

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE MEDICHE GENERALI E SCIENZE DEI SERVIZI  
PROGETTO N. 3:  
“SANITÀ PUBBLICA E MEDICINA DEL LAVORO”

Ciclo XXV

**Settore Concorsuale di afferenza: 06/M2**

**Settore Scientifico disciplinare: MED 43**

LA FARMACOGENETICA DELLA NARCOLESSIA: COMORBIDITÀ  
PSICHIATRICHE E RISVOLTI IN SANITÀ PUBBLICA.

**Presentata da: Dott.ssa Rossana Lanzellotto**

**Coordinatore Dottorato**

**Prof. Nicola Rizzo**

**Relatore**

**Prof.ssa Susi Pelotti**

**Esame finale anno 2013**



# INDICE

---

<b>INTRODUZIONE .....</b>	<b>5</b>
<b>CAPITOLO 1: LA FARMACOGENETICA E IL CITOCROMO P450 .....</b>	<b>9</b>
1.1 LA FARMACOGENETICA .....	9
1.1.1 STORIA DELLA FARMACOGENETICA .....	9
1.1.2 CENNI DI FARMACOCINETICA.....	11
1.1.3 SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM (SNP) .....	13
1.1.4 IL SIGNIFICATO DELLA FARMACOGENETICA IN SANITÀ PUBBLICA	14
1.2 IL CITOCROMO P450 .....	15
1.2.1 ISOFORME E POLIMORFISMI DEL P450 E RELATIVO SIGNIFICATO CLINICO .....	16
1.2.2 EVOLUZIONE DEL CITOCROMO P450 .....	18
1.3 CYP2D6.....	19
1.3.1 RUOLO NEL METABOLISMO .....	20
1.3.2 EVOLUZIONE DEL LOCUS CYP2D.....	21
1.3.3 FENOTIPI DEL CYP2D6: CLASSIFICAZIONE E DEFINIZIONE .....	22
1.3.4 ALLELI DEL CYP2D6 E RELATIVO IMPATTO FUNZIONALE.....	24
1.3.5 CENNI DI POPOLAZIONE.....	26
1.3.6 IMPATTO CLINICO DELLA VARIAZIONE GENETICA .....	27
1.3.7 METABOLISMO DI COMPOSTI ENDOGENI A LIVELLO CEREBRALE	29
1.4 CYP2C9/CYP2C19.....	31
1.4.1 POLIMORFISMO GENETICO, FUNZIONALITÀ E IMPATTO CLINICO ..	32
1.5 CYP3A4/CYP3A5 .....	34
1.5.1 POLIMORFISMO GENETICO, FUNZIONALITÀ E IMPATTO CLINICO ..	35
1.6 ABCB1 .....	37
<b>CAPITOLO 2: LA NARCOLESSIA.....</b>	<b>41</b>
2.1 STORIA .....	41
2.2 EPIDEMIOLOGIA .....	43
2.3 SINTOMATOLOGIA .....	45
2.4 ASPETTI GENETICI.....	47
2.4.1 TIPIZZAZIONE DELL'HLA .....	47
2.4.2 LE IPOCRETINE NELLA NARCOLESSIA .....	49

2.5 DIAGNOSI E DIAGNOSI DIFFERENZIALE .....	50
2.6 TERAPIA .....	52
2.7 COMORBIDITÀ PSICHIATRICHE .....	58
2.8 IMPLICAZIONI SOCIALI.....	61
<b>CAPITOLO 3: STUDIO SPERIMENTALE .....</b>	<b>63</b>
3.1 SCOPO DELLO STUDIO.....	63
3.2 MATERIALI E METODI.....	64
3.2.1 CAMPIONI .....	64
3.2.2 QUANTIFICAZIONE.....	64
3.2.3 AMPLIFICAZIONE .....	65
3.2.3.1 CYP2D6.....	65
3.2.3.2 CYP2C9/CYP2C19.....	67
3.2.3.3 CYP3A4/CYP3A5/ABCB1 .....	68
3.2.4 ELETTROFORESI SU GEL D'AGAROSIO.....	70
3.2.5 MINISEQUENCING.....	71
3.2.6 ELETTROFORESI CAPILLARE E GENOTIPIZZAZIONE.....	73
3.2.7 INFERENZA DELLA FASE GAMETICA.....	76
3.2.8 DETERMINAZIONE DEL FENOTIPO E CONFRONTI STATISTICI TRA SOTTOGRUPPI .....	77
3.2.9 VERIFICA DELLE CONDIZIONI DI EQUILIBRIO GENETICO.....	77
3.3 RISULTATI.....	78
3.3.1 CONDIZIONI DI EQUILIBRIO GENETICO .....	79
3.3.2 DISTRIBUZIONE DELLE FREQUENZE ALLELICHE E FENOTIPICHE..	79
3.3.3.1 CYP2D6.....	79
3.3.3.2 CYP2C9.....	82
3.3.3.3 CYP2C19.....	83
3.3.3.4 CYP3A4.....	84
3.3.3.5 CYP3A5.....	84
3.3.3.6 ABCB1.....	85
3.3.4 DISTRIBUZIONE FENOTIPICA NEL CAMPIONE .....	86
3.4 DISCUSSIONE .....	87
<b>CONCLUSIONI .....</b>	<b>91</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>95</b>

# INTRODUZIONE

---

La farmacogenetica è stata definita come lo studio della dell'influenza della variabilità genetica nella risposta ai farmaci. Recentemente è stato introdotto il termine "farmacogenomica", un termine più ampio che comprende tutti i geni in un genoma in grado determinare una variazione nella risposta al farmaco. La farmacogenetica e la farmacogenomica ricoprono un ruolo di base nel moderno concetto di medicina personalizzata, che mira ad indirizzare la terapia farmacologica a seconda delle variazioni genetiche individuali al fine di ottenere i migliori benefici e ridurre l'insorgenza di reazioni avverse al farmaco (ADR).

Le ADR rappresentano la sesta causa di morte negli Stati Uniti, causano circa il 7% delle ammissioni ospedaliere e sono associate ad un considerevole aumento dei costi a carico del sistema sanitario. Oltre a interazioni farmacologiche, fattori fisiologici come età, sesso, peso, stato di salute e patologie a carico dei principali organi implicati nel metabolismo e fattori ambientali l'assunzione di alcol, il fumo e la dieta, i fattori genetici relativi agli enzimi implicati nel metabolismo dei farmaci, giocano un importante ruolo nelle differenze interindividuali nella risposta ai farmaci e nella patogenesi delle ADR. Le informazioni derivanti dalla ricerca in campo farmacogenetico possono aprire la strada ad una più accurata predizione della risposta individuale ai farmaci e ad una selezione del farmaco appropriato nel giusto dosaggio al fine di raggiungere una risposta terapeutica ottimale, limitando le ADR.

Tra gli enzimi coinvolti nel metabolismo degli xenobiotici, il sistema del citocromo P450 (CYP) è il principale responsabile del metabolismo di fase I dei farmaci.

Questo sistema comprende una superfamiglia di proteine presenti nella maggior parte dei tessuti con la maggiore proporzione localizzata nel fegato. Il database *Human CYP allele nomenclature committee* contiene informazioni riguardanti i 57 geni polimorfici finora identificati e per ogni gene sono descritte le varianti alleliche conosciute, ognuna associata alla propria funzionalità. Il polimorfismo funzionale dei CYP consiste principalmente di mutazioni SNP, di delezioni e duplicazioni geniche e di piccole inserzioni e delezioni che possono causare un'alterazione della funzionalità enzimatica. L'isoforma del P450 maggiormente studiata è il *CYP2D6*, il suo polimorfismo ha un'importante rilevanza clinica dato il coinvolgimento di questo enzima nel metabolismo del 20-25% dei farmaci più utilizzati nella pratica clinica. Recentemente è stata scoperta l'espressione di questo enzima anche a livello cerebrale, da cui la ricerca orientata alla correlazione tra tratti di personalità e polimorfismo genetico del *CYP2D6*, come l'associazione riportata tra il fenotipo di metabolismo ultrarapido e i disturbi alimentari.

Il *CYP2D6*, altre isoforme del sistema P450 tra cui *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A4*, *CYP3A5* e il gene *ABCB1*, codificante per la glicoproteina P, sono coinvolti rispettivamente nei processi metabolici e di trasporto *in vitro* e *in vivo* dei farmaci somministrati per il trattamento della narcolessia. La narcolessia è un disturbo organico del sonno di tipo neurologico caratterizzato da sintomi quali eccessiva sonnolenza diurna, cataplessia, paralisi del sonno, allucinazioni ipnagogiche e sonno notturno disturbato. Il trattamento della narcolessia è di tipo sintomatologico e include la somministrazione di stimolanti come il modafinil per la sonnolenza diurna e di antidepressivi noradrenergici, come la venlafaxina, per la cataplessia e per i sintomi legati alle anomalie del sonno REM. Inoltre, in molti casi di

narcolessia sono stati osservati sintomi riconducibili a disturbi psichiatrici, tra cui i disturbi alimentari.

Lo scopo della presente ricerca è duplice: mediante l'analisi del fenotipo dei geni *CYP2D6*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A4*, *CYP3A5* e *ABCB1* in un campione di 108 pazienti con diagnosi di narcolessia con cataplessia afferenti al Dipartimento di Scienze Neurologiche dell'Università di Bologna, quello di valutare statisticamente l'associazione tra il polimorfismo del *CYP2D6* e la presenza di comorbidità psichiatriche nei pazienti a cui si aggiunge quello di comporre un profilo farmacogenetico per ogni paziente con lo scopo di inquadrare il trattamento dell'ambito di una terapia personalizzata.



# CAPITOLO 1: LA FARMACOGENETICA E IL CITOCROMO P450

---

## 1.1 LA FARMACOGENETICA

### 1.1.1 STORIA DELLA FARMACOGENETICA

I primi studi riguardanti la farmacogenetica risalgono al 1932 quando Snyder osservò la presenza di variazioni nei recettori individuali del gusto, dimostrando che questo tratto era determinato geneticamente (Snyder, 1932). Gli anni '50 furono la decade in cui la farmacogenetica emerse come disciplina a sé stante e gli studi si concentrarono sui farmaci più largamente impiegati in quell'epoca: primachina, succinilcolina e isoniazide. Fu dimostrato che la tossicità alla primachina, che provocava emolisi acuta in alcuni individui, era dovuta ad un deficit dell'enzima glucosio-6-fosfato deidrogenasi negli eritrociti (Alving et al., 1956) e le relative basi molecolari furono individuate successivamente (Hirono e Beutler, 1988). Il farmaco succinilcolina fornì il secondo esempio di una variante genetica che causa un'anormale risposta al trattamento: la succinilcolina causa paralisi muscolare, generalmente per pochi minuti, ma in casi eccezionali, fino ad un'ora e questo effetto prolungato è dovuto ad una alterata funzionalità della pseudocolinesterasi. Studi su famiglie mostrarono infatti che la mancanza di attività della pseudocolinesterasi veniva ereditata come tratto autosomico recessivo (Lehmann e Ryan, 1956; Kalow e Staron, 1957). Infine il perfetto esempio di difetto genetico del metabolismo dei farmaci è l'acetilazione, osservata

per la prima volta con l'avvento dell'isoniazide come trattamento della tubercolosi negli anni '50 e fu dimostrato che il difetto metabolico nell'acetilazione era dovuto a mutazioni sul gene della N-acetiltransferasi-2 (*NAT2*) (Hughes et al., 1954; Mitchell e Bell, 1957; Evans et al., 1960). Il termine *farmacogenetica* fu coniato per la prima volta nel 1959 dal farmacologo tedesco Friedrich Vogel per definire la relazione esistente tra fattori genetici individuali e la risposta ai farmaci (Vogel, 1959), due anni dopo che Arno Motulsky aveva definito il concetto per cui i difetti metabolici ereditati potessero spiegare le differenze interindividuali nella risposta ai farmaci (Motulsky, 1957). In seguito fu pubblicata la prima monografia sulla farmacogenetica, in cui furono revisionati tutti gli esempi di fattori genetici che influenzavano la risposta ai farmaci pubblicati fino ad allora (Kalow, 1962). Queste ultime pubblicazioni aprirono la strada, negli anni successivi, a numerose osservazioni su come la genetica condizionasse la risposta ai farmaci, fino agli studi sui gemelli identici per stabilire quale fosse il contributo genetico all'eliminazione di numerosi farmaci dal plasma (Alexsanderson et al., 1969; Vesell, 1978).

