sulla regione target e con conseguente basso coverage. Di conseguenza l'analisi di questi due campioni non è stata portata alle fasi successive, per mancanza della chiamata delle basi nel sequenziamento.

Chiamata delle varianti

Il plugin *Variant Caller* presente nel *Torrent Suite™ Software 5.10* è in grado di identificare le varianti rispetto ad un genoma di riferimento, in questo caso l'hg19. L'operazione di chiamata delle varianti può includere tutte quelle riscontrate rispetto al riferimento oppure solo alcune presenti in un sottoinsieme di regioni, che per questo studio sono state indicate in un file hotspot fornito al plugin. Nelle immagini 51 e 52 sono presenti i risultati di questo plugin per ogni campione con il numero di varianti totali e il numero di varianti riscontrate nelle regioni di interesse, presenti nell'hotspot.

Library type: AmpliSeq
 Reference genome: hg19
 Targeted regions: PGx.20150728.designed
 Hotspot regions: PGx.20180131.hotspots
 Configuration: Generic - S5/S5XL (510/520/530) - Germ Line - Low Stringency
 Output directory: variantCaller_out.245
 Download all barcodes:
 Please note: Variant calling was carried out for all barcodes with reference genome as specified above

Barcode Name	Sample	Variants	Hotspot Variants	Downloads
lonXpress_020	PGxA1	42	30	<input type="button" value="VCF.GZ"/> <input type="button" value="VCF.GZ.TBI"/> <input type="button" value="XLS"/>
lonXpress_021	PGxA2	48	33	<input type="button" value="VCF.GZ"/> <input type="button" value="VCF.GZ.TBI"/> <input type="button" value="XLS"/>
lonXpress_022	PGxA3	55	37	<input type="button" value="VCF.GZ"/> <input type="button" value="VCF.GZ.TBI"/> <input type="button" value="XLS"/>

Figura 51 Summary results del plugin VariantCaller per i campioni PHG-A1, PHG-A2, PHG-A3

Library type: AmpliSeq
 Reference genome: hg19
 Targeted regions: PGx.20150728.designed
 Hotspot regions: PGx.20180131.hotspots
 Configuration: Generic - S5/S5XL (510/520/530) - Germ Line - Low Stringency
 Output directory: variantCaller_out.256
 Download all barcodes:
 Please note: Variant calling was carried out for all barcodes with reference genome as specified above

Barcode Name	Sample	Variants	Hotspot Variants	Downloads
lonXpress_001	PHG_A7	41	25	<input type="button" value="VCF.GZ"/> <input type="button" value="VCF.GZ.TBI"/> <input type="button" value="XLS"/>
lonXpress_002	PHG_A8	28	21	<input type="button" value="VCF.GZ"/> <input type="button" value="VCF.GZ.TBI"/> <input type="button" value="XLS"/>
lonXpress_003	PHG_A9	46	31	<input type="button" value="VCF.GZ"/> <input type="button" value="VCF.GZ.TBI"/> <input type="button" value="XLS"/>
lonXpress_004	PHG_A10	46	31	<input type="button" value="VCF.GZ"/> <input type="button" value="VCF.GZ.TBI"/> <input type="button" value="XLS"/>
lonXpress_005	PHG_A11	43	30	<input type="button" value="VCF.GZ"/> <input type="button" value="VCF.GZ.TBI"/> <input type="button" value="XLS"/>
lonXpress_006	PHG_A13	52	35	<input type="button" value="VCF.GZ"/> <input type="button" value="VCF.GZ.TBI"/> <input type="button" value="XLS"/>
lonXpress_007	PHG_A4	0	0	<input type="button" value="VCF.GZ"/> <input type="button" value="VCF.GZ.TBI"/> <input type="button" value="XLS"/>
lonXpress_008	PHG_A5	0	0	<input type="button" value="VCF.GZ"/> <input type="button" value="VCF.GZ.TBI"/> <input type="button" value="XLS"/>
lonXpress_009	PHG_A6	50	36	<input type="button" value="VCF.GZ"/> <input type="button" value="VCF.GZ.TBI"/> <input type="button" value="XLS"/>
lonXpress_010	PHG_A12	40	25	<input type="button" value="VCF.GZ"/> <input type="button" value="VCF.GZ.TBI"/> <input type="button" value="XLS"/>
lonXpress_011	PHG_A14	56	38	<input type="button" value="VCF.GZ"/> <input type="button" value="VCF.GZ.TBI"/> <input type="button" value="XLS"/>

Figura 52 Summary results del plugin VariantCaller per i campioni PHG-A4, PHG-A5, PHG-A6, PHG-A7, PHG-A8, PHG-A9, PHG-A10, PHG-A11, PHG-A12, PHG-A13, PHG-A14

Plugin PGxAnalysis

Questo strumento permette di analizzare i dati di sequenziamento ottenuti con il pannello *Ion AmpliSeq™ Pharmacogenomics Panel*. Il risultato che si ottiene è un file in estensione .csv che raccoglie le informazioni fornite dai plugin *VariantCaller* e *CoverageAnalysis*, specifici per i geni di interesse farmacologico e che verrà utilizzato nello step successivo.

1.9. Determinazione degli aplotipi

In questa fase d'analisi è stato utilizzato *Allele Typer™ Software*, uno strumento molto utile per facilitare la traduzione del genotipo di ogni campione nei rispettivi diplotipi di ogni gene CYP, con la specifica nomenclatura star. Per fare questo, il software richiede due file di input: una *Monoallelic Translator Table* e il file di esportazione del plugin PGx Analysis. Il primo file è una tabella monoallelica in cui sono riportati i pattern genetici di tutti gli aplotipi di interesse, con la specifica nomenclatura. È importante che questa tabella sia costruita rispettando la sintassi indicata nella guida del software [75]. Nello specifico deve essere presente un header con alcune informazioni come l'operatore che ha creato il file, la data, il nome del file etc. Subito sotto l'header, separato da una riga contenente quattro cancelletti (####), va posto il corpo vero e proprio del file indicando il nome del gene nella prima colonna e il nome dell'aplotipo nella seconda. Sulle

righe, invece, viene indicato l'ID di tutte le regioni polimorfiche di interesse per poi procedere a riempire tutte le celle del foglio di lavoro con i pattern genetici che descrivono ogni aplotipo. È possibile creare un singolo file per diversi geni. Un esempio di questo file è riportato nella figura 53. Le informazioni su cui ci si è basati per poter completare i pattern genetici di tutti i geni studiati sono state ricavate da tabelle definite "Allele Definition Table" fornite da PharmGKB, nelle specifiche sezioni dedicate ad ogni singolo gene. Il software converte la tabella Monoallelica in una tabella Biallelica e successivamente abbina i pattern genetici della tabella di traduzione, con quelli dei campioni derivanti dal file di sequenziamento. In questo modo restituisce come risultato il diplotipo di ogni campione, per ogni gene presente nel traduttore. Grazie all'importante contributo delle piattaforme PharmVar e PharmGKB è stato possibile svolgere un'attribuzione manuale degli aplotipi, parallelamente a quella ottenuta con Allele Typer. Ovvero è stato messo in atto lo stesso procedimento utilizzato dal tool informatico: si è andati a guardare per ogni campione e per ogni gene quali fossero le varianti presenti, diverse da quelle di riferimento. Successivamente si valutava quali aplotipi definissero le varianti presenti e considerandole nell'insieme, a seconda dell'omozigosi o eterozigosi, si è cercato di assegnare un diplotipo. Confrontando i risultati manuali con quelli bioinformatici si è constatata una

quasi totale concordanza, ad eccezione di tre soli casi, tutti sul gene CYP26: per il campione PHG-A10 dall'analisi manuale risultava *1/*4 mentre il software indicava *2A/*4; per il campione PHG-A11 l'analisi manuale aveva portato al diplotipo *1/*2, Allele Typer suggeriva *2A/*2A; il campione PHG-A13 era indicato come *1/*4 dalla ricerca manuale e *2A/*4 da quella informatica. In questo modo è stato possibile verificare la presenza di errori umani nella determinazione manuale, dovuti alla grande mole di dati da maneggiare e ciò avvalorava l'importanza dell'utilizzo dell' Allele Typer™ Software nelle analisi farmacogenomiche.