Da allora l'interesse riscosso dalla farmacogenetica tra medici, genetisti e industrie farmaceutiche, come rivelato dal rapido aumento delle pubblicazioni sull'argomento, è andato sempre più crescendo: i progressi in campo biochimico consentirono la scoperta degli enzimi del metabolismo dei farmaci e la caratterizzazione delle reazioni da essi catalizzate, mentre la genetica molecolare, contribuì ad approfondire le conoscenze scientifiche circa le sequenze geniche e la variabilità dei geni del metabolismo.

Più di recente è stato introdotto il termine *farmacogenomica* (Marshall, 1997) che identifica un concetto più ampio basato sullo studio di tutti i geni dell'intero

genoma che possono determinare una risposta ai farmaci (Evans e Relling, 1999). Pur occupandosi della stessa materia, farmacogenetica e farmacogenomica utilizzano un approccio differente e possono essere considerate l'una l'evoluzione dell'altra: mentre il focus della farmacogenetica è di predire la risposta al trattamento farmacologico con lo scopo di impostare una terapia personalizzata, la farmacogenomica adotta un approccio più generale, partendo dall'analisi dell'intero genoma per identificare sia i nuovi geni che possano fungere da bersaglio per nuove terapie, sia i profili genetici individuali dai quali può dipendere la risposta ai farmaci somministrati.

### 1.1.2 CENNI DI FARMACOCINETICA

La farmacocinetica è una branca della farmacologia che studia quantitativamente l'assorbimento, la distribuzione, il metabolismo e l'eliminazione (ADME) dei farmaci.

I geni che codificano per proteine coinvolte nei processi dell'ADME sono stati studiati per la presenza di mutazioni e polimorfismi determinanti la sintesi di proteine a funzione o espressione alterata. Tali mutazioni sono state ripetutamente associate alle proprietà farmacocinetiche *in vitro* e *in vivo* di una larga gamma di farmaci e la loro correlazione con gli esiti clinici è ancora una questione molto dibattuta.

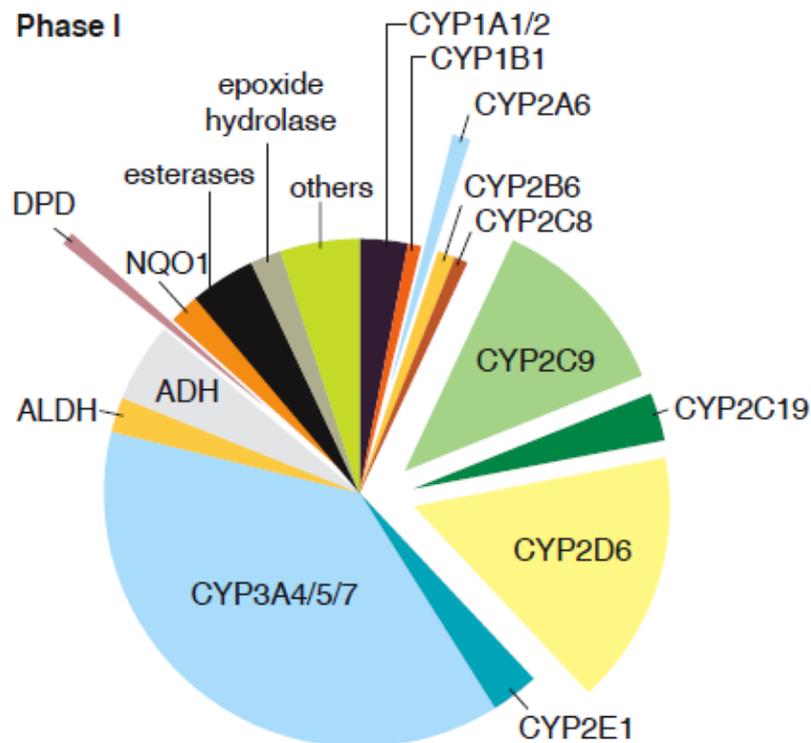
I geni dell'ADME sono raggruppati in quattro categorie:

- enzimi del metabolismo di fase I e di fase II, responsabili rispettivamente dell'introduzione di gruppi funzionali sulla molecola e della coniugazione del

metabolita con una seconda molecola endogena al fine di rendere più idrofilo il farmaco e garantirne l'eliminazione (figura 1);

- proteine di trasporto, responsabili dell'assorbimento e dell'escrezione dei farmaci fuori e dentro la cellula (inclusa la famiglia ABC);
- proteine di legame sierologiche, responsabili della distribuzione;
- fattori di trascrizione che possono alterare l'espressione degli altri geni dell'ADME o influenzarne la biochimica.

Il primo di questi gruppi, che comprende la superfamiglia degli enzimi del citocromo P450 è, ad oggi, il più studiato (Grossman. 2009).



**Figura 1:** Enzimi responsabili della fase I nel metabolismo dei farmaci, come è evidente, la maggior parte di essi fa parte della superfamiglia del citocromo P450 (Evans e Relling, 1999).

### 1.1.3 SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM (SNP)

Gli SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) sono polimorfismi in cui si osserva la variazione di una singola base all'interno di un gene. Questi polimorfismi possono trovarsi in vari punti di una sequenza genica, dalla regione codificante a quella non codificante, fino alla regione del promotore. Gli SNP che si trovano nella regione codificante hanno importanti conseguenze sulla funzionalità della proteina, dall'assenza di effetto, alla completa inattivazione. Il cambio nucleotidico nella sequenza genica fa sì che sussista una modifica nel codone e conseguentemente un cambiamento in fase di traduzione, infatti un cambio nucleotidico può risultare in un cambio aminoacidico, determinando la sintesi di una proteina mutata. Uno SNP che non comporta un cambio aminoacidico è definito sinonimo o silente, mentre un cambio nucleotidico che risulta in un codone di stop o nonsense, termina prematuramente la traduzione determinando la sintesi di una proteina tronca e, dunque, inattiva. Gli SNP possono avere effetti sostanziali anche quando sono localizzati al di fuori della regione codificante ed interessare la trascrizione, lo *splicing*, la degradazione e l'efficienza della traduzione.

Nell'uomo sono stati individuati oltre 11 milioni di SNP ed è stato stimato che i genomi di due individui non imparentati tra loro si differenzino per oltre 3 milioni di questi polimorfismi (Tzvetkov e von Ahsen, 2012). Questi 3 milioni di differenze genetiche danno un contributo significativo alla variabilità osservata nei fenotipi umani, sia nella suscettibilità alle malattie che nella risposta agli xenobiotici (Twyman, 2004) e a tal proposito la genotipizzazione degli SNP è diventata essenziale nell'era della farmacogenetica e della terapia personalizzata (Ahn et al., 2012).

#### 1.1.4 IL SIGNIFICATO DELLA FARMACOGENETICA IN SANITÀ PUBBLICA

È stato stimato che solo il 30-60% dei pazienti risponde in maniera appropriata al trattamento con farmaci di vario tipo come antidepressivi, beta-bloccanti, statine e antipsicotici. Le reazioni avverse al farmaco (*Adverse Drug Reaction*, ADR) rappresentano la sesta causa di morte negli Stati Uniti (Cohen, 2012), causano circa il 7% delle ammissioni ospedaliere, una frequenza che aumenta nel caso di pazienti ultrasessantenni (Ingelman-Sundberg e Sim, 2010), e sono spesso dovute a interazioni tra farmaci somministrati in politerapia e prescrizione di dosi o addirittura farmaci errati. Comunque una parte importante e sempre crescente delle ADR deriva dal polimorfismo genetico degli enzimi implicati nel metabolismo dei farmaci, oggetto di studio della ricerca farmacogenetica (Newman, 2012).

La farmacogenetica può influenzare la pratica medica suggerendo una selezione dei farmaci basata sulla genetica del paziente, facilitando e velocizzando la prescrizione ed evitando eventuali ADR (Newman, 2012; Blakey e Hall, 2011), fino ad arrivare alla terapia personalizzata, sorpassando il concetto del “*one size fits all*”, e prescrivere il giusto farmaco nel giusto dosaggio al giusto paziente (Mancinelli et al., 2000). Tale approccio personalizzato della terapia ha anche il potenziale di rendere la sanità economicamente più efficace: assicurare un migliore trattamento, prescrizioni più appropriate e l'identificazione delle sottopopolazioni a rischio di ADR può portare ad una diminuzione dei costi per il sistema sanitario (Mette et al., 2012).

La mancanza, nell'attuale pratica medica di un approccio personalizzato della prescrizione determina una somministrazione di farmaci e dosaggi basata su come il farmaco agisce in un campione random di individui. Di conseguenza,

l'aggiustamento terapeutico implica l'attuazione di un processo di tentativi ed errori per raggiungere l'effetto desiderato per ogni paziente. Con un approccio personalizzato, il medico può usare le informazioni derivanti dalle caratteristiche genetiche del paziente per selezionare il farmaco appropriato ed il giusto dosaggio (Cohen, 2012). Purtroppo, attualmente i dati farmacogenetici sono utilizzati per predire la risposta ai farmaci solo in sottogruppi di pazienti e non ancora allo scopo di stabilire una terapia personalizzata per il singolo paziente (Lesko e Schmidt, 2012).

## 1.2 IL CITOCROMO P450

La famiglia del citocromo P450 è una superfamiglia enzimatica di emoproteine coinvolte nel metabolismo di xeno ed endobiotici e responsabili di circa l'80% di tutto il metabolismo di fase I (Eichelbaum et al., 2006), sono generalmente localizzati a livello epatico ma vengono espressi anche in reni, polmoni, intestino tenue e cervello. Il citocromo P450 fu individuato per la prima volta nel 1958 da Martin Klingenberg (Klingenberg, 1958) e fu successivamente denominato P450 a causa del suo caratteristico picco di assorbanza a 450nm (chiamato picco di Soret), indice della funzionalità della proteina e differente da quello di tutte le altre emoproteine che invece assorbono la luce alla lunghezza d'onda di circa 420nm.

## 1.2.1 ISOFORME E POLIMORFISMI DEL P450 E RELATIVO SIGNIFICATO CLINICO

Nell'uomo sono stati finora identificati 57 geni funzionali e 58 pseudogeni, divisi in 18 famiglie e 44 sottofamiglie (Zanger e Schwab, 2013). Tutte le isoforme del citocromo P450 sono denominate con l'abbreviazione CYP seguita da un numero che ne indica la famiglia. I geni CYP umani sono estremamente polimorfici e i differenti alleli per ciascuna isoforma sono elencati nel sito internet *Human CYP allele nomenclature committee* ([www.cypalleles.ki.se](http://www.cypalleles.ki.se)). Il sito contiene informazioni riguardanti i geni CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2A13, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP2F1, CYP2J2, CYP2R1, CYP2S1, CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP3A43, CYP4A11, CYP4A22, CYP4B1, CYP5A1, CYP8A1, CYP19A1, CYP21A2 e CYP26A1; tutti i nuovi alleli scoperti, prima della pubblicazione, vengono revisionati in base ai criteri di inclusione contenuti nel sito. Nel 1996 fu introdotta una nomenclatura sistematica per gli alleli delle isoforme del P450: le varianti che condividono una mutazione chiave che apporta importanti effetti dal punto di vista funzionale o che determina un cambio aminoacidico, sono designate dallo stesso numero ma sono distinte da lettere nel caso in cui siano differenziate da mutazioni con un ruolo secondario (Ingelman-Sundberg et al. 2000; Ingelman-Sundberg and Oscarson 2002). L'allele *wild-type* è rappresentato, per tutti i geni, dall'allele \*1 la cui sequenza funge da sequenza di riferimento rispetto alla quale vengono riportate tutte le mutazioni individuate nei nuovi alleli. Attualmente sono state identificate più di 350 varianti alleliche funzionalmente differenti, come le varianti che influenzano la funzione e l'attività dei prodotti genici (Ingelman-Sundberg et al., 2007).

Il polimorfismo funzionale dei CYP consiste di delezioni e duplicazioni geniche,

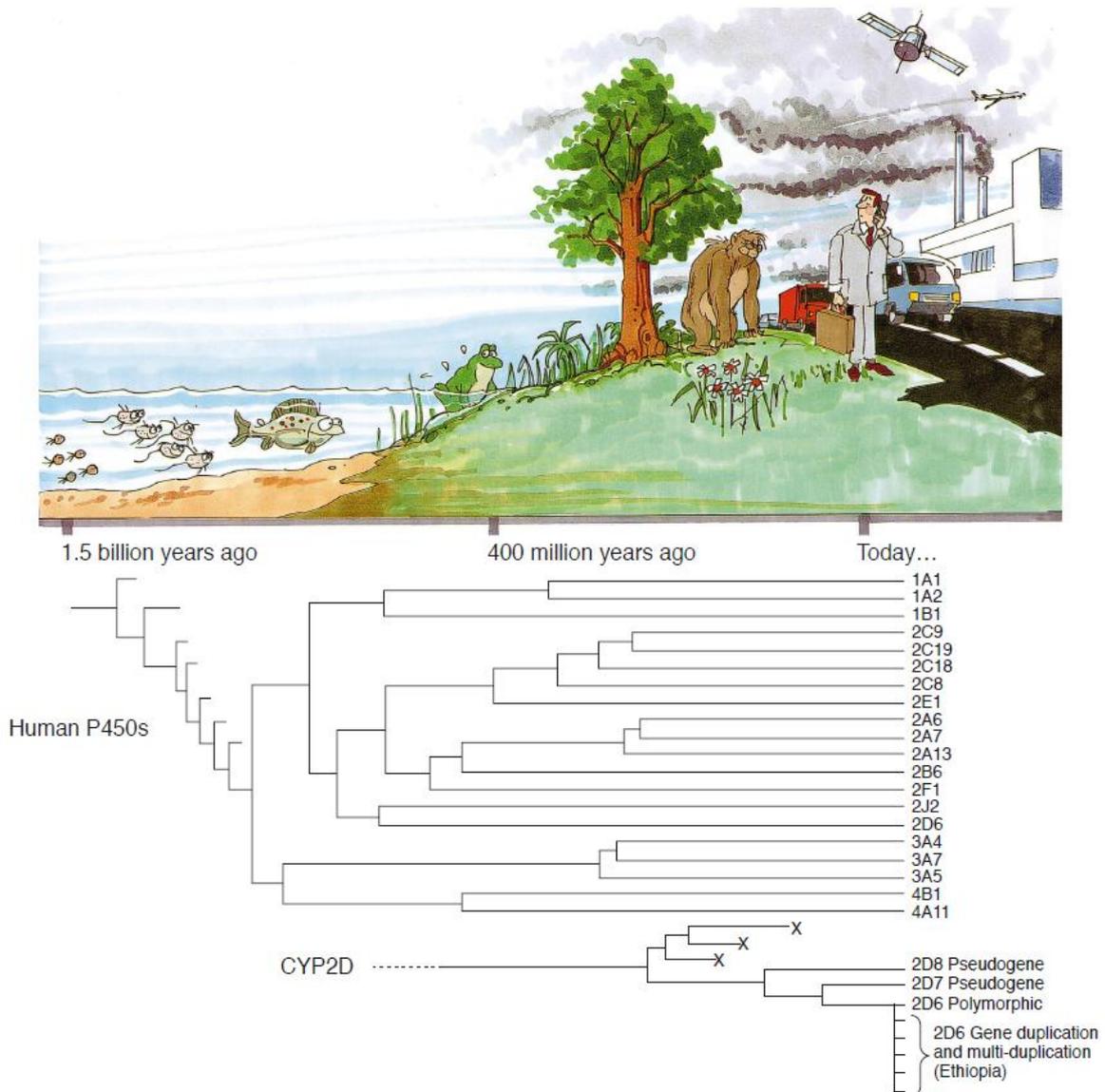
che causano un'attività aumentata o annullata; SNP, che possono causare cambi aminoacidici e determinare un'alterazione nella specificità per il substrato; inserzioni e delezioni, che possono causare uno spostamento nella lettura e codificare per enzimi inattivi. Non sono importanti solo le mutazioni presenti nella parte codificante del gene: le mutazioni presenti a livello intronico possono creare siti di *splicing* alterati che provocare un'alterata funzionalità proteica (Ingelman-Sundberg e Sim, 2010).

È interessante il fatto che i polimorfismi che determinano una perdita di funzionalità (*loss-of-function*) influenzano più spesso lo *splicing* e l'espressione rispetto alla trascrizione o la struttura proteica (Sadée et al., 2011) mentre le varianti che determinano un incremento della funzionalità (*gain-of-function*) includono il *copy number variation* (CNV) per il quale multiple copie di un allele funzionale possono provocare un incremento del dosaggio enzimatico (Johansson e Ingelman-Sundberg, 2008). L'impatto clinico del polimorfismo dei CYP deve essere considerato all'interno del contesto farmacologico. Le variazioni *loss-of-function* porteranno ad una diminuita *clearance* e ad un'aumentata concentrazione plasmatica del farmaco mentre le variazioni *gain-of-function* porteranno ad un aumento della *clearance* e ad una più bassa concentrazione di farmaco. Se il farmaco è farmacologicamente attivo, tali mutazioni determineranno un aumento e un decremento dell'effetto del farmaco, rispettivamente. Se il farmaco deve però essere metabolicamente attivato (profarmaco), ci si aspetta che accada il contrario. In questo caso è importante considerare l'attività o la tossicità del metabolita (Zanger e Schwab, 2013).

### 1.2.2 EVOLUZIONE DEL CITOCROMO P450

Gli enzimi del sistema del citocromo P450 sono presenti in tutti in tutti gli organismi viventi (procarioti ed eucarioti) ed essendo stati individuati nei principali tre domini degli organismi viventi, Batteri, *Archaea* ed Eucarioti, si pensa che i moderni citocromi debbano essersi originati da un gene ancestrale che esisteva approssimativamente 3,5 miliardi di anni fa (Nelson et al., 1993; Nelson et al., 1996). Si ritiene che l'origine dei polimorfismi del citocromo P450 sia frutto dell'interazione tra piante ed animali (Schuler, 1996). Le piante evolvono continuamente i loro *pathway* biosintetici con lo scopo di sintetizzare metaboliti secondari per i loro cicli riproduttivi e difendersi dai predatori. Quando gli animali colonizzarono la terra (Figura 4) e cominciarono a cibarsi di piante, le piante risposero evolvendo nuovi geni per sintetizzare metaboliti tossici. Al fine di proteggersi da queste nuove tossine, gli animali si adattarono a loro volta evolvendo nuovi geni per metabolizzare gli xenobiotici e superare, così, i continui cambiamenti del regno vegetale (Gonzalez e Nebert, 1990). È importante sottolineare che molti dei farmaci attualmente utilizzati nella pratica clinica derivano da metaboliti naturali delle piante e sono metabolizzati dalla superfamiglia di enzimi del citocromo P450. Un'altra particolarità evolutiva di questo sistema enzimatico è rappresentata dal verificarsi di un grande numero di duplicazioni geniche del P450 quando gli animali hanno cominciato a cibarsi di piante: la più forte pressione selettiva ad aver causato queste duplicazioni è presumibilmente di origine dietetica, con l'aggiunta di un ruolo fondamentale giocato dalle tossine vegetali. Contrariamente a ciò, non ci si aspetta in futuro nessuna selezione nella costituzione dei geni del P450 a causa dell'inquinamento perché il cancro, una possibile conseguenza dei processi inquinanti, insorge dopo

il periodo riproduttivo umano (Ingelman-Sundberg et a., 1999).



**Figura 2:** albero filogenetico delle famiglie geniche umane CYP1-CYP4 in relazione alla distanza evolutiva. La diversificazione dei geni del P450 ha avuto luogo in risposta ai cambiamenti ambientali, con il verificarsi di molte duplicazioni geniche in concomitanza alla colonizzazione terrestre degli animali. L'albero filogenetico specifico per il locus CYP2D è mostrato in basso in dettaglio. Tra gli Etiopi, gli alleli duplicati vengono generati frequentemente attraverso eventi di ricombinazione, contrariamente all'evoluzione del locus CYP2D nelle popolazioni caucasiche (Ingelman-Sundberg et a., 1999).

### 1. 3 CYP2D6

Il CYP2D6 è l'enzima implicato nel metabolismo dei farmaci più studiato nell'uomo, il suo polimorfismo è molto importante dal punto di vista clinico ed è stata la prima isoforma del sistema P450 ad essere caratterizzata a livello

molecolare (Ingelman-Sundberg, 2005). Questo enzima rappresenta solo una piccola percentuale di tutti i P450 epatici ma il suo ruolo nel metabolismo è particolarmente significativo, essendo responsabile del metabolismo di circa il 25% dei farmaci utilizzati nella pratica clinica (Zanger et al., 2004).

Il *CYP2D6* è un gene di 4.3 kilobasi (kb), fa parte di un cluster localizzato sul cromosoma 22 del quale fanno parte anche due pseudogeni *CYP2D7* e *CYP2D8P* ed è l'unico gene della sottofamiglia *CYP2D* che codifica per una proteina (Kimura et al., 1989). L'espressione del *CYP2D6*, contrariamente ad altre isoforme del P450, non è regolata da fattori ambientali o ormonali conosciuti e non è inducibile (Ingelman-Sundberg, 2005).

### 1.3.1 RUOLO NEL METABOLISMO

Il *CYP2D6* metabolizza un ampio numero di farmaci appartenenti a quasi tutte le classi come antiaritmici, antidepressivi triciclici e di seconda generazione, antipsicotici, beta-bloccanti, antitumorali come il tamoxifen e svariati analgesici oppioidi come codeina e tramadolo (Zanger et al., 2008; Stingl et al., 2012). Al fine di determinare l'ossidazione dei farmaci da parte del *CYP2D6* sono stati utilizzati farmaci altamente selettivi come debrisoquina, destrometorfano, metoprololo, sparteina e tramadolo (Frank et al., 2007). Questa particolare isoforma del P450 è implicata anche nella biotrasformazione di composti endogeni come la rigenerazione della serotonina dalla 5-metossitriptamina (Yu et al., 2003). Il *CYP2D6* può essere inibito da numerosi composti che legano l'enzima con un'altissima affinità pur non essendone substrati, come la quinidina e il metadone (Gelston et al., 2012). Alcuni di questi inibitori possono agire così energicamente

da cambiare il fenotipo del paziente: questo fenomeno è conosciuto come *phenocopying*. Quando invece è lo stesso substrato dell'enzima ad agire da inibitore, si parla di *autophenocopying* (Owen et al., 2009). La relazione tra la struttura e l'attività dei substrati e degli inibitori del CYP2D6 è stata fondamentale per lo sviluppo di modelli farmacocinetici (Lewis et al., 2004).

### 1.3.2 EVOLUZIONE DEL LOCUS CYP2D

In figura 4 è mostrata l'evoluzione del locus *CYP2D*. In Etiopia ha avuto luogo una diversa evoluzione del locus rispetto a quella verificatasi nella popolazione caucasica. In questa popolazione si sono originati alleli duplicati attraverso eventi di ricombinazione. Ciò indica che tale popolazione è stata sottoposta ad una forte pressione selettiva, probabilmente di origine dietetica. Secondo Clark, le duplicazioni geniche possono diffondersi solo se forniscono all'organismo un diretto vantaggio nei confronti dell'ambiente circostante (Clark, 1994), ma, più verosimilmente, gli alcaloidi, che mostrano un'affinità nanomolare per il CYP2D6, hanno esacerbato questa pressione basata sull'adattamento ai composti alimentari (Fonne-Pfister e Meyer, 1988). Nel caso della popolazione etiope, l'adattamento dietetico attraverso l'induzione non è stato possibile perché il CYP2D6 è un enzima non inducibile. Così l'adattamento si è verificato attraverso eventi di ricombinazione che hanno creato alleli duplicati e la selezione di individui che portavano duplicazioni o moltiplicazioni del *CYP2D6* rispetto a quelli che portavano alleli deleti o inattivi (Ingelman-Sundberg et al., 1999).