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R
1 *** Name	Ion PGx panel biallelic translator																
2 *** Version	v1																
3 *** Creator	Sara Petti																
4 *** Creation Date	09-giu-21																
5 *** Last Modified	Operator																
6 *** Last Modified Date	10-giu-21																
7 *** Description	Translator file to be used with the Ion PGx plugin results																
8 ***HD	Thermo Fisher Scientific																
9 ***FT	2021																
10																	
11																	
12																	
13																	
14	#####																
15	CP2C9	rs67807361	rs72558187	rs1799853	rs7900194A	rs7900194A	rs72558190	rs2256871	rs9532130	rs9532131	rs72558192	rs28371685	rs1057910	rs56165452	rs28371686	rs12248560	rs28399504
16	CP2C9	C	T	C	G	G	C	A	A	A	A	C	A	T	C		
17	CP2C9	C	T	C	G	G	C	A	A	A	A	C	A	T	C		
18	CP2C9	C	T	C	G	G	C	A	A	A	A	C	A	T	C		
19	CP2C9	C	T	C	G	G	C	A	A	A	A	C	A	T	C		
20	CP2C9	C	T	C	G	G	C	A	A	A	A	C	A	T	C		
21	CP2C9	A	T	C	G	G	C	A	A	A	A	C	A	T	C		
22	CP2C9	C	T	C	A	G	C	G	A	A	A	C	A	T	C		
23	CP2C9	C	T	C	G	G	C	A	A	A	A	C	A	T	C		
24	CP2C9	C	T	C	G	G	C	A	A	A	A	C	A	T	C		
25	CP2C9	C	T	C	G	G	C	A	A	A	A	C	A	T	C		
26	CP2C9	C	T	C	G	G	C	A	A	A	A	C	A	T	C		
27	CP2C9	C	T	C	G	G	C	A	A	A	A	C	A	T	C		
28	CP2C9	C	T	C	G	G	C	A	A	A	A	C	A	T	C		
29	CP2C9	C	T	C	G	G	C	A	A	A	A	C	A	T	C		
30	CP2C9	C	T	C	G	G	C	A	A	A	A	C	A	T	C		
31	CP2C9	C	T	C	G	G	C	A	A	A	A	C	A	T	C		
32	CP2C9	C	T	C	G	G	C	A	A	A	A	C	A	T	C		
33	CP2C9	C	T	C	G	G	C	A	A	A	A	C	A	T	C		
34	CP2C9	C	T	C	G	G	C	A	A	A	A	C	A	T	C		
35	CP2C19	C	T	C	G	G	C	A	A	A	A	C	A	T	C		
36	CP2C19	C	T	C	G	G	C	A	A	A	A	C	A	T	C		
37	CP2C19	C	T	C	G	G	C	A	A	A	A	C	A	T	C		
38	CP2C19	C	T	C	G	G	C	A	A	A	A	C	A	T	C		
39	CP2C19	C	T	C	G	G	C	A	A	A	A	C	A	T	C		
40	CP2C19	C	T	C	G	G	C	A	A	A	A	C	A	T	C		
41	CP2C19	C	T	C	G	G	C	A	A	A	A	C	A	T	C		
42	CP2C19	C	T	C	G	G	C	A	A	A	A	C	A	T	C		
43	CP2C19	C	T	C	G	G	C	A	A	A	A	C	A	T	C		
44	CP2C19	C	T	C	G	G	C	A	A	A	A	C	A	T	C		

Figura 53 Esempio di Monoallelic Translator Table per Allele Typer™ Software. Nella prima colonna è indicato il nome del gene, nella seconda l'allele con la specifica nomenclatura, sulle righe sono riportati gli IDs delle regioni di interesse e le celle sono riempite con gli specifici pattern genetici.

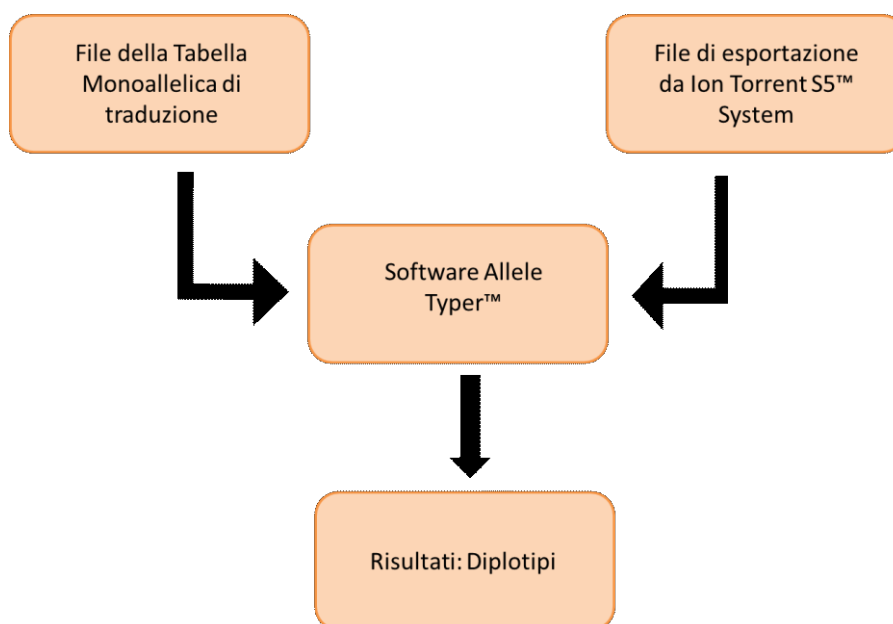


Figura 54: Schematizzazione della determinazione dei diplotipi tramite Allele Typer™ Software

Nella tabella successiva vengono riassunti i risultati ottenuti con *Allele Typer™ Software*, riportando i diplotipi di ciascun gene, per ogni campione.

Tabella 15 Schematizzazione dei diplotipi ottenuti con Allele Typer™ Software

CAMPIONE	CYP2D6	CYP3A5	CYP2B6	CYP2C19	CYP2C8	CYP2C9	CYP3A4	CYP1A2
PHG-A1	*1/*1	*3/*3	*1/*9	*2/*17	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1B/*1F
PHG-A2	*1/*1	*3/*3	*1/*9	*1/*2	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1B/*1B
PHG-A3	*1/*4	*3/*3	*1/*9	*1/*2	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1F/*1F
PHG-A6	*1/*2	*1*1	*1/*9	*1/*1	*1/*1	*5/*8	*1A/*15	*1B/*1L
PHG-A7	*1/*41	*3/*3	*1/*1	*1/*2	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1F/*1F
PHG-A8	*2A/*2A	*3/*3	*1/*5	*1/*1	*1/*3	*1/*2	*1/*1	*1B/*1F
PHG-A9	*1/*1	*3/*3	*1/*9	*1/*1	*1/*1	*1/*3	*1/*22	*1F/*1N
PHG-A10	*2A/*4	*3/*3	*5/*9	*1/*2B	*1/*4	*1/*1	*1/*1	*1B/*1B
PHG-A11	*2A/*2A	*3/*3	*1/*1	*1/*2	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1B/*1H
PHG-A12	*1/*2A	*3/*3	*1/*1	*1/*17	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1B/*1F
PHG-A13	*2A/*4	*3/*3	*1/*1	*2/*17	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1B/*1F
PHG-A14	*1/2A	*1/*3	*2/*9	*1/*2	*1/*3	*1/*2	*1/*1	*1F/*1N

Capitolo sesto

DISCUSSIONE

I campioni inclusi in questo studio appartengono a quattordici individui deceduti tra il 2015 e il 2018 la cui causa di morte è correlata ad oppioidi.