### 1.3.3 FENOTIPI DEL CYP2D6: CLASSIFICAZIONE E DEFINIZIONE

Il fenotipo di ossidazione dei farmaci viene normalmente stabilito mediante la somministrazione di un farmaco sonda e la successiva quantificazione dello stesso e dei suoi metaboliti a livello plasmatico e urinario. Sfortunatamente per molti enzimi del citocromo P450, la valutazione dell'attività dell'enzima nelle cellule del sangue non costituisce una valida alternativa a causa dei bassi livelli di espressione di questi enzimi nei linfociti. La più comune procedura utilizzata per determinare l'attività enzimatica è la determinazione del rapporto metabolico urinario (*metabolic ratio*, MR), ossia il rapporto tra la quantità di farmaco immodificato e la quantità di metabolita dello stesso farmaco che appaiono a livello urinario ad un determinato intervallo di tempo dopo la somministrazione di una dose singola di farmaco sonda. La determinazione della MR in diversi individui ha portato alla definizione di quattro fenotipi del CYP2D6: soggetti che mostrano assenza di metabolizzazione del farmaco sonda sono classificati come metabolizzatori lenti (*poor metabolizer*, PM), mentre quelli che lo metabolizzano vengono suddivisi in tre classi fenotipiche: metabolizzatori ultrarapidi (*ultrarapid metabolizer*, UM), metabolizzatori estensivi (*extensive metabolizer*, EM) e metabolizzatori intermedi (*intermediate metabolizer*, IM). Gli UM sono dotati di un'attività enzimatica estremamente elevata conferitagli dalla presenza di più di tre copie funzionali del gene; gli EM possiedono una capacità metabolica nella norma mentre gli IM metabolizzano i substrati più lentamente rispetto agli EM. (Zanger et al., 2004). Questa classificazione tradizionale dei fenotipi è, ad oggi, la più diffusa negli studi di popolazione ma, basandosi sull'assunzione della dominanza per la quale il fenotipo viene definito dall'allele con maggiore attività enzimatica, presenta delle limitazioni, poiché non considera la notevole variabilità interindividuale del

polimorfismo del *CYP2D6*: soggetti aventi lo stesso genotipo presentano infatti differenze fenotipiche definite dalla MR. Inoltre non tiene conto della sovrapposizione tra gruppi metabolici data la difficoltà nella definizione di un *cut-off* tra i soggetti EM e IM. A tal proposito, Gaedigk et al. hanno proposto un metodo alternativo denominato modello *Activity Score* (AS) che prevede l'assegnazione di un punteggio ad ogni allele secondo il grado di attività che presenta. Il punteggio conferito agli alleli funzionali è 1, quello degli alleli a funzionalità ridotta è 0,5 e quello conferito agli alleli nulli corrisponde a 0; inoltre, ogni allele, se duplicato, riceve un punteggio doppio, quindi alleli nulli duplicati riceveranno comunque un punteggio pari a 0. Questo metodo fornisce informazioni riguardo alla probabilità di un individuo di appartenere ad un determinato fenotipo (Gaedigk et al., 2008).

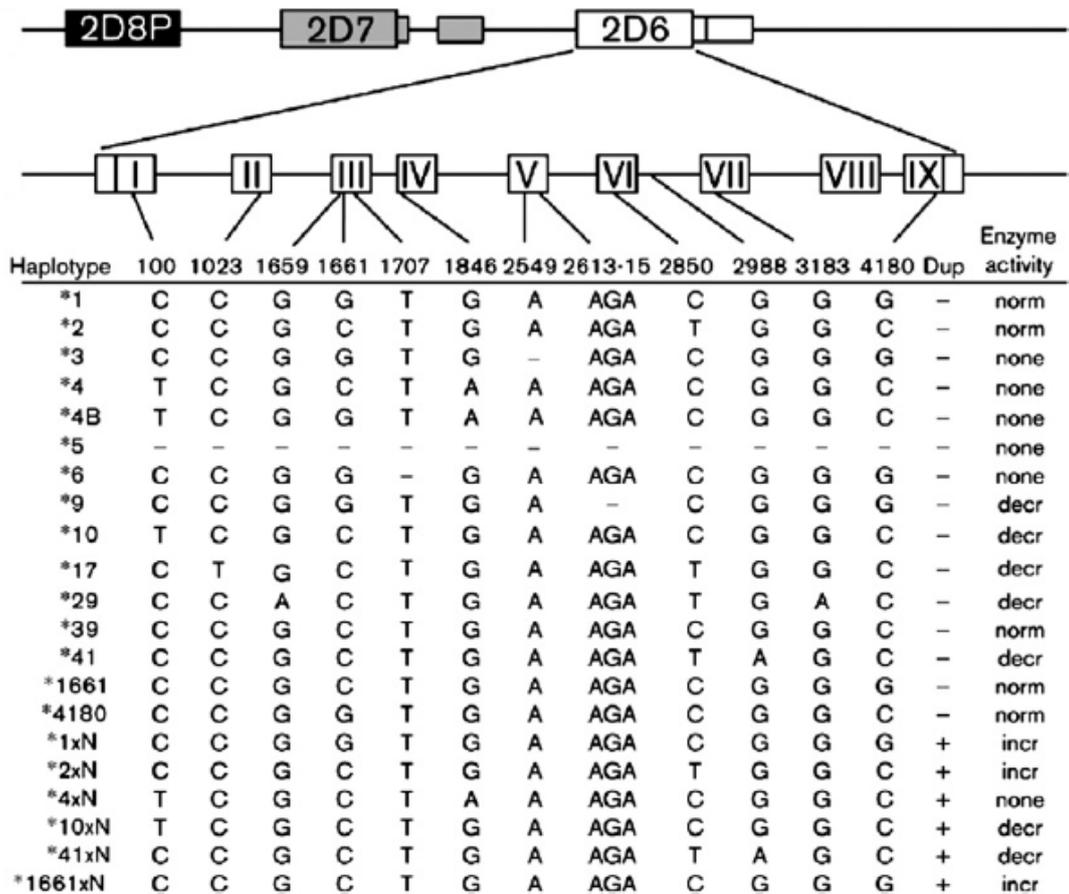
La correlazione tra le due classificazioni fenotipiche è illustrata in figura 3.

<b>Classical metabolism status</b>	<b>Activity score<sup>1</sup></b>	<b>Genotypes</b>
Poor metabolizer (PM)	0.0	Homozygous null gene
	0.5	Heterozygous null and reduced metabolism
Intermediate metabolizer (IM)	1.0	Homozygous reduced metabolism
		Heterozygous null and wildtype
Extensive metabolizer (EM)	1.5	Heterozygous reduced metabolism and wildtype
	2.0	Homozygous wildtype
Ultra-rapid metabolizer (UM)		Heterozygous null and ultra metabolism
		Heterozygous reduced and ultra metabolism
	> 2.0	Heterozygous wildtype and ultra metabolism
		Homozygous ultra metabolism

**Figura 3:** correlazione tra la classificazione tradizionale dei fenotipi *CYP2D6* e la classificazione fenotipica basata sul calcolo dell'*Activity Score* (Wu et al., 2011).

### 1.3.4 ALLELI DEL CYP2D6 E RELATIVO IMPATTO FUNZIONALE

Attualmente sono elencate sul sito CYPalleles (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles/>) 105 diverse varianti alleliche tra alleli a funzionalità normale, nulla, intermedia e aumentata (Figura 4).



**Figura 4:** Determinazione di 20 differenti aplotipi del CYP2D6 attraverso l'analisi di 12 posizioni SNP (Sistonen et al. 2007).

L'allele *wild-type* è rappresentato dall'allele 2D6\*1 che codifica per una proteina ad attività normale. Gli studi funzionali non hanno dimostrato un'alterata attività enzimatica anche per gli alleli 2D6\*2, \*27, \*33, \*35, \*39, \*48 e le relative sottovarianti. Gli alleli nulli codificano per una proteina a funzionalità annullata e possono causare il fenotipo PM, se presenti in omozigosi. Questi alleli possono

essere causati da mutazioni SNP o da piccole inserzioni o delezioni che interrompono il frame di lettura o che interferiscono con il corretto *splicing* determinando una terminazione prematura del prodotto proteico durante la sintesi, come per esempio gli alleli 2D6\*3, \*4, \*6, \*8, \*11, \*15, \*19, \*20, \*38, \*40, \*42, \*44. Solo alcuni alleli codificano per una proteina a lunghezza normale ma che comunque non è funzionale, ne sono esempio gli alleli 2D6\*7, \*12, \*14, \*18 (Zanger et. Al., 2004). Infine esistono alleli nulli che risultano tali grazie ad una intera delezione genica (2D6\*5, Gaedigk et al. 1991) o per via della formazione di un gene ibrido *CYP2D6/CYP2D7* (2D6\*13, \*16, Daly et al. 1996).

Altri alleli codificano per proteine a funzionalità ridotta. La riduzione dell'attività enzimatica è spesso dovuta ad una ridotta stabilità della proteina, ad un riconoscimento non ottimale del substrato od ad una diminuita affinità substrato-enzima e può essere substrato-dipendente. Mostrano un'attività diminuita, gli alleli 2D6\*10, \*14B, \*17, \*18, \*36, \*41, \*47, \*49, \*50, \*51, \*54, \*55 e \*57 (Zanger et al., 2004).

Il fenotipo UM è determinato dalla presenza di più di tre copie funzionali del gene, causata dalla duplicazione o dalla moltiplicazione genica di alleli funzionali (figura 7). Le duplicazioni e moltiplicazioni geniche sono il risultato di eventi di cross-over ineguale e altri meccanismi, ed interessano tutti i tipi di alleli del *CYP2D6*. La duplicazione è stata osservata inizialmente per l'allele \*2 (Bertilsson et al., 1993; Johansson et al., 1993) e in seguito per gli alleli 2D6\*1, \*4, \*6, \*10, \*17, \*29, \*35, \*43 e \*45 (Gaedigk et al. 2007). Non tutte le duplicazioni geniche coinvolgono geni funzionali e ciò complica la predizione del fenotipo (Gaedigk et al., 2012; Schaeffeler et al., 2003). Il risultato della duplicazione o moltiplicazione genica di alleli funzionali è un'attività metabolica estremamente aumentata.

## CYP2D6

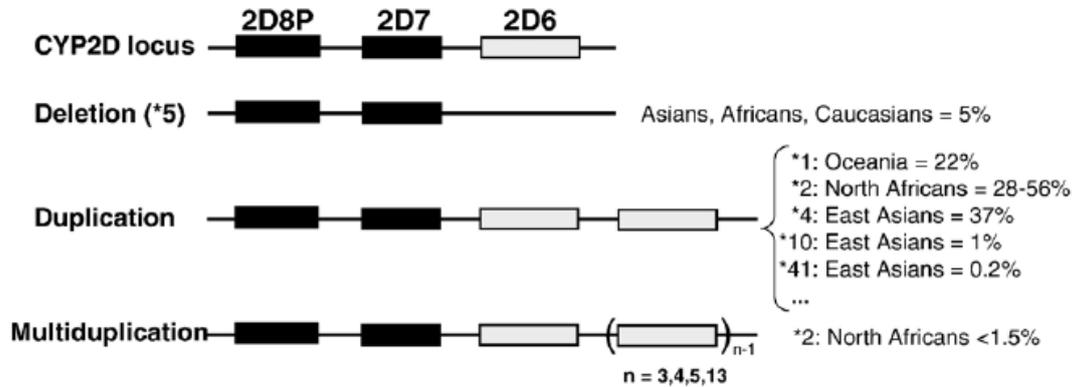


Figura 5: Copy number variation del CYP2D6 (Ingelman-Sundberg et al., 2007).

### 1.3.5 CENNI DI POPOLAZIONE

La distribuzione dei fenotipi del CYP2D6 varia nelle diverse etnie. Le varianti che mostrano una distribuzione geografica omogenea sono 2D6\*1 e 2D6\*2 e questo può essere il risultato di una pressione selettiva a lungo termine che mantiene un'alta frequenza per gli alleli funzionali. Nei caucasici il più frequente allele a funzionalità annullata è l'allele 2D6\*4, con una frequenza di circa il 20-25% e determina il 70-90% del fenotipo PM in questa etnia (Sachse et al., 1997; Griese et al., 1998). L'assenza dell'allele \*4 nelle popolazioni asiatiche, africane e sudamericane spiega la bassa frequenza del fenotipo PM in queste popolazioni mentre tra gli afro-americani se ne registra una frequenza intermedia. La delezione genica del *CYP2D6* (allele \*5) mostra una frequenza che va dal 3 al 5% in molte popolazioni mentre gli alleli nulli 2D6\*3 e \*6 nei caucasici raggiungono una frequenza dell'1-3% circa. Gli alleli a funzionalità nulla che considerati singolarmente appaiono più rari, collettivamente contribuiscono in maniera

significativa al fenotipo PM.

Il fenotipo IM è presente nelle maggiori etnie, ma sorprendentemente le mutazioni che causano tale fenotipo variano secondo le popolazioni. Circa il 10-15% dei caucasici è portatore di un allele difettivo (come ad esempio gli alleli 2D6\*41, \*9 e \*10) in combinazione con un allele nullo, generalmente il 2D6\*4. Il meccanismo dell'allele \*41, comune tra i caucasici, è stato a lungo studiato ed è causato da uno SNP nell'introne 6 che risulta in un corretto *splicing* solo per una frazione di mRNA, e che determina una bassa attività dell'enzima sia *in vitro* che *in vivo* (Toscano et al., 2006). Nelle popolazioni asiatiche e africane gli alleli a funzionalità diminuita più presenti sono, rispettivamente, gli alleli \*10 e \*17. L'allele \*17 ha una frequenza del 30% in Africa (Wennerholm et al., 2002) mentre l'allele \*10 arriva fino alla frequenza del 50% tra le popolazioni asiatiche (Sakuyama et al., 2008). La frequenza totale delle duplicazioni geniche nei caucasici varia tra l'1 e il 5% mentre in alcune popolazioni arabe, est-africane e del pacifico può raggiungere anche il 50%.

### 1.3.6 IMPATTO CLINICO DELLA VARIAZIONE GENETICA

Numerosi studi clinici documentano l'importanza clinica del polimorfismo del *CYP2D6* per la risposta e/o le reazioni avverse agli xenobiotici che vengono metabolizzati da questo enzima. Molti farmaci antiaritmici, ad esempio metoprololo, timololo, propafenone, vengono metabolicamente inattivati dal *CYP2D6* e ciò determina un aumento del rischio di reazioni avverse al farmaco nei soggetti PM e IM, nonostante gli effetti clinici siano ancora controversi (Fux et al., 2005; Darbar & Roden, 2006; Klotz, 2007; Mörike et al., 2008; Bijl et al., 2009;

Rau et al., 2009).

Un grande numero di antidepressivi ad antipsicotici sono substrati del CYP2D6 e generalmente il metabolismo ossidativo porta alla loro inattivazione con un conseguente rischio di ADR nei fenotipi PM e IM e un fallimento terapeutico in soggetti UM. Gli studi sugli effetti clinici non sono tuttora unanimi, forse per via delle problematiche di dosaggio relative a questi farmaci (Kirchheiner et al., 2004; Bertilsson, 2007; Crisafulli et al., 2011; Stingl et al., 2012).

Farmaci oppioidi come codeina, diidrocodeina, ossicodone e tramadolo, utilizzate nella terapia del dolore sono metabolizzate dal CYP2D6 ed è stata dimostrata l'influenza del genotipo sull'efficacia e sulla sicurezza di queste sostanze (Stamer et al., 2010; Leppert, 2011; Madadi et al., 2012). Il profarmaco codeina è o-demetilato via CYP2D6 nel suo composto analgesico farmacologicamente attivo, la morfina. Gli individui PM non possono quindi ottenere da questo farmaco alcun effetto analgesico per via di una concentrazione plasmatica troppo bassa (Eckhardt et al., 1998). Per contro, è stata osservata un'aumentata efficienza della codeina e, a volte, una intossicazione da oppioidi in pazienti con multiple copie attive del gene e in neonati allattati da madri UM, dati coerenti con gli alti tassi di conversione di codeina in morfina in pazienti con fenotipo UM (Gasche et al., 2004; Koren et al., 2006; Madadi et al., 2009).

Il tamoxifen viene metabolizzato in circa 22 metaboliti, due dei quali, 4-idrossitamoxifen e endoxifen, paiono essere i composti responsabili dell'effetto antiestrogenico per via della loro alta affinità per il recettore dell'estrogeno (Johnson et al., 2004; Mürdter et al., 2011). Dato che il CYP2D6 è l'enzima più importante per la 4-idrossilazione del tamoxifen (Dehal & Kupfer, 1997; Coller et al., 2002; Johnson et al., 2004), il suo polimorfismo genetico dovrebbe influenzare

le concentrazioni plasmatiche di questi metaboliti attivi e, conseguentemente, l'esito del trattamento (Brauch et al., 2009). Questa ipotesi è stata vagliata per più di una decade e studi retrospettivi hanno mostrato che i soggetti PM per il *CYP2D6* mostravano meno benefici dalla terapia con tamoxifen rispetto ai soggetti con un metabolismo normale (Goetz et al., 2007; Schroth et al., 2007). I risultati provenienti da studi successivi sull'argomento, hanno confermato o smentito tale ipotesi (Schroth et al., 2009; Madlensky et al., 2011; Kiyotani et al., 2012; Irvin et al., 2011; Rae et al., 2012; Regan et al., 2012; Abraham et al., 2010). Una possibile spiegazione a questa discordanza nei risultati include un numero di fattori di confondimento che non sono stati presi in considerazione, da tali studi, in maniera sistematica, come chemioterapia precedente, inibizione enzimatica data da politerapia e menopausa, oltre che a diversi metodi di genotipizzazione (Brauch et al., 2013; Nakamura et al., 2012; Pharoah et al., 2012; Stanton, 2012). Inoltre il *CYP2D6* è stato studiato come fattore di rischio in molte malattie come il Parkinsonismo (Christensen et al., 1998), la schizofrenia ed altri disturbi psichiatrici (Patsopoulos et al., 2005; Stingl et al., 2012), l'Alzheimer (Scordo et al., 2006) e alcune forme di cancro (Agundez et al., 2004; Rodriguez-Antona et al., 2010).

### 1.3.7 METABOLISMO DI COMPOSTI ENDOGENI A LIVELLO CEREBRALE

Il *CYP2D6* è largamente espresso a livello cerebrale anche se la sua funzione non è ancora stata pienamente compresa. Nell'uomo esistono evidenze dell'espressione di questo gene e del suo mRNA a livello neuronale, e

preferenzialmente in ippocampo, talamo, ipotalamo, *substantia nigra*, cervelletto e neocorteccia (Siegle et al., 2001).

Studi in vitro suggeriscono il coinvolgimento del CYP2D6 nella biosintesi di importanti molecole endogene a livello cerebrale, come la dopamina e la 5-metossitriptamina (Yu et al., 2003; Bromek et al., 2011). Nei soggetti PM per il CYP2D6 si possono osservare differenze nelle funzioni cerebrali e comportamentali, dovute ad una alterata produzione di neurotrasmettitori endogeni. Ansia e impulsività sono state infatti associate al fenotipo PM (Peñas-Lledó et al., 2009). Gli individui PM presentano minori livelli di serotonina rispetto ai metabolizzatori normali (Kirchheiner et al., 2005) e ciò può avere implicazioni a livello comportamentale su tratti come ansia e impulsività, generalmente attribuiti ad un basso tono serotoninergico (Gonzalez et al., 2008). Inoltre, rispetto ai metabolizzatori normali, i soggetti PM sembrano avere un'aumentata attività cerebrale nel talamo e nell'ippocampo, due regioni ove esiste un'alta espressione dell'enzima CYP2D6 (Kirchheiner et al., 2011).

Oltre all'associazione tra ansia e soggetti PM, è stata trovata un'associazione tra i disordini alimentari e il numero di copie attive del gene CYP2D6. I pazienti con disordini alimentari sembrano avere una distribuzione allelica atipica caratterizzata da un'aumentata frequenza di individui con due o più geni attivi ed una più bassa frequenza di individui con uno o zero geni attivi. Questo pattern di distribuzione suggerisce che i pazienti con disordini alimentari potrebbero avere un'aumentata attività enzimatica del CYP2D6 (Peñas-Lledó et al., 2010).

## 1.4 CYP2C9/CYP2C19

Le isoforme *CYP2C9* e *CYP2C19*, insieme alle isoforme *CYP2C8* e *CYP2C18*, fanno parte della sottofamiglia *CYP2C*, localizzata nel cromosoma 10. Il *CYP2C9* è il membro più espresso, al pari del *CYP3A4*, mentre il *CYP2C19* ha un livello di espressione dalle 2 alle 10 volte minore (Coller et al., 2002; Koukouritaki et al., 2004; Rettie e Jones, 2005). La forte differenza di espressione tra le due isoforme è dovuta in parte all'incapacità del promotore del *CYP2C19* di essere attivato dal fattore nucleare HNF4 $\alpha$ , nonostante la presenza, in entrambi i promotori di questi geni, di simili siti di legame per questo fattore (Kawashima et al., 2006). Il *CYP2C9* metabolizza non solo farmaci come warfarin, fenitoina, acido valproico, tolbutamide e molti FANS (Lee et al., 2002) ma anche substrati endogeni come acido arachidonico e alcuni steroidi, inoltre è inibito da vari composti e ciò può avere rilevanza clinica in caso di trattamento con warfarin (Lu et al., 2008).

Il *CYP2C19* è stato il primo enzima della sua sottofamiglia ad essere scoperto grazie al suo polimorfismo genetico risultante nei fenotipi EM e PM nel metabolismo della s-mefenitoina (Küpfer e Preisig, 1984). In seguito è stato dimostrato un coinvolgimento di questo enzima nel metabolismo degli inibitori della pompa protonica, come omeprazolo e pantoprazolo, e nella bioattivazione dell'anticoagulante clapidogrel (Dansette et al., 2011; Boulenc et al., 2012; Hulot et al., 2006; Kazui et al., 2010). Il *CYP2C19* ha anche un ruolo importante nel metabolismo di molti antidepressivi di prima e seconda generazione (Brøsen et al., 2004) e di substrati endogeni come progesterone e melatonina.

### 1.4.1 POLIMORFISMO GENETICO, FUNZIONALITÀ E IMPATTO CLINICO

Tra i 35 alleli elencati nella pagina del CYPalleles dedicata al *CYP2C9*, i due alleli più studiati sono *2C9\*2* e *\*3* (Rettie e Jones, 2005). La frequenza globale delle due varianti è rispettivamente del 7% e del 4% ma la loro frequenza nelle popolazioni africane e asiatiche è generalmente bassa, mentre l'allele *\*2* è presente in circa il 10% dei caucasici. Nonostante entrambi influenzino l'attività enzimatica del *CYP2C9* rendendolo inattivo, comparato con l'allele *\*2*, l'allele *\*3* pare ridurre maggiormente l'attività, riducendola dal 70 al 90%. Tra gli alleli a funzione ridotta, ne esistono anche di più rari come *2C9\*5*, *\*6*, *\*8* e *\*11*, sebbene l'allele *\*8* sia stata riconosciuta come la variante più frequente tra gli afro-americi (Scott et al., 2009). La variabilità genetica del *CYP2C9* è un fattore riconosciuto per le ADR dato che i suoi substrati sono farmaci con un basso indice terapeutico e molti studi hanno dimostrato il significato clinico delle varianti alleliche *\*2* e *\*3* per molti dei farmaci che il *CYP2C9* metabolizza. Data la loro frequenza nella popolazione caucasica, esistono dall'1 al 2% di omozigoti ed emizigoti che possono esperire ipoglicemia in risposta al trattamento con ipoglicemizzanti (Holstein et al., 2005; Xu et al., 2009); emorragie gastrointestinali per utilizzo di FANS, soprattutto in pazienti anziani (He et al., 2011); ed emorragia in risposta al trattamento con anticoagulanti tra cui il warfarin è probabilmente il più studiato in relazione al polimorfismo del *CYP2C9* e per il quale esistono algoritmi per un dosaggio farmacogeneticamente guidato (Schwab e Schaeffeler, 2011; Jonas e McLeod, 2009).

Il *CYP2C19* è una delle isoforme del P450 più rilevanti dal punto di vista clinico e l'esistenza di alleli nulli piuttosto comuni spiega la grande variabilità e la forte

associazione genotipo-fenotipo trovate per questo gene. Circa il 25% degli asiatici e circa il 2-5% delle altre popolazioni presenta un fenotipo PM per questa isoforma. I due alleli nulli più importanti sono 2C19\*2, frequente nei caucasici, e l'allele \*3, diffuso in Asia. L'allele \*2 è causato da una mutazione sull'esone 5 e determina uno *splicing* aberrante (de Morais et al., 1994b) mentre la mutazione che causa l'allele \*3 è localizzata sull'esone 4 e causa la sintesi di una proteina tronca (de Morais et al., 1994a). Un'ulteriore variante clinicamente rilevante è l'allele \*17, causata da una mutazione sul promotore e che pare determinare un aumento dell'espressione genica (Sim et al., 2006). Infine altri alleli rari come il 2C19\*4 e \*8 con una penetranza fenotipica sconosciuta sono elencati nel sito web del CYPalleles.