Nello specifico si tratta di quattordici soggetti di sesso maschile e nazionalità italiana. L'età media è di 27 anni con un range che va da 26 a 44 anni. La matrice prelevata durante i riscontri autoptici per effettuare le analisi tossicologiche è il sangue. Le sostanze riscontrate sono:

- Morfina
- Ossicodone
- Norossicodone
- Ossimorfone
- Fentanyl
- Metadone
- Codeina
- 6-MAM (6-monoacetilmorfina, metabolita dell'eroina)

L'intervallo delle concentrazioni misurate va da 10,3 ng/ml a 845 ng/ml con una media di 205,45 ng/ml.

Una volta ottenuti i diplotipi dal software Allele Typer, si è passati all'interpretazione dei risultati cercando di ricavare la classe fenotipica e di dare un'interpretazione per il metabolismo delle sostanze ritrovate nei campioni di sangue. Come prima cosa quindi sono stati determinati i fenotipi e per fare ciò si è fatto affidamento alle informazioni raccolte dalla risorsa online PharmGKB [28], analizzando un gene alla volta.

Per i geni CYP2D6, CYP3A5, CYP2B6, CYP2C19 e CYP2C9 PharmGKB mette a disposizione delle tabelle che aiutano nell'interpretazione, compilate sulla base delle informazioni ricavate dalla letteratura.

Partendo dal gene CYP2D6, i diplotipi osservati nei campioni di studio sono quelli riportati nella tabella 16. Si può notare che nove individui hanno un fenotipo normale per l'attività di questo enzima, mentre tre individui presentano fenotipo intermedio.

Tabella 16: Diplotipi del gene CYP2D6 riscontrati nei campioni. Nella terza colonna è indicato l'Activity Score, nella quarta la classe fenotipica e nell'ultima colonna il rischio di reazione avversa associata al tipo di genotipo/fenotipo. I dati qui riportati sono stati acquisiti dalla tabella fornita da PharmGKB [76].

Diplotipo di CYP2D6	Campioni	Activity Score	Fenotipo	Rischio
*1/*1	PHG-A1, PHG-A2, PHG-A9	2	Normale	Basso
*1/*2 - *1/*2A	PHG-A6, PHG-A12, PHG-A14	2	Normale	Basso
*1/*4	PHG-A3	1	Intermedio	Alto
*1/*41	PHG-A7	1.5	Normale	Basso
*2A/*4	PHG-A10, PHGA-13	1	Intermedio	Alto
*2A/*2A	PHG-A8, PHG-A11	2	Normale	Basso

Questi risultati indicano che gli individui corrispondenti ai codici PHG-A3, A10 e A13, con un Activity Score pari a 1, hanno un allele con funzione enzimatica normale e uno difettoso, dunque sono classificati come metabolizzatori intermedi dei substrati di CYP2D6. Nel dettaglio, per questi casi riportati, gli alleli *1 e *2A hanno una normale funzione, mentre l'allele *4 è quello difettoso. Infatti secondo il CPIC (Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium) è classificato come un allele privo di funzione per un difetto di splicing. Persone con questo fenotipo sono ad elevato rischio di reazioni avverse per sostanze metabolizzate dall'enzima [76]. Ad esempio è stata osservata una correlazione tra la presenza di almeno una copia di *4 e una maggior concentrazione plasmatica di ossicodone, rispetto a individui con due copie geniche normali. [77]. In generale quindi i metabolizzatori

intermedi, avranno un metabolismo rallentato dei substrati di CYP2D6 tra cui codeina, ossicodone, idrocodone.

Il campione PHG-A7 ha un Activity Score di 1,5. Questo risultato indica che l'individuo ha una copia di un allele normale, *1 e uno con funzionalità ridotta *41. Sulla base di questo genotipo, si considera che l'individuo ha un livello normale di metabolismo per le sostanze metabolizzate da CYP2D6. Tutti gli altri campioni hanno un Activity Score di 2 e questo indica che sono dotati di due copie funzionali. Ovvero *1/*1, *1/*2, *1/*2A. Come per il caso precedente, si tratta di individui considerati normali metabolizzatori.

Per quanto riguarda il gene CYP3A5, come riassunto nella tabella 17, il solo campione PHG-A6 possiede un livello normale di metabolismo per i substrati di questo enzima, con due copie dell'allele pienamente funzionale *1. Il campione PHG-A14 con diplotipo *1/*3 è associato ad un livello intermedio dell'attività metabolica di CYP3A5 in quanto possiede una copia dell'allele normale e una copia dell'allele *3 che secondo il CPIC è classificato come allele privo di funzione, a causa di un difetto di splicing. Per questo motivo tutti gli altri campioni che presentano un genotipo *3/*3, dunque entrambe le copie nulle, non posseggono affatto l'attività enzimatica di CYP3A5, risultando infatti come metabolizzatori poveri per i suoi substrati.

Da un punto di vista clinico un metabolismo assente per i substrati di CYP3A5 potrebbe portare alla necessità di dosi più elevate rispetto a quelle di riferimento per ottenere l'effetto analgesico di un farmaco oppioide, come ad esempio per l'Ossicodone [78]. Allo stesso tempo il genotipo omozigote *3/*3 può essere la causa di effetti tossici per le sostanze che, non essendo metabolizzate, si accumulano nell'organismo, come il Fentanyl [79].

Tabella 17 Diplotipi del gene CYP3A5 osservati nei campioni. In questo caso non viene assegnato un Activity Score ma il fenotipo è ricavato sulla base della funzionalità dei due alleli. I dati qui riportati sono stati acquisiti dalla tabella fornita da PharmGKB, scaricabile dal link: [80]

Diplotipo CYP3A5	Campioni	Activity Score	Fenotipo
*1/*1	PHG-A6	n/a	Normale
*1/*3	PHG-A14	n/a	Intermedio
*3/*3	PHG-A1, PHG-A2, PHG-A3, PHG-A7, PHG-A8, PHG-A9, PHG-A10, PHG-A11, PHG-A12, PHG-A13	n/a	Povero

Proseguendo con il gene CYP2B6, i genotipi riscontrati sono riassunti nella tabella 18:

Tabella 18 Diplotipi del gene CYP2B6 osservati nei campioni, associati alla classe fenotipica e al rischio di effetti avversi. I dati riportati sono stati acquisiti dalla tabella messa a disposizione da PharmGKB [81]

Diplotipo CYP2B6	Campioni	Fenotipo	Rischio
*1/*1	PHG-A7, PHG-A11, PHG-A12, PHG-A13	Normale	Basso
*1/*5	PHG-A8	Normale	Basso
*1/*9	PHG-A1, PHG-A2, PHG-A3, PHG-A6, PHG-A9	Intermedio	Alto
*5/*9	PHG-A10	Intermedio	Alto
*2/*9	PHG-A14	Intermedio	Alto

Cinque campioni (PHG-A7, A8, A11, A12, A13) sono risultati metabolizzatori normali per i substrati di CYP2B6, ciò indica che questi individui avevano due copie alleliche funzionali, in questi casi: *1/*1 o *1/*5. Tutti gli altri mostrano un livello intermedio di metabolismo da parte di CYP2B6. Questa classe fenotipica potrebbe essere associata a diverse tipologie di genotipi: una copia genica normale e l'altra con ridotta attività oppure nulla. In alternativa una copia con attività aumentata e l'altra nulla o ridotta. Nei casi qui riportati si osservano tre situazioni di eterozigosi che hanno in comune l'allele *9, classificato dal CPIC come variante allelica con funzionalità ridotta. L'altro allele è uno tra *1, *2 o *5, tutti associati a normale attività enzimatica. Gli individui con metabolismo intermedio per CYP2B6 potrebbero riscontrare un trattamento analgesico poco efficiente o reazioni avverse, a seconda della sostanza acquisita. Ad esempio è stato visto che il genotipo eterozigote G/T per la variante che definisce l'allele *9 (rs3745274, G>T) è associato ad una minor clearance di metadone [82], quindi una maggior concentrazione plasmatica di metadone dopo la sua assunzione. Questo può portare a due conseguenze, da un lato gli individui necessitano di una dose minore per il trattamento della dipendenza da oppioidi, rispetto agli omozigoti G/G. Dall'altro sono anche più a rischio di un effetto tossico per accumulo della sostanza nell'organismo.

Per CYP2C19 gli aplotipi osservati sono indicati nella tabella 19.

Tabella 19 Diplotipi del gene CYP2C19 osservati nei campioni, associati alla classe fenotipica e al rischio di effetti avversi. I dati riportati sono stati acquisiti dalla tabella messa a disposizione da PharmGKB [83]

Diplotipo CYP2C19	Campioni	Fenotipo	Rischio
*1/*1	PHG-A6, PHG-A8, PHG-A9	Normale	Basso
*1/*2	PHG-A2, PHG-A3, PHG-A7, PHG-A11, PHG-A14	Intermedio	Alto
*1/*2B	PHG-A10	Intermedio	Alto
*1/*17	PHG-A12	Rapido	Alto
*2/*17	PHG-A13	Intermedio	Alto

I campioni PHG-A6, A8 e A9 risultano avere un fenotipo normale. Questo risultato indica che gli individui avevano due copie alleliche normali, ovvero due copie di *1. Dunque metabolizzano normalmente i substrati di CYP2C19.

Il campione PHG-A12 è classificato come metabolizzatore rapido. Questo soggetto presenta infatti un allele normale, *2 e una copia di *17 che è indicato dal CPIC come un allele con funzionalità aumentata, dunque il metabolismo dei substrati di CYP2C19 è più rapido.

Tutti gli altri campioni hanno fenotipo intermedio, ad indicare che possiedono una copia genica nulla mentre l'altra può essere normale o con funzione aumentata. In tutti i sette campioni l'allele nullo è *2, o il suballele *2B. Esso è privo di funzione a causa di due variazioni che determinano difetti nel

meccanismo di splicing: 12662A>G (rs12769205) e 19154G>A (rs4244285). In PHG-A13 l'allele nullo è in combinazione con l'allele *17 che ha funzione aumentata, mentre in PHG-A2, A3, A7, A10, A11, A14 è associato all'allele normale *1, la classe fenotipica risultante è la stessa. Ci sono pareri discordanti sull'impatto che il genotipo *1/*2 possa avere sulla concentrazione sierica di metadone. Secondo alcuni potrebbe determinare un aumento delle concentrazioni di questo oppioide [84] ma secondo altri questo diplotipo non influenza le concentrazioni di metadone [85].

Nella tabella 20 vengono riportati i diplotipi per il gene CYP2C

Tabella 20 Diplotipi del gene CYP2C9 osservati nei campioni, associati alla classe fenotipica e al rischio di effetti avversi. I dati riportati sono stati acquisiti dalla tabella messa a disposizione da PharmGKB [86]

Diplotipo CYP2C9	Campioni	Activity Score	Fenotipo	Rischio
*1/*1	PHG-A1, PHG-A2, PHG-A3, PHG-A7, PHG-A10, PHG-A11, PHG-A12, PHG-A13	2	Normale	Basso
*1/*2	PHG-A8, PHG-A14	1,5	Intermedio	Alto
*1/*3	PHG-A9	1	Intermedio	Alto
*5/*8	PHG-A6	1	Intermedio	Alto

Si può notare che la maggior parte dei campioni sono normali metabolizzatori con due copie alleliche normali di *1. I campioni PHG-A8 e A14 sono

caratterizzati da un Activity Score di 1,5 ciò significa che hanno una copia allelica normale e una copia con funzione ridotta, che in questo caso è *2 e dunque risultano metabolizzatori intermedi per i substrati di CYP2C9. I campioni PHG-A9 e PHG-A6 risultano avere un Activity Score di 1. Questo indica che potrebbero avere una copia allelica normale e una nulla oppure due copie con ridotta funzionalità. In effetti in base alla classificazione CPIC il campione PHG-A9 possiede l'allele normale *1 e l'allele *3 che è privo di funzione, mentre PHG-A6 con diplotipo *5/*8 ha due copie che codificano per un'attività enzimatica ridotta. In ogni caso i metabolizzatori intermedi potrebbero andare incontro ad effetti avversi se assumono sostanze che sono substrati di questo enzima.

Per quanto riguarda CYP2C8 i diplotipi osservati sono i seguenti:

Tabella 21 Diplotipi del gene CYP2C8 riscontrati nei campioni

Diplotipi CYP2C8	Campioni
*1/*1	PHG-A1, PHG-A2, PHG-A3, PHG-A6, PHG-A7, PHG-A9, PHG-A11, PHG-A12, PHG-A13
*1/*3	PHG-A8, PHG-A14
*1/*4	PHG-A10

In questo caso PharmGKB non ha ancora fornito informazioni dei fenotipi e dei rischi associati a questi diplotipi. Il CPIC non ha ancora classificato la funzionalità di questi diplotipi. La letteratura a supporto è ancora scarsa, sono

pochi gli studi per poter assegnare un livello di funzionalità a queste varianti e non sono stati effettuate ricerche per trovare correlazioni con le sostanze di interesse per questo studio. Ci sono alcuni lavori che mettono in evidenza una possibile riduzione del metabolismo di farmaci come paclitaxel e diclofenac in individui che portano gli alleli *4, *3 e *2 [87,88]. Sono necessari ulteriori approfondimenti per ottenere prove scientifiche a supporto della funzionalità delle varianti che definiscono questi aplotipi.

Nella tabella 22 vengono riassunti i genotipi per CYP1A2

Tabella 22 Diplotipi del gene CYP1A2 osservati nei campioni

Diplotipi di CYP1A2	Campioni
*1B/*1F	PHG-A1, PHG-A8, PHG-A12, PHG-A13
*1B/*1B	PHG-A2, PHG-A10
*1F/*1F	PHG-A3, PHG-A7
*1B/*1L	PHG-A6
*1F/*1N	PHG-A9, PHG-A14
*1B/*1H	PHG-A11

Per questo gene le informazioni disponibili sono scarse. Gli alleli non sono ancora stati associati ad un livello di funzionalità o ad un potenziale rischio. Gli studi sul metabolismo delle sostanze di interesse per questo lavoro sono molto pochi e non hanno rilevato particolari correlazioni interessanti. In generale sono ancora poco studiate le varianti che definiscono questi alleli. Ci sono alcune ricerche che suggeriscono un potenziale influenza di *1F nel metabolismo della caffeina, che pare potrebbe essere ridotto in individui

fumatori con diplotipo *1F/*1F [89]. Anche in questo caso sono necessari ulteriori studi di approfondimento per capire come questi aplotipi possano impattare sul metabolismo dei substrati di CYP1A2.

L'ultimo gene analizzato è CYP3A4 di cui vengono riportati i diplotipi nella tabella seguente.

Tabella 23 Diplotipi del gene CYP3A4 osservati nei campioni

Diplotipi di CYP3A4	Campioni
*1/*1	PHG-A1, PHG-A2, PHG-A3, PHG-7, PHG-A8, PHG-A10, PHG-A11, PHG-A12, PHG-A13, PHG-A14
*1A/*15	PHG-A6
*1/*22	PHG-A9

Anche per CYP3A4 non ci sono dati organizzati da PharmGKB ma in questo caso il CPIC ha classificato l'allele *1 come quello di riferimento e con una normale funzionalità. Dunque si può dedurre che quasi tutti i campioni risultano normali metabolizzatori per i substrati di questo gene in quanto dotati di due copie di *1. Fanno eccezione due campioni: PHG-A6 e PHG-A9. Nel primo individuo il diplotipo osservato è 1A/*15. Dalla letteratura è possibile constatare che il genotipo eterozigote per la variante che definisce l'allele *15 (rs4986907, 99367427C>T) non è associato ad un'alterazione dell'espressione genica [90], mentre l'allele *1A è definito da rs2740574 99382096C>T) è correlato ad un ridotto metabolismo di Fentanyl [91]. Inoltre

è stato osservato che il genotipo eterozigote per la regione che definisce *1A è associato ad una maggior concentrazione plasmatica di metadone, rispetto al genotipo omozigote di riferimento [92]. Ulteriori approfondimenti servirebbero per associare una classe fenotipica a questo diplotipo. Il campione PHG-A9 presenta l'allele normale *1 in combinazione con l'allele *22. È stato osservato che *22 riduce la produzione di mRNA e inoltre i portatori di almeno un allele *22 mantengono concentrazioni plasmatiche di Fentanyl elevate nel tempo rispetto a individui *1/*1 e una clearance ridotta [93].