L'effetto del polimorfismo del *CYP2C19* sulla terapia contro *H. pylori* in pazienti con ulcera, è un particolare esempio di farmacogenetica clinica (Klotz et al., 2006; Furuta et al., 2004). Questa terapia implica la somministrazione di diversi antibiotici insieme ad un inibitore della pompa protonica che contribuisce ad accelerare la guarigione dell'ulcera e aumenta l'efficienza della terapia antibiotica. Dato il contributo del *CYP2C19* al metabolismo degli inibitori della pompa protonica come pantoprazolo, lansoprazolo ed omeprazolo, l'aumento del pH intragastrico e l'esito della terapia dipendono anche dal genotipo *CYP2C19* del paziente (Furuta et al., 1998; Klotz et al., 2004; Furuta et al., 2007). Di conseguenza, dato il largo utilizzo degli inibitori della pompa protonica, conoscere il genotipo di questo gene diventa importante ai fini clinici (Schwab et al., 2004, 2005). Sono stati documentati, inoltre, effetti farmacocinetici su parecchi antidepressivi come clomipramina, citalopram e amitriptilina (Nielsen et al., 1994; Tai et al., 2002; Steimer et al., 2005), e su benzodiazepine come diazepam e

clobazam (Bertilsson et al., 1989; Kosaki et al., 2004). Il gene *CYP2C19* mostra anche un impatto sostanziale sulla farmacocinetica dell'antimicotico voriconazolo (Mikus et al., 2011) e dell'antimalarico proguanil (Kerb et al., 2009). Recenti studi sono stati incentrati sul coinvolgimento del *CYP2C19* come determinante genetico nell'efficacia del clopidogrel, un antiaggregante piastrinico, ed hanno confermato che i soggetti con un metabolismo lento mostrano un minor effetto anticoagulante del clopidogrel a cui è associato un più alto rischio di reazioni avverse di tipo cardiovascolare (Sofi et al., 2011; Simon et al., 2009; Collet et al., 2009; Mega et al., 2009).

## 1.5 CYP3A4/CYP3A5

La sottofamiglia *CYP3A* del sistema P450 è localizzata sul cromosoma 7 ha una grandezza di 231 kb e consta di tre geni, *CYP3A4*, *CYP3A5* e *CYP3A7*. Il *CYP3A4* è espresso maggiormente a livello epatico ed è l'isoforma del sistema P450 più espressa a livello intestinale, contribuendo in maniera sostanziale all'effetto di primo passaggio dei farmaci a somministrazione orale, mentre in altri tessuti extraepatici, inclusi tratto respiratorio, cervello, polmoni e reni, l'espressione del *CYP3A5* sembra essere predominante o simile a quella del *CYP3A4* (Ding e Kaminsky, 2003; Daly et al., 2006). Infine, il *CYP3A7* pare essere espresso maggiormente a livello fetale, anche se non è stato ancora studiato in dettaglio (Leeder et al., 2005). La sottofamiglia *CYP3A* gioca un ruolo fondamentale nel metabolismo di circa il 30% dei farmaci usati in pratica clinica (Zanger et al., 2008). Il sito attivo del *CYP3A4* è ampio e flessibile e permette il

legame con composti lipofilici con grandi strutture (Hendrychová et al., 2011) come per esempio gli immunosoppressori come la ciclosporina A, antibiotici come l'eritromicina e farmaci chemioterapici come il taxol. Anche molecole più piccole possono legarsi al sito attivo come ifosfamide, tamoxifen, benzodiazepine, numerose statine, antidepressivi ed oppioidi. Il CYP3A4 è anche importante nel catabolismo degli steroidi endogeni come testosterone, progesterone, androstenedione, cortisolo e acidi biliari. La grande omologia tra le sequenze del CYP3A4 e del CYP3A5 (circa l'85%) porta ad una grande somiglianza nella selettività per i substrati tra le due isoforme (Williams et al., 2002).

### 1.5.1 POLIMORFISMO GENETICO, FUNZIONALITÀ E IMPATTO CLINICO

Una delle varianti polimorfiche più comunemente studiate del CYP3A4 è l'allele 3A4\*1B, determinato dalla mutazione di uno SNP vicino alla regione del promotore (-392A>G), presente nel 2-9% della popolazione caucasica e con frequenze più alte in Africa (48-80%). Questo allele è stato inizialmente associato con una maggiore severità del tumore alla prostata (Rebeck et al., 1998) e l'associazione tra il 3A4\*1B con uno stato avanzato della malattia è stato confermato da altri studi (Keshava et al., 2004; Perera, 2010). L'allele 1B è stato associato con una riduzione dell'espressione o dell'attività enzimatica del CYP3A4 (Dally et al., 2003) ma l'effetto funzionale di questa variante rimane controverso, nonostante siano stati condotti numerosi studi *in vitro* e su fegati umani (Klein et al., 2012; Rodríguez-Antona et al., 2005). Una recente scoperta che andrebbe sottolineata è la variante 3A4\*22 che pare portare ad una diminuita espressione genica (Klein et

al., 2012).

Per quanto riguarda il *CYP3A5*, l'allele più comune a funzionalità ridotta è l'allele 3A5\*3, causato da una mutazione nell'introne 3 che crea un sito accettore alternativo di *splicing* aberrante e porta alla sintesi di una proteina tronca (Kuehl et al., 2001). Questa variante è presente in tutti i gruppi etnici ad oggi tipizzati e mostra grandi differenze di frequenza tra le maggiori etnie (Kuehl et al., 2001). Molti studi si sono occupati di studiare il contributo della genetica del 3A5\*3, dimostrando una forte associazione tra questo allele e una minore clearance del tacrolimus, una più alta concentrazione plasmatica e la necessità in pazienti portatori di quello allele di una minor dose di farmaco (Staatz et al., 2010a, 2010b).

L'allele 3A5\*6 è provocato da una mutazione nell'esone 7 che, per via di uno *splicing* aberrante, porta ad un mRNA che manca dell'esone 7, questa variante è stata rilevata per ora solo in popolazioni di origine africana (Kuehl et al., 2001; Roy et al., 2005). Un altro allele nullo è la variante 3A5\*7 che include una mutazione *frame-shift* (Hustert et al., 2001). Considerando complessivamente queste tre varianti alleliche, solo una piccola percentuale dei caucasici ed una più grande frazione di africani ed asiatici possiede una copia funzionale del gene (allele \*1, *wild-type*). In questi individui il *CYP3A5* può contribuire notevolmente al metabolismo dei farmaci, particolarmente per quei substrati che sono metabolizzati preferenzialmente dal *CYP3A5* e per quei soggetti con una bassa espressione di *CYP3A4* (Zanger et al., 2013).

## 1.6 ABCB1

Tra i geni implicati nel metabolismo dei farmaci, esiste anche una classe di geni codificanti per proteine di trasporto, responsabili dell'assorbimento e dell'escrezione dei farmaci fuori e dentro la cellula. La glicoproteina P (P-gp) è un membro della famiglia dell'ATP binding cassette, è codificata dal gene *ABCB1* ed è una glicoproteina di membrana con funzione di pompa. La funzione della glicoproteina P è di trasportare i farmaci dal dominio intracellulare a quello extracellulare. Questa proteina di trasporto è espressa in molti tessuti come quello epatico, renale e intestinale, inoltre è espressa nell'epitelio del plesso corioideo cerebrale e sull'epitelio luminale dei capillari sanguigni della barriera ematoencefalica oltre che in placenta, ovario e testicoli. Ciò suggerisce che la glicoproteina P agisca da barriera protettiva dagli xenobiotici (Marzolini et al., 2004). La P-gp ha inoltre effetti sulla farmacocinetica di una grande varietà di farmaci, come antitumorali, digossina, statine, antistaminici e molti altri.

L'*ABCB1* è un gene composto da 29 esoni localizzato sul cromosoma 7. Sono stati osservati oltre 50 SNP e polimorfismi di inserzione e delezione sul cDNA di questo gene, anche se molti di questi sono silenti e non producono un cambio nella sequenza polipeptidica (Brinkmann et al., 2001; Saito et al., 2002; Evans e McLeod, 2003; Schwab et al., 2003). Nei vari gruppi popolazionistici, i tre SNP più comunemente osservati sono 1236C >T nell'esone 12, 2677G >T /A nell'esone 21 e 3435C >T nell'esone 26: questi tre SNP sono stati studiati nell'ambito di studi di associazione con risultati controversi (Leschziner et al., 2007). La mutazione sullo SNP 1236C >T è una mutazione sinonima che non porta ad un cambio aminoacidico. L'allele *wild-type* ha una frequenza del 30-93% a seconda della popolazione mentre l'allele T è molto frequente in Asia. Nonostante siano stati

intrapresi vari studi per caratterizzare potenziali associazioni fenotipiche per questo SNP, la letteratura riporta comunque risultati contrastanti (Leschziner et al., 2007). Lo SNP triallelico 2677G >T /A determina un cambio aminoacidico nella serina 893. L'allele T ha una frequenza molto variabile nelle varie popolazioni mentre la quella dell'omozigote GG è dell'81% nelle popolazioni africane rispetto alla frequenza del 10-32% riscontrata in indo-americani, messicani, italiani, asiatici e caucasici. Infine l'allele A raggiunge una frequenza massima del 17% in diverse etnie (Cascorbi et al., 2001; Yamauchi et al., 2002). Per quanto riguarda l'associazione fenotipica di questo SNP, esistono evidenze contrastanti (Leschziner et al., 2007). Lo SNP sinonimo 3435C>T mostra una grande variabilità interetnica con una frequenza dell'allele C che varia dal 34 al 90% in tutte le popolazioni (Schwab et al., 2003; Sakaeda et al., 2003; Dey, 2006). Nel 2000 Hoffmeyer et al. hanno mostrato un'associazione tra l'allele T di questo SNP e una minore espressione della P-gp. Questo dato ha destato interesse per questo polimorfismo ma, ad oggi, questa associazione non è stata confermata (Leschziner et al., 2007).

Gli SNP sopra descritti si trovano tra loro in forte *Linkage Disequilibrium* (LD) e sono stati frequentemente studiati e descritti sotto forma di aplotipi. Un aplotipo, per definizione, non è legato ad una regione genica, ma aplotipi gene-specifici possono assumere designazioni alleliche nella letteratura. Il sequenziamento dell'*ABCB1* in differenti gruppi etnici ha portato alla designazione di "*star alleles*", generalmente usati nella designazione allelica del Citocromo P450, ed altri geni del metabolismo dei farmaci. Gli "*star alleles*" sono definiti in base ad una sequenza di riferimento denominata \*1. L'allele *ABCB1*\*1 contiene l'aplotipo CGC ma attualmente non sono stati designati altri alleli di questo gene in maniera

convenzionale ed uniforme (Hodges et al., 2011). Gli aplotipi CGC o TTT sono stati osservati come molto frequenti in varie etnie. Ovviamente la frequenza aplotipica varia a seconda dei gruppi etnici, per esempio l'aplotipo TTT è molto meno frequente in Africa rispetto alle popolazioni asiatiche e caucasiche (Kim et al., 2001; Kroetz et al., 2003; Tang et al., 2002). Questi aplotipi potrebbero giocare un importante ruolo nella risposta ai farmaci e nella suscettibilità alle malattie e studiare le mutazioni sul gene *ABCB1* attraverso l'analisi degli aplotipi potrebbe rappresentare una migliore strategia per l'associazione con la funzionalità dell'enzima (Fung e Gottesman, 2009). Eccetto due studi che riportano un'associazione tra l'aplotipo TTT e un'aumentata esposizione alla digossina in europei e cinesi (Aarnoudse et al., 2008; Xu et al., 2008) e uno studio che dimostra una maggiore suscettibilità allo sviluppo del carcinoma della mammella nei portatori dell'aplotipo TTT (Wu et al., 2012), ad oggi gli studi di associazione per gli aplotipi dell'*ABCB1* sono stati inconcludenti (Leschziner et al., 2007) e l'effetto del polimorfismo dell'*ABCB1* sull'attività della glicoproteina P resta ancora controverso (Yoo et al., 2011).



# CAPITOLO 2: LA NARCOLESSIA

---

## 2.1 STORIA

La narcolessia con cataplessia è una ipersonnia del Sistema Nervoso Centrale caratterizzata principalmente da eccessiva sonnolenza diurna (*excessive daytime sleepiness*, EDS) e anomale manifestazioni di sonno REM (*rapid eye movement*) dissociato, che includono: cataplessia, ossia l'improvvisa perdita di tono muscolare in seguito a forti emozioni, con coscienza preservata; allucinazioni ipnagogiche e/o ipnopompiche, ossia esperienze sensoriali intense e vivide che si verificano all'addormentamento e/o al risveglio; e paralisi del sonno, per cui il paziente, all'addormentamento o al risveglio esperisce una paralisi transitoria dell'ordine, in media, di alcune decine di secondi. A questa classica cosiddetta tetraide narcolettica, si aggiunge il sonno notturno disturbato da numerosi risvegli.

Il primo studioso a dare una descrizione clinica della malattia che venne poi denominata *narcolessia* fu Carl Friedrich Otto Westphal, neurologo e psichiatra berlinese, nel 1877. Il caso da lui presentato riportava attacchi di debolezza muscolare in stato di coscienza, attacchi di sonno e sonno notturno disturbato. In precedenza erano stati presentati altri casi simili, ma la loro descrizione non escludeva altre forme di ipersonnia. Tre anni dopo, Jean-Baptiste-Édouard Gélinau, un medico francese, realizzò che l'insieme di questi sintomi rappresentava una distinta entità clinica, un *morbus sui generis* da lui denominato narcolessia (Overeem et al., 2001; Fromherz et al., 2004).

Nel 1902, Loewenfeld fu il primo studioso a riconoscere un'associazione tra gli attacchi di sonno e le paralisi temporanee della muscolatura somatica in seguito ad attacchi di rabbia o risata ed altri forti stati emozionali (Sturzenegger e Bassetti, 2004), ma fu Henneberg nel 1916 a dare un nome a questo particolare sintomo introducendo per la prima volta il termine *cataplessia* (Henneberg, 1916). Nel corso del XX secolo la definizione clinica della malattia andò via via delineandosi, prima grazie all'introduzione della tetradè classica dei sintomi della narcolessia da parte di Yoss and Daly (1957), poi grazie alla scoperta di Vogel del 1960, secondo cui gli elettroencefalogrammi dei pazienti affetti da narcolessia presentavano insorgenza precoce di sonno REM. Vogel, in realtà, interpretò questa scoperta come prova che la narcolessia fosse una sindrome psicogena ma, nonostante ciò, la sua scoperta fu fondamentale per comprendere che cataplessia, allucinazioni ipnagogiche e paralisi del sonno sono tutte manifestazioni del sonno REM (Overeem et al., 2001).

Negli anni '70, la scoperta della narcolessia in modelli naturali di cane aprì la strada ad una nuova era della ricerca che portò prima alla scoperta della trasmissione della malattia come tratto recessivo autosomico nei Doberman Pinschers e Labrador Retrievers (Mignot et al., 1991) e, successivamente, alla scoperta nel 1999 e nel 2001 che la narcolessia canina familiare e sporadica hanno cause distinte, ma sono entrambe il risultato di una diminuzione della trasmissione di ipocretina (Lin et al., 1999; Ripley et al., 2001). Infatti, la scoperta della famiglia delle ipocretine nel 1998 (de Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998), fondamentale per comprendere la regolazione interdipendente dei cicli sonno-veglia, dell'appetito e della locomozione (Willie et al., 2001) e la successiva dimostrazione che anche i pazienti affetti da narcolessia con cataplessia

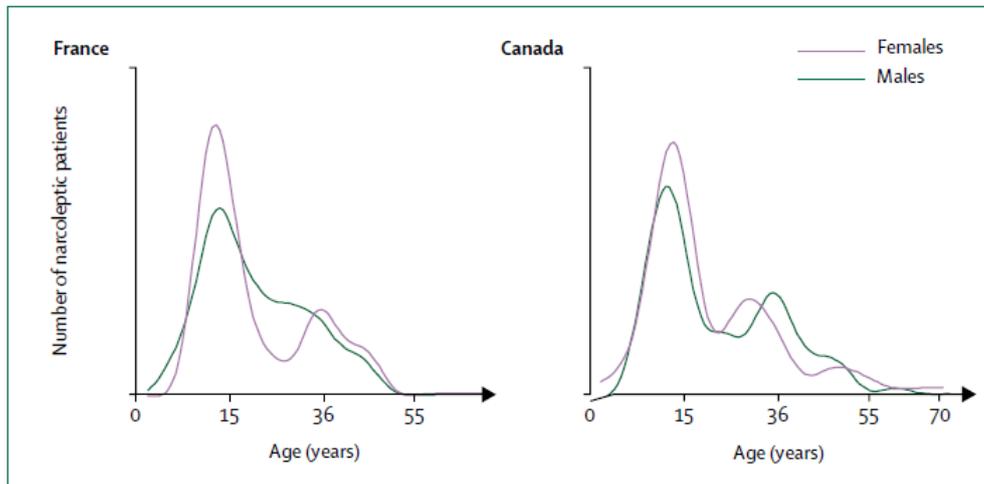
presentavano bassi livelli di ipocretina nel liquido cefalo-rachidiano (Mignot et al., 2002) ha definitivamente rilanciato lo studio di questa rara malattia, le cui pubblicazioni a riguardo si sono moltiplicate.

## 2.2 EPIDEMIOLOGIA

Come molte altre malattie rare, la narcolessia è spesso sottostimata o mal diagnosticata portando ad un ritardo diagnostico medio di circa 8 anni (Morrish et al., 2004), pertanto l'esatta prevalenza della malattia non è ancora conosciuta. In ogni caso, la prevalenza stimata della narcolessia va dai 168 ai 799 casi su 100.000, nonostante studi effettuati sulla popolazione giapponese ne rivelino una maggiore, di 1600 su 100.000 (Longstreth et al., 2007). L'incidenza stimata, grazie ad uno studio effettuato su una popolazione del Minnesota tra il 1960 e il 1989 nell'ambito del *Rochester Epidemiology Project*, è di 0,74 su 100.000 persone in un anno per la diagnosi di narcolessia con cataplessia e di 1,37 su 100.000 persone in un anno per la diagnosi di narcolessia con e senza cataplessia, tenendo conto che la prevalenza della narcolessia senza cataplessia è più difficile da accertare poiché la patologia in gran parte dei casi non viene diagnosticata (Silber et al., 2002); comunque questo sottogruppo potrebbe rappresentare dal 10 al 50% della popolazione narcolettica (Wise et al., 2007; Mignot et al., 1997).

La narcolessia può insorgere ad ogni età., tuttavia, la maggioranza dei pazienti mostra i primi sintomi tra i 10 e i 25 anni (Ohayon et al., 2005), e, nel corso della vita, si osserva una distribuzione bimodale con un picco più alto verso i 15 anni e uno più basso verso i 36 anni d'età (figura 6, Dauvilliers et al., 2001). Gli uomini

sembrano essere colpiti dalla malattia 1,6 volte più delle donne (Longstreth et al., 2007).



**Figura 6:** curve di densità dell'età di insorgenza della narcolessia in pazienti provenienti da Francia e Canada (Dauvilliers et al., 2001).

La comparazione tra pazienti con insorgenza precoce o tardiva ha inoltre dimostrato che tra gli individui che hanno sviluppato la malattia prima dei 27 anni esiste una più alta frequenza di cataplessia e una più frequente storia familiare di diagnosi di narcolessia (Dauvilliers et al., 2001).

Nonostante le specifiche cause della narcolessia rimangano tutt'ora sconosciute, sembra che fattori sia genetici che ambientali partecipino allo sviluppo del disturbo. A supporto di un contributo di origine ambientale, esiste l'evidenza per cui la sintomatologia si manifesta a partire dalla seconda decade di vita e non alla nascita (Peacock and Benca, 2010). Tuttavia, mentre molti casi sembrano essere sporadici, esistono molte evidenze di narcolessia familiare: è stato stimato che tra parenti di primo grado esiste una probabilità dell'1-2% di sviluppare la malattia (Mignot et al., 1998).

## 2.3 SINTOMATOLOGIA

La classica tetradè sintomatologica include EDS, cataplessia, paralisi del sonno e allucinazioni ipnagogiche. Non tutti i sintomi si manifestano in tutti i pazienti e possono variare in frequenza ed intensità e in tempo di comparsa (Ohayon et al., 2005; Dauvilliers et al., 2007).

Il primo sintomo ad apparire è generalmente l'EDS che ricorre in media ogni due ore, a seconda del paziente. La sonnolenza si manifesta quando il paziente si trova in una situazione di inattività e possiede caratteristiche peculiari: l'impulso a dormire è irresistibile, per quanto il paziente si sforzi di combatterne l'urgenza (Dauvilliers et al., 2007); gli episodi di sonno sono generalmente brevi, attorno ai venti minuti, ma una durata maggiore non preclude la diagnosi (Overeem et al., 2001); sono spesso associati ad attività onirica e sono ristoratori (Dauvilliers et al., 2007).

La cataplessia è un sintomo specifico della narcolessia ed è considerato il miglior *marker* diagnostico (Dauvilliers et al., 2007). È caratterizzata da un'improvvisa perdita di tono muscolare bilaterale scatenata da fattori emozionali, più frequentemente da emozioni di tipo positivo come sorprese piacevoli, risate o scambi di battute, oppure da stati di rabbia; molto più raramente può essere scatenata da sforzo fisico, stress o paura (Scammell, 2003; Overeem et al., 2001; Dauvilliers et al., 2001; Thorpy, 2006). Durante l'attacco cataplettico tutti i muscoli striati possono essere coinvolti (eccetto il diaframma) fino ad arrivare alla caduta a terra del paziente. Gli attacchi parziali invece sono spesso limitati ai muscoli della faccia e/o degli arti provocando disartria, tremore della mascella, spasmi facciali e caduta della testa e della mandibola, piegamenti delle ginocchia, caduta di oggetti dalle mani. Durante episodi gli attacchi, sia generalizzati sia parziali, il paziente

rimane cosciente. La durata di un attacco cataplettico varia da pochi secondi a parecchi minuti mentre la frequenza va da meno di un episodio all'anno a più attacchi al giorno (Dauvilliers et al., 2007).

Un altro sintomo tipico della narcolessia è rappresentato dalle allucinazioni ipnagogiche, esperienze oniriche molto vivide che si manifestano durante la transizione tra veglia e sonno. Tali allucinazioni sono frutto di un sonno REM dissociato e possono essere auditive, visive o somestesiche; spesso si tratta di esperienze spaventose, tali che il paziente ha paura di andare a dormire o tende a tenere nella stanza da letto un animale da compagnia, inoltre, anche se i pazienti conoscono la natura di questi episodi, spesso possono avere difficoltà nel distinguere sogno e realtà e in questi casi esiste il rischio di una errata diagnosi di schizofrenia (Dauvilliers et al., 2007). Le anomalie del sonno REM provocano anche paralisi del sonno e sonno notturno disturbato. Durante una paralisi del sonno, il paziente è incapace di muovere arti o capo e di parlare durante le fasi di risveglio e addormentamento, nonostante sia mentalmente vigile. Anche la respirazione può risultare difficoltosa, con senso di oppressione toracica. Le paralisi hanno una durata che varia da pochi secondi a parecchi minuti e spesso possono essere associate ad allucinazioni ipnagogiche, il che rende l'esperienza complessiva particolarmente angosciata per i pazienti (Hishikawa et al., 1995; Dauvilliers et al., 2007). Dato che i pazienti narcolettici sono incapaci di restare svegli o addormentati per lunghi periodi di tempo, anche il loro sonno notturno è frammentato e disturbato: generalmente si addormentano immediatamente ma si risvegliano parecchie volte durante la notte. Questo sintomo, recentemente aggiunto alla classica tetraide sintomatologica della narcolessia, è stato registrato in un terzo dei pazienti (Dauvilliers et al., 2007).

Il decorso della narcolessia è difficile da descrivere per via della variabilità con cui appaiono i sintomi. In molti pazienti il primo sintomo a manifestarsi è l'EDS, accompagnata, in alcuni casi, dalla cataplessia, nel giro di un anno (Dauvilliers et al., 2001; Okun et al., 2002). Comunque la curva di insorgenza della cataplessia non coincide con la distribuzione bimodale dell'apparizione della sonnolenza diurna, dunque, nella maggior parte dei casi, i due sintomi insorgono in momenti della vita distanti tra loro (Dauvilliers et al., 2001). La sonnolenza diurna e la cataplessia sono sintomi che persistono durante tutta la durata della vita anche se è stato osservato un miglioramento del quadro clinico in età avanzata, probabilmente dovuto ad un maggiore adattamento alla malattia, all'efficacia del trattamento o ad una migliore gestione delle attività quotidiane e dei sonnellini diurni, mentre il sonno notturno disturbato sembra peggiorare con l'età (Dauvilliers et al., 2004).