A questo punto per avere una visione d'insieme, i risultati vengono riassunti nella tabella 24 associando ogni tipologia di metabolizzatore ad un colore: giallo per i metabolizzatori poveri, arancio per i metabolizzatori intermedi, bianco per i metabolizzatori normali, azzurro per i metabolizzatori rapidi. In verde chiaro vengono indicati i diplotipi di cui non è ancora stata definita con chiarezza la classe metabolica, per mancanza di correlazioni evidenti.

Tabella 24 Visualizzazione complessiva delle classi fenotipiche

CAMPIONE	CYP2D6	CYP3A5	CYP2B6	CYP2C19	CYP2C9	CYP2C8	CYP3A4	CYP1A2
PHG-A1	*1/*1	*3/*3	*1/*9	*2/*17	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1B/*1F
PHG-A2	*1/*1	*3/*3	*1/*9	*1/*2	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1B/*1B
PHG-A3	*1/*4	*3/*3	*1/*9	*1/*2	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1F/*1F
PHG-A6	*1/*2	*1*1	*1/*9	*1/*1	*5/*8	*1/*1	*1A/*15	*1B/*1L
PHG-A7	*1/*41	*3/*3	*1/*1	*1/*2	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1F/*1F
PHG-A8	*2A/*2A	*3/*3	*1/*5	*1/*1	*1/*2	*1/*3	*1/*1	*1B/*1F
PHG-A9	*1/*1	*3/*3	*1/*9	*1/*1	*1/*3	*1/*1	*1/*22	*1F/*1N
PHG-A10	*2A/*4	*3/*3	*5/*9	*1/*2B	*1/*1	*1/*4	*1/*1	*1B/*1B
PHG-A11	*2A/*2A	*3/*3	*1/*1	*1/*2	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1B/*1H
PHG-A12	*1/*2A	*3/*3	*1/*1	*1/*17	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1B/*1F
PHG-A13	*2A/*4	*3/*3	*1/*1	*2/*17	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1B/*1F
PHG-A14	*1/2A	*1/*3	*2/*9	*1/*2	*1/*2	*1/*3	*1/*1	*1F/*1N

Tabella 25 Leggenda dei colori per i fenotipi riassunti nella tabella precedente

	Metabolizzatore povero
	Metabolizzatore Intermedio
	Metabolizzatore Normale (o Esteso)
	Metabolizzatore Rapido
	Classe fenotipica ancora non definita

La valutazione multidisciplinare dei risultati genetici e tossicologici ha permesso di evidenziare alcuni casi degni di nota per il contributo che potrebbero apportare soprattutto in ambito forense e medico-legale.

Il campione PHG-A6: individuo italiano di sesso maschile, 39 anni. Il campione ematico prelevato in corso di esame autoptico è risultato positivo per metadone. Il valore riscontrato, pari a 845 mg/l, va ben oltre la concentrazione letale descritta in letteratura [94]. È noto che questo composto abbia un'emivita molto variabile, tra le 5 e le 130 ore [21] e che questa ampia

variabilità è dovuta alle differenze nei geni che codificano per gli enzimi coinvolti nel suo metabolismo. Il gene principalmente coinvolto nel metabolismo epatico del metadone è il CYP2B6, seguito da CYP3A, CYP2D6 e CYP2C19 e in maniera minore anche da CYP2C9, CYP2C8 e CYP1A2. Dai risultati dell'analisi genetica sopra riportata, il soggetto in questione risulta “*metabolizzatore intermedio*” del metadone, con diplotipo *5/*9 per CYP2C9, *1/*9 per CYP2B6 e *1A/*15 per CYP3A4. A fronte del dato circostanziale fornito, ovvero che il soggetto non aveva assunto massicce dosi di sostanza nelle ore precedenti la morte, la causa del decesso è imputabile ad un accumulo di metadone, dovuto proprio al metabolismo rallentato di questa sostanza. Questo risultato è in accordo con molti altri studi, raccolti in diverse review [21, 74] che hanno ben evidenziato la correlazione tra CYP2B6*9 e concentrazioni elevate di metadone nel sangue dimostrando l'utilità del gene CYP2B6 come biomarcatore per la determinazione della circostanza della morte in presenza di metadone. Questo risultato potrebbe inoltre contribuire all'attribuzione di una classe fenotipica per i diplotipi di CYP3A4, in quanto si osserva l'allele *1A in presenza di elevate concentrazioni di metadone, come già riportato da un altro gruppo di studio [92].

Altro caso meritevole di attenzione è quello codificato come PHG-A9: individuo italiano di sesso maschile di 41 anni. Le analisi tossicologiche su sangue hanno evidenziato la presenza di Fentanyl e Morfina in concentrazioni di 10,3 ng/ml e 74200 ng/ml, rispettivamente. Le concentrazioni medie letali nel sangue sono [94]: 8,3 ng/ml, con un range che varia tra 3 e 28 ng/ml, per il Fentanyl e per la Morfina 700 ng/ml con un range tra 200 ng/ml e 2300 ng/ml. In un contesto di procedure penali è fondamentale garantire con “ragionevole certezza” che la causa di morte sia attribuibile ad una o ad un'altra sostanza ad esempio per assolvere o condannare contro ogni ragionevole dubbio l'indagato che forniva alla vittima una sola delle sostanze riscontrate nel deceduto. Nel caso *de quo* entrambe le sostanze, per concentrazione, possono essere ritenute letali e indicate come causa del decesso, per cui la valutazione da un punto di vista genetico potrebbe risolvere il dubbio. Il soggetto in questione risulta essere “*metabolizzatore povero*” per i substrati del gene CYP3A5, fondamentale nella conversione del Fentanyl nel suo metabolita inattivo Norfentanyl. Inoltre, dai risultati ottenuti, si può supporre che anche l'allele *22 di CYP3A4 potrebbe ridurre la conversione, come già osservato anche in un altro studio [93], contribuendo al fenotipo di “*metabolizzatore povero*” per il Fentanyl. In questo panorama il contributo delle analisi genetiche può rappresentare una prova di supporto

importante in quanto, essendo la vittima un metabolizzatore lento, il ruolo del Fentanyl nel determinismo del decesso potrebbe aver giocato un ruolo marginale.

Altro esempio di come la genetica può risultare utile nel meglio definire un caso giunge dal caso PHG-A2: individuo italiano di sesso maschile di 39 anni. I test tossicologici effettuati su sangue riscontravano 154,2 mg/l di ossicodone, 49,2 mg/l di norossicodone e 40,7 mg/l di ossimorfone. Circa il 45% di una dose di questa sostanza viene N-demetilata a norossicodone, metabolita inattivo, da CYP3A4/5 [95]. Un ulteriore 19% della dose subisce O-demetilazione con formazione di ossimorfone, metabolita più attivo del profarmaco, reazione catalizzata da CYP2D6. Le concentrazioni osservate, tuttavia, non rispettano questi rapporti, essendo le concentrazioni dei due metaboliti comparabili. Osservando i risultati genetici è possibile spiegare il discostamento di tali dati da quelli attesi presentando il soggetto una normale attività enzimatica di CYP2D6, ma assente per CYP3A5. Tale condizione può aver causato lo sbilanciamento del metabolismo dell'ossicodone verso la formazione di ossimorfone e conseguentemente una maggior esposizione all'ossicodone. Le concentrazioni ematiche misurate sono ben oltre la media considerata letale, che per l'ossicodone è 5 mg/l [94], quindi da un punto di vista medico-legale la morte è attribuibile ad un'intossicazione acuta da

questa sostanza. I dati sembrerebbero altresì di supportare l'idea, attualmente dibattuta in letteratura, che il diplotipo CYP3A5 *3/*3 influenzi le concentrazioni di norossicodone dopo la somministrazione di ossicodone [96].

In conclusione questo lavoro ha evidenziato che la farmacogenomica post-mortem potrebbe fornire nuovi mezzi interpretativi per risolvere alcuni casi di morti ambigue o fornire preziose informazioni relative alle circostanze di un decesso in cui sono coinvolte una o più sostanze. Questo campo non è ancora sufficientemente sviluppato per supportare con solide basi scientifiche dei dibattimenti in ambito medico legale e forense per cui risulta fondamentale implementare la ricerca di base così da rendere la farmacogenomica uno strumento preciso e affidabile nei casi giudiziari. L'identificazione di biomarcatori affidabili per la predizione del fenotipo legato al metabolismo dei farmaci risulterebbe inoltre fondamentale per guidare la scelta del dosaggio e della terapia farmacologica per uno specifico paziente, soprattutto nei pazienti che fanno uso di oppioidi sintetici in cui la maneggevolezza della sostanza li rende poco sicuri con elevati rischi di effetti avversi e sovradosaggi. Uno strumento utile in questo campo risultano le etichette farmacogenomiche preparate dai produttori dei farmaci per l'approvazione da parte delle agenzie di regolamentazione di riferimento, come l'Agenzia

Europea dei Medicinali (EMA) per l'Europa e la Food and Drug Administration (FDA) per gli Stati Uniti. Le linee guida per l'interpretazione della farmacogenomica sono fornite da esperti come il Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC). Attualmente la maggior parte di queste etichette riguarda l'ambito oncologico; le raccomandazioni delle diverse agenzie risultano inoltre poco omogenee o divergenti. È dunque auspicabile che vengano implementate le ricerche per raggiungere un punto di vista comune e per ampliare l'applicabilità della farmacogenomica non solo a casi medico-legali di routine, ma anche alla personalizzazione dei trattamenti farmacologici.

BIBLIOGRAFIA

1. Garrod AE. About Alkaptonuria. *Med Chir Trans.* 1902;85:69-78.
PMID: 20896987; PMCID: PMC2036375.
2. Snyder, L. H. (1932). Studies on human inheritance. IX. The inheritance of taste deficiency in man. *Ohio J. Sci.*32,436–438.
3. Bonicke, R., and Reif, W. (1953). Enzymatic inactivation of isonicotinic acid hydrazide in human and animal organism. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*220,321–323.
4. Evans, D. A., Manley, K. A., and Mc, K. V. (1960). Genetic control of isoniazid metabolism in man. *Br. Med. J.*2,485–491
5. Motulsky, A. G. (1957). Drug reactions, enzymes and biochemical genetics. *J. Am. Med. Assoc.*165,835–837.
6. Vogel, F. (1959). Moderne probleme der humangenetik. *Ergeb. Inn. Med. Keinderheilk.*12,52–125.
7. Eichelbaum, M., Spannbrucker, N., and Dengler, H. J. (1975).
Proceedings: Noxidation of sparteine in man and its interindividual differences. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*287(Suppl.), R94.
8. Mahgoub, A., Idle, J. R., Dring, L. G., Lancaster, R., and Smith, R. L.(1977). Polymorphic hydroxylation of Debrisoquine in man. *Lancet*2,584–586

9. Sajantila A, Palo JU, Ojanperä I, Davis C, Budowle B. Pharmacogenetics in medico-legal context. *Forensic Sci Int.* 2010 Dec 15;203(1-3):44-52. doi: 10.1016/j.forsciint.2010.09.011. PMID: 21095511.
10. Lunetta, P., Levo, A., Laitinen, P. J., Fodstad, H., Kontula, K., & Sajantila, A. (2003). Molecular screening of selected long QT syndrome (LQTS) mutations in 165 consecutive bodies found in water. *International Journal of Legal Medicine*, 117, 115-117. <https://doi.org/10.1007/s00414-002-0331-x>
11. Musshoff F, Stamer UM, Madea B. Pharmacogenetics and forensic toxicology. *Forensic Sci Int.* 2010 Dec 15;203(1-3):53-62. doi: 10.1016/j.forsciint.2010.07.011. Epub 2010 Sep 9. PMID: 20828952.
12. Biomarkers Definitions Working Group.. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001 Mar;69(3):89-95. doi: 10.1067/mcp.2001.113989. PMID: 11240971.
13. Lauschke VM, Ingelman-Sundberg M. Prediction of drug response and adverse drug reactions: From twin studies to Next Generation Sequencing. *Eur J Pharm Sci.* 2019 Mar 15;130:65-77. doi: 10.1016/j.ejps.2019.01.024. Epub 2019 Jan 23. PMID: 30684656.

14. Lauschke VM, Zhou Y, Ingelman-Sundberg M. Novel genetic and epigenetic factors of importance for inter-individual differences in drug disposition, response and toxicity. *Pharmacol Ther.* 2019 May;197:122-152. doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.01.002. Epub 2019 Jan 22. PMID: 30677473; PMCID: PMC6527860.
15. Wagner JG. Pharmacokinetics. *Annu Rev Pharmacol.* 1968;8:67-94. doi: 10.1146/annurev.pa.08.040168.000435. PMID: 4875402.
16. Smith HS. Variations in opioid responsiveness. *Pain Physician.* 2008 Mar-Apr;11(2):237-48. PMID: 18354715.
17. Ameyaw MM, Regateiro F, Li T, Liu X, Tariq M, Mobarek A, Thornton N, Folayan GO, Githang's J, Indalo A, Ofori-Adjei D, Price-Evans DA, McLeod HL. MDR1 pharmacogenetics: Frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity. *Pharmacogenetics* 2001; 11:217-221
18. Ohne A, Köpke K, Gerloff T, Mai I, Rietbrock S, Meisel C, Hoffmeyer S, Kerb R, Fromm MF, Brinkman U, Eichelbaum M, Brockmüller J, Cascorbi I, Roots I. Modulation of steady-state kinetics of digoxin by haplotypes of the P-glycoprotein MDR1 gene. *Clin Pharmacol Ther* 2002; 72:584-594

19. Somogyi AA, Barratt DT, Coller JK. Pharmacogenetics of opioids. *Clinical Pharmacology Ther* 2007; 81:429-444.
20. National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Gene Summary for NCBI Gene 1565. Retrieved June 9, 2021 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/gene/CYP2D6/human>
21. Ahmad T, Valentovic MA, Rankin GO. Effects of cytochrome P450 single nucleotide polymorphisms on methadone metabolism and pharmacodynamics. *Biochem Pharmacol*. 2018 Jul;153:196-204. doi: 10.1016/j.bcp.2018.02.020. Epub 2018 Feb 16. PMID: 29458047; PMCID: PMC6148365.
22. Sim SC, Ingelman-Sundberg M. The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature website: a peer-reviewed database of CYP variants and their associated effects. *Hum Genomics*. 2010 Apr;4(4):278-81. doi: 10.1186/1479-7364-4-4-278. PMID: 20511141; PMCID: PMC3525213.
23. Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeconomic and clinical aspects. *Pharmacol Ther*. 2007 Dec;116(3):496-526. doi:

- 10.1016/j.pharmthera.2007.09.004. Epub 2007 Oct 9. PMID: 18001838.
- 24.M. Ingelman-Sundberg, S.C. Sim, A. Gomez, C. Rodriguez-Antona, Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeigenetic and clinical aspects, *Pharmacol. Ther.* 116 (2007) 496–526.
- 25.Pharmacogene Variation Consortium (PharmVar) at www.PharmVar.org (Gaedigk et al. 2018, *CPT* 103:399; Gaedigk et al. 2019, *CPT* 105:29)
- 26.Nofziger C, Turner AJ, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M, Agúndez JAG, Black JL, Dunnenberger HM, Ruano G, Kennedy MA, Phillips MS, Hachad H, Klein TE, Gaedigk A. PharmVar GeneFocus: CYP2D6. *Clin Pharmacol Ther.* 2020 Jan;107(1):154-170. doi: 10.1002/cpt.1643. Epub 2019 Dec 9. PMID: 31544239; PMCID: PMC6925641.
- 27.PharmGKB Gene-Specific Information Tables for CYP2D6 <https://www.pharmgkb.org/page/cyp2d6RefMaterials>
- 28.Barbarino, J.M., Whirl-Carrillo, M., Altman, R.B. & Klein, T.E. PharmGKB: a worldwide resource for pharmacogenomic information. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 10, e1417 (2018). Link al sito web di PharmGKB: <https://www.pharmgkb.org/whatIsPharmgkb>

- 29.A.K. Daly, Pharmacogenetics of the Cytochromes P450, *Curr. Top. Med. Chem.* 4(2004) 1733–1744,<http://dx.doi.org/10.2174/1568026043387070>.
- 30.U.M. Zanger, M. Schwab, Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation,*Pharmacol. Ther.* 138 (2013) 103141,<http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007>.]
- 31.Zhou, SF., Yang, LP., Zhou, ZW. et al. Insights into the Substrate Specificity, Inhibitors, Regulation, and Polymorphisms and the Clinical Impact of Human Cytochrome P450 1A2. *AAPS J* 11, 481–494 (2009).
<https://doi.org/10.1208/s12248-009-9127-y>
- 32.Rasmussen BB, Brix TH, Kyvik KO, Brøsen K. The interindividual differences in the 3-demethylation of caffeine alias CYP1A2 is determined by both genetic and environmental factors. *Pharmacogenetics.* 2002 Aug;12(6):473-8. doi: 10.1097/00008571-200208000-00008. PMID: 12172216.
- 33.PharmGKB summary: very important pharmacogene information for CYP1A2. *Pharmacogenetics and genomics.* 2012. Thorn Caroline F, Aklillu Eleni, Klein Teri E, and Altman Russ B.PMID:21989077(opens

in new window)PMCID:PMC3346273(opens in new window)

DOI:10.1097/FPC. 0b013e32834c6efd

- 34.J.H. Kim, H.S. Cheong, B.L. Park, L.H. Kim, H.J. Shin, H.S. Na, M.W. Chung,H.D. Shin, Direct sequencing and comprehensive screening of genetic polymorphisms on CYP2 family genes (CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, and CYP2E1) in five ethnic populations, Arch. Pharm. Res. 38 (2015) 115-128, <http://dx.doi.org/10.1007/s12272-014-0348-y>.
- 35.U.M. Zanger, M. Schwab, Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation, Pharmacol. Ther. 138 (2013) 103-141, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007>
- 36.Wang H, Faucette S, Sueyoshi T, Moore R, Ferguson S, Negishi M, LeCluyse EL. A novel distal enhancer module regulated by pregnane X receptor/constitutive androstane receptor is essential for the maximal induction of CYP2B6 gene expression. J Biol Chem. 2003 Apr 18;278(16):14146-52. doi: 10.1074/jbc.M212482200. Epub 2003 Feb 5. PMID: 12571232.
- 37.PharmGKB summary: very important pharmacogene information for CYP2B6. Pharmacogenetics and genomics. 2010. Thorn Caroline F,

- Lamba Jatinder K, Lamba Vishal, Klein Teri E, and Altman Russ B. PMID:20648701 PMCID:PMC3086041
38. U.M. Zanger, M. Schwab, Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation, *Pharmacol. Ther.* 138 (2013) 103-141, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007>
39. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 8. *Pharmacogenetics and genomics*. 2013. Aquilante Christina L, Niemi Mikko, Gong Li, Altman Russ B, and Klein Teri E. PMID:23962911 (opens in new window) PMCID:PMC4038626 (opens in new window) DOI:10.1097/FPC.0b013e3283653b27
40. Yasar U, Lundgren S, Eliasson E, Bennet A, Wiman B, de Faire U, Rane A. Linkage between the CYP2C8 and CYP2C9 genetic polymorphisms. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Nov 22;299(1):25-8. doi: 10.1016/s0006-291x(02)02592-5. PMID: 12435384.
41. Totah RA, Rettie AE. Cytochrome P450 2C8: substrates, inhibitors, pharmacogenetics, and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther.* 2005

- May;77(5):341-52. doi: 10.1016/j.clpt.2004.12.267. Erratum in: Clin Pharmacol Ther. 2005 Aug;78(2):153. PMID: 15900280.
42. Cytochrome P450 2C9-CYP2C9. *Pharmacogenetics and genomics*. 2010. Van Booven Derek, Marsh Sharon, McLeod Howard, Carrillo Michelle Whirl, Sangkuhl Katrin, Klein Teri E, and Altman Russ B. PMID:20150829(opens in new window) PMCID: PMC3201766(opens in new window) DOI:10.1097/FPC.0b013e3283349e84
43. Ali ZK, Kim RJ, Ysla FM. CYP2C9 polymorphisms: considerations in NSAID therapy. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 2009 Jan;12(1):108-14. PMID: 19152219.
44. Riepilogo PharmGKB: informazioni farmacogenetiche molto importanti per il citocromo P450, famiglia 2, sottofamiglia C, polipeptide 19. *Farmacogenetica e genomica*. 2012. Scott Stuart A, Sangkuhl Katrin, Shuldiner Alan R, Hulot Jean-Sébastien, Thorn Caroline F, Altman Russ B, e Klein Teri E. PMID: 22027650 PMCID: PMC3349992 DOI: 10.1097/FPC.0b013e32834d4962]
45. Kamiyama Y, Matsubara T, Yoshinari K, Nagata K, Kamimura H, Yamazoe Y. Role of human hepatocyte nuclear factor 4alpha in the expression of drug-metabolizing enzymes and transporters in human

49. Teh, L.K. & Bertilsson, L. Pharmacogenomics of CYP2D6: molecular genetics, interethnic differences and clinical importance. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 27, 55–67 (2012)
50. Barbarino, J.M., Whirl-Carrillo, M., Altman, R.B. & Klein, T.E. PharmGKB: a worldwide resource for pharmacogenomic information. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 10, e1417 (2018).
51. A.M. Trescot, S. Faynboym, A review of the role of genetic testing in pain medicine, *Pain Physician* 17 (2014) 425–445.
52. Transon C, Leemann T, Dayer P. In vitro comparative inhibition profiles of major human drug metabolising cytochrome P450 isozymes (CYP2C9, CYP2D6 and CYP3A4) by HMG-CoA reductase inhibitors. *Eur J Clin Pharmacol.* 1996;50(3):209-15. doi: 10.1007/s002280050094. PMID: 8737761.
53. Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2004 Jan;369(1):23-37. doi: 10.1007/s00210-003-0832-2. Epub 2003 Nov 15. PMID: 14618296.
54. Hashimoto H, Toide K, Kitamura R, Fujita M, Tagawa S, Itoh S, Kamataki T. Gene structure of CYP3A4, an adult-specific form of cytochrome P450 in human livers, and its transcriptional control. *Eur J*

- Biochem. 1993 Dec 1;218(2):585-95. doi: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb18412.x. PMID: 8269949.
55. Niwa T, Yabusaki Y, Honma K, Matsuo N, Tatsuta K, Ishibashi F, Katagiri M. Contribution of human hepatic cytochrome P450 isoforms to regioselective hydroxylation of steroid hormones. *Xenobiotica*. 1998 Jun;28(6):539-47. doi: 10.1080/004982598239290. PMID: 9667077.
56. Hashimoto H, Toide K, Kitamura R, Fujita M, Tagawa S, Itoh S, Kamataki T. Gene structure of CYP3A4, an adult-specific form of cytochrome P450 in human livers, and its transcriptional control. *Eur J Biochem*. 1993 Dec 1;218(2):585-95. doi: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb18412.x. PMID: 8269949.
57. Riassunto PharmGKB: informazioni farmacogenetiche molto importanti per CYP3A5 . *Farmacogenetica e genomica*. 2012. Lamba Jatinder, Hebert Giovanna M, Schuetz Erin G, Klein Teri E, e Altman Russ B .PMID: 22407409(si apre in una nuova finestra)PMCID: PMC3738061(si apre in una nuova finestra)DOI: 10.1097/FPC.0b013e328351d47f
58. T. Mizutani, Frequenze PM dei principali CYP in asiatici e caucasici, *Drug Metab. Rev.* 35 (2003) 99-106.

59. R.R. Shah, Farmacogenetica nella regolamentazione dei farmaci: promessa, potenziale e insidie, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci.* 360 (2005) 1617 -1638
60. P. Holmgren, J. Ahlner, Farmacogenomica per la tossicologia forense: Esperienza svedese, in: S.H. Wong, M. Linder, R. Valdes, Jr. (Eds.), *Pharmacogenomics and Proteomics*, AACC Press, Washington, DC, 2006, pp. 295 -299
61. Classificazione statistica internazionale delle malattie e dei problemi sanitari correlati - 10a revisione (ICD-10). Vol. 2: Manuale di istruzioni, Organizzazione Mondiale della Sanità, Ginevra, 1993
62. S. McElroy, C. Sachse, J. Brockmoller, J. Richmond, M. Lira, D. Friedman, et al., CYP2D6 genotyping as an alternative to phenotyping for determination of metabolic status in a clinical trial setting, *AAPS PharmSci* 2 (2000) E33
63. G. Wilkinson, Metabolismo dei farmaci e variabilità tra i pazienti nella risposta ai farmaci, *N. Engl. J. Med.* 352 (2005) 2211–2221
64. S. Wong, M. Wagner, J. Jentzen, C. Schur, J. Bjerke, S. Gock, C. Chang, Pharmacogenomics as an aspect of molecular autopsy for forensic pathology/toxicology: does genotyping CYP 2D6 serve as an

- adjunct for certifying methadone toxicity? *J. Forensic Sci.* 48 (6) (2003) 1406-1415
65. Degenhardt L, Glantz M, Evans-Lacko S, et al. (2017). Estimating treatment coverage for people with substance use disorders: an analysis of data from the World Mental Health Surveys. *World Psychiatry.* 2017;16(3):299-307. doi:10.1002/wps.20457
66. WHO (2019). International Classification of Diseases for Mortality and Morbidity Statistics. Eleventh Revision.
67. Seth P, Scholl L, Rudd RA, Bacon S. Mortality per overdose di oppioidi, cocaina e psicostimolanti - Stati Uniti, 2015-2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2018; 67:349-358
68. Glenn S. Gerhard, Scott Kaniper and Barbara Paynton Fentanyl overdoses and pharmacogenetics. *Pharmacogenetics and Genomics* 30: 5–8 Copyright © 2019 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved. *Pharmacogenetics and Genomics* 2019, 30:5–8
69. L'epidemiologia per la sanità pubblica Istituto Superiore di Sanità. <https://www.epicentro.iss.it/coronavirus/sars-cov-2-dipendenze-droghe-consumo-sostanze-stupefacenti>

- 70.J. Lotsch, C. Skarke, J. Liefhold, G. Geisslinger, Predittori genetici della risposta clinica agli analgesici oppioidi: utilità clinica e prospettive future, *Clin. Pharmacokinet.* 43 (2004) 983–1013
- 71.Koolen SL, Van der Rijt CC. C'è un ruolo per la farmacogenetica nel dosaggio del fentanyl? *Pharmacogenomics* 2017; 18:417-419
- 72.J.Guitton, T. Buronfosse, M. Desage, A. Lepape, J.L. Brazier, P. Beaune, Possible involvement of multiple cytochrome P450s in fentanyl and sufentanil metabolism as opposed to alfentanil, *Biochem. Pharmacol.* 53 (1997) 1613–1619
- 73.Y. Chang, W.B. Fang, S.N. Lin, D.E. Moody, Metabolismo stereoselettivo del meadone da microsomi epatici umani e citocromo P450s cDNA-espresso: una riconciliazione, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 108 (2011) 55-62, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-7843.2010.00628.X> Med Sci. 2021 Apr 1;21(2):145-154. doi: 10.17305/bjbms.2020.4897. PMID: 32841585; PMCID: PMC7982063.
- 74.Ramli FF. Pharmacogenomics biomarkers for personalized methadone maintenance treatment: The mechanism and its potential use. *Bosn J Basic*
- 75.AlleleTyper™ Software. Catalog Number 4486060. Publication Part Number4486002. Revision A

- window)PMCID:PMC4254688(opens in new window)DOI:10.1016/j.drugalcdep.2014.10.014
- 83.<https://www.pharmgkb.org/page/cyp2c19RefMaterials>
84. Combined Effect of CYP2B6 Genotype and Other Candidate Genes on a Steady-State Serum Concentration of Methadone in Opioid Maintenance Treatment. Therapeutic drug monitoring. 2017. Kringen Marianne K et al. PMID:28723731(opens in new window)DOI:10.1097/FTD.0000000000000437
85. ABCB1 and cytochrome P450 genotypes and phenotypes: influence on methadone plasma levels and response to treatment. Clinical pharmacology and therapeutics. 2006. Crettol Séverine et al. PMID:17178267(opens in new window)DOI:10.1016/j.clpt.2006.09.012
86. <https://www.pharmgkb.org/page/cyp2c9RefMaterials>
87. Genetic heterogeneity beyond CYP2C8*3 does not explain differential sensitivity to paclitaxel-induced neuropathy. Breast cancer research and treatment. 2014. Hertz Daniel L et al. PMID:24706167(opens in new window)PMCID:PMC4256153(opens in new window)DOI:10.1007/s10549-014-2910-1

88. Relationship between CYP2C8 genotypes and diclofenac 5-hydroxylation in healthy Spanish volunteers. *European journal of clinical pharmacology*. 2008. Dorado P et al. PMID:18548238(opens in new window)DOI:10.1007/s00228-008-0508-4
89. Comparisons of CYP1A2 genetic polymorphisms, enzyme activity and the genotype-phenotype relationship in Swedes and Koreans. *European journal of clinical pharmacology*. 2007. Ghotbi Roza et al. PMID:17370067(opens in new window)DOI:10.1007/s00228-007-0288-2
90. Common allelic variants of cytochrome P4503A4 and their prevalence in different populations. *Pharmacogenetics*. 2002. Lamba Jatinder K et al. PMID:11875366
91. Identification of Cytochrome P450 Polymorphisms in Burn Patients and Impact on Fentanyl Pharmacokinetics: A Pilot Study. *Journal of burn care & research : official publication of the American Burn Association*. 2019. Grimsrud Kristin N et al. PMID:30371861(opens in new window)PMCID:PMC6939828(opens in new window)DOI:10.1093/jbcr/iry053
92. ABCB1 and cytochrome P450 genotypes and phenotypes: influence on methadone plasma levels and response to treatment. *Clinical*

- pharmacology and therapeutics. 2006. Crettol Séverine et al.
PMID:17178267(opens in new window)DOI:10.1016/j.clpt.2006.09.012
93. Polymorphisms associated with fentanyl pharmacokinetics, pharmacodynamics and adverse effects. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 2019. Saiz-Rodríguez Miriam et al. PMID:30281924(opens in new window)DOI:10.1111/bcpt.13141
94. “Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man”, Fourth Edition. Randal C. Baselet, Robert H. Cravey. *Chemical Toxicology* –institute Foster City, California.
95. The pharmacokinetics and metabolism of oxycodone after intramuscular and oral administration to healthy subjects. Pöyhiä R, Seppälä T, Olkkola K T, Kalso E in *British journal of clinical pharmacology* (1992). PMID: 1389934(opens in new window) PMC1381353
96. <https://www.pharmgkb.org/pathway/PA166170927>