## 2.4 ASPETTI GENETICI

### 2.4.1 TIPIZZAZIONE DELL'HLA

HLA (Human leukocyte antigen) identifica un gruppo di geni localizzati sul cromosoma 6, che codificano per proteine collocate sulla superficie cellulare che hanno un importante ruolo nel riconoscimento e nel processamento di antigeni esterni da parte del sistema immunitario. Secondo uno studio condotto sui giapponesi, il 100% dei pazienti narcolettici analizzati presentava l'allele HLA-DR2 (Juji et al. 1984), un'associazione che venne successivamente confermata in

Europa (Langdon et al., 1984; Billiard e Seignalet, 1985) e in Nord America (Poirier et al., 1986). Successivamente, con l'utilizzo di antisieri più specifici per caratterizzare meglio l'allele HLA-DR2, venne dimostrata un'associazione tra la narcolessia e l'aplotipo serologico DR15-DQ6, inoltre l'amplificazione dell'esone polimorfico dei geni HLA-DQA e DQB ha dimostrato la presenza in tutti i soggetti narcolettici caucasici degli alleli DRB1\*15:01, DQA1\*01:02, e DQB1\*06:02 (Kuwata et al., 1991). Recentemente è stato dimostrato che gli aplotipi HLA DRB1\*13:01-DQB1\*06:03 sono protettivi contro la narcolessia sporadica (Mignot et al., 2001). A causa della sua bassa specificità la tipizzazione dell'HLA ha una valenza limitata per la diagnosi di narcolessia (Poli et al., 2012).

Studi condotti sulla popolazione generale in diversi gruppi etnici hanno riscontrato una frequenza dell'allele DQB1\*06:02 pari al 12% nei giapponesi, al 25% nei caucasici e al 38% negli afroamericani (Mignot, 1998). In costoro, inoltre, è stata rilevata una significativa riduzione nella latenza del sonno REM sia durante il sonno notturno (Mignot, 1998), sia durante il MSLT (Mignot et al., 2006).

Quasi tutti i pazienti che presentano cataplessia portano l'allele HLA-DQB1\*0602 e questa associazione è particolarmente forte in soggetti con deficienza di ipocretina 1. Infatti, ad oggi, risultano pubblicati solo quattro pazienti con deficienza di ipocretina 1 nel liquido cerebro-spinale senza il suddetto allele (Nishino e Mignot, 2011). Inoltre, la presenza dell'allele DQB1\*0602 in omozigosi raddoppia o addirittura quadruplica il rischio di narcolessia (Pelin et al., 1998) e la severità del fenotipo varia nei soggetti eterozigoti a seconda dell'allele associato con il DQB1\*0602 (Mignot et al., 2001).

## 2.4.2 LE IPOCRETINE NELLA NARCOLESSIA

Le ipocretine sono state scoperte nel 1998 e il loro nome deriva dalla localizzazione delle cellule che le producono, nell'ipotalamo, e per via della somiglianza con la sequenza dell'ormone secretina (de Lecea et al., 1998). Le ipocretine 1 e 2 vengono prodotte esclusivamente da un gruppo di neuroni localizzati nell'ipotalamo postero-laterale (Kilduff e Peyron, 2000). Con la scoperta del coinvolgimento delle ipocretine nella narcolessia, il loro ruolo è stato ridefinito in base alla regolazione del sonno e alla sua interazione con la regolazione della spesa energetica (Sakurai et al., 1998, Willie et al., 2001). I modelli animali knockout per il gene della pre-pro-ipocretina (che codifica per entrambe le ipocretine) o per i recettori ipocretinergici 1 o 2 manifestano una trasmissione anormale delle ipocretine e condividono un fenotipo simile che include pattern sonno-veglia frammentati, cataplessia e inizio prematuro della fase REM durante il sonno, analogamente a ciò che si osserva nei pazienti affetti da narcolessia. Dopo la scoperta della mutazione nel gene del recettore 2 dell'ipocretina nei cani narcolettici (modelli naturali della malattia), il sistema delle ipocretine fu studiato anche nella narcolessia umana senza riscontrare però alcuna mutazione causale. Nonostante molti casi di narcolessia umana non siano causati dalle mutazioni sul gene delle ipocretine, queste ultime sono coinvolte nella patofisiologia del disturbo (Dauvilliers et al., 2007). Ibridazioni in situ, saggi immunocistochemici e radioimmunologici di questi due peptidi in tessuto cerebrale autoptico di pazienti narcolettici hanno mostrato non solo livelli non rilevabili di RNA di pre-pro-ipocretina e ipocretine ma anche una perdita selettiva dei neuroni ipocretinergici (Scammell, 2003; Peyron et al., 2000; Thannickal et al., 2000). Questi risultati, uniti alla scoperta di livelli non rilevabili di ipocretina 1 nel liquido cefalo-rachidiano

di molti pazienti affetti da narcolessia con cataplessia (Mignot et al., 2002; Dauvilliers et al., 2003) hanno suggerito che la mancanza di ipocretina 1 nel liquido cefalo-rachidiano sia associata all'insorgenza di narcolessia con cataplessia, anche se la causa della perdita selettiva dei neuroni che producono le ipocretine resta ancora sconosciuta (Dauvilliers et al., 2007).

## 2.5 DIAGNOSI E DIAGNOSI DIFFERENZIALE

*L'International Classification of Sleep Disorders 2nd edition* del 2005 (American Academy of Sleep Medicine, 2005) riporta due classificazioni della narcolessia, con e senza cataplessia. Alla maggioranza dei pazienti viene effettuata la diagnosi attraverso il MSLT, l'unico test diagnostico accettato a livello internazionale per accertare l'EDS e le anomalie del sonno REM (Littner et al., 2005). Il MSLT consiste di 5 pisolini fissati ad intervalli di due ore, della durata di 20 minuti ciascuno. Durante il test, tra i molti parametri che sono registrati, si registra se il paziente si addormenta, con che latenza e se insorge la fase REM e con quale latenza. L'occorrenza di sonno REM nei primi 15 minuti di sonno, un evento chiamato *sleep onset in REM period* (SOREMP), è rara in individui sani che non siano deprivati di sonno, ma è un risultato tipico nei pazienti narcolettici (Peacock and Benca, 2010). I criteri diagnostici dell'MSLT per la narcolessia richiedono una latenza media di addormentamento calcolata sui 5 sonnellini inferiore agli 8 minuti e la presenza di almeno due eventi SOREMP (Leibowitz et al., 2006; Dauvilliers et al., 2007). Va notato tuttavia che SOREMP multipli durante un MSLT possono aversi anche in altri disturbi del sonno che presentano EDS, come l'apnea

notturna, o in altre malattie come la sindrome di Prader-Willi, la sindrome di Kleine-Levin, alcuni parkinsonismi o il disturbo ossessivo compulsivo (Singh et al., 2006). La notte precedente il MSLT, il paziente esegue una polisonnografia notturna, durante la quale sono raccolti dati derivanti dalla misurazione dei parametri elettroencefalografici, respiratori, elettrocardiografici e muscolari; sulla base di questi dati sono inoltre calcolati molti parametri, fra cui il tempo totale di sonno, le diverse fasi del sonno, il tempo di addormentamento, il tempo di veglia infraipnica, l'efficienza del sonno. Lo scopo è quello di valutare la frammentazione del sonno, i disordini respiratori, i disturbi comportamentali della fase REM e, più raramente, le convulsioni notturne (Leibowitz et al., 2006) e per garantire che ci sia un periodo di sonno di almeno 6 ore, onde evitare di inficiare l'MSLT con reperti caratteristici della deprivazione di sonno (Black et al., 2005; Leibowitz et al., 2006). La polisonnografia e il MSLT devono essere effettuati in pazienti che non abbiano assunto sostanze psicotrope (Dauvilliers et al., 2007) e che non siano affetti da patologie che possano contribuire ad aumentare la tendenza ad addormentarsi durante il giorno (Peacock and Benca, 2010).

Per quanto riguarda la diagnosi differenziale, la narcolessia condivide molti sintomi con alcuni disturbi psichiatrici e può essere spesso confusa con il disturbo bipolare, con forme gravi di depressione, e con disturbi psicotici. Infatti i disturbi dell'umore possono spesso essere associati a insonnia e/o ipersonnia, così come a psicosi, le cui manifestazioni allucinatorie possono entrare in diagnosi differenziale con le allucinazioni ipnagogiche della narcolessia (Riemann, 2007; Dahmen et al., 2002).

Nei bambini, in particolare, la EDS si può manifestare paradossalmente come irritabilità caratteriale e iperattività motoria, nel tentativo di contrastare la EDS,

portando a un quadro che può talvolta essere confuso (e diagnosticato) con il disturbo di iperattività e deficit dell'attenzione (ADHD). Inoltre, l'errore diagnostico può essere ulteriormente indotto dal fatto che gli stimolanti (quali, ad es, il modafinil) sono efficaci sia per la EDS della narcolessia sia per l'ADHD (Peterson and Husain, 2008; Biederman et al., 2008).

Anche la schizofrenia condivide alcune caratteristiche comuni con la narcolessia: entrambi i disturbi insorgono nel periodo dell'adolescenza, i pazienti schizofrenici possono presentare alterazioni nel ciclo sonno-veglia e una ridotta latenza nel sonno REM ed entrambi i disturbi presentano allucinazioni auditive (Dahmen et al., 2002). Per quanto riguarda la terapia, un errore di diagnosi fra narcolessia e schizofrenia può essere molto dannoso: gli stimolanti possono peggiorare la psicosi, mentre somministrare antipsicotici ad un paziente narcolettico può peggiorare l'EDS per via dell'effetto sedativo (Peacock and Benca, 2010).

Infine, quando la cataplessia è il sintomo predominante, la narcolessia può essere confusa anche con l'epilessia (Dauvilliers et al., 2007).

La somiglianza dei sintomi della narcolessia con quadri clinici tipici di altri disturbi (Riemann, 2007; Dahmen et al., 2002) e l'assenza di un test genetico o esame del sangue certamente diagnostici sono fattori che rendono complicata, e ritardano in maniera consistente, la diagnosi di narcolessia (Mayer et al., 2002).

## 2.6 TERAPIA

Il trattamento della narcolessia è di tipo sintomatologico e include la somministrazione di stimolanti, generalmente dopaminergici, per gli attacchi di

sonno e la EDS; di antidepressivi noradrenergici per la cataplessia e per i sintomi legati alle anomalie del sonno REM; e di sedativo-ipnotici per il trattamento del sonno notturno disturbato (Dauvilliers et al., 2003; Overeem et al., 2001; Scammell, 2003).

Per molte decadi la terapia d'elezione per la narcolessia con cataplessia è stata rappresentata solo dagli stimolanti, in particolare dalle anfetamine e dai loro derivati (Wise et al., 2007; Thorpy, 2007). Le anfetamine si sono dimostrate molto efficaci per il trattamento dell'EDS: tuttavia non sono efficaci per la cataplessia, possono dare ipertensione arteriosa (Peacock and Benca, 2010), sono gravate dal rischio di una significativa dipendenza, e, in pazienti predisposti, possono esacerbare ansia, manie o psicosi (Guilleminault, 1993).

Attualmente il trattamento d'elezione dell'EDS approvato dalla U.S. Food and Drug Administration è il modafinil (Peacock and Benca, 2010; Dauvilliers et al., 2007). Nonostante il suo meccanismo d'azione non sia stato ancora chiarito, si ritiene che agisca attraverso i sistemi dopaminergico, adrenergico e istaminergico nell'ipotalamo (Thorpy, 2007; Scammell et al., 2000). Studi in vitro hanno mostrato la capacità del modafinil di indurre il CYP3A4, sopprimere la funzionalità del CYP2C9 e inibire il CYP2C19 (Robertson et al., 2000) mentre ulteriori studi clinici hanno confermato l'induzione del 3A4 e l'inibizione del 2C19, ma non la soppressione del 2C9 (Robertson e Hellriegel, 2003; Darwish et al., 2008). Inoltre, Zhu et al. (2008) hanno dimostrato che il modafinil può anche inibire la glicoproteina P, che comunque gioca un ruolo minore nel trasporto di questo farmaco.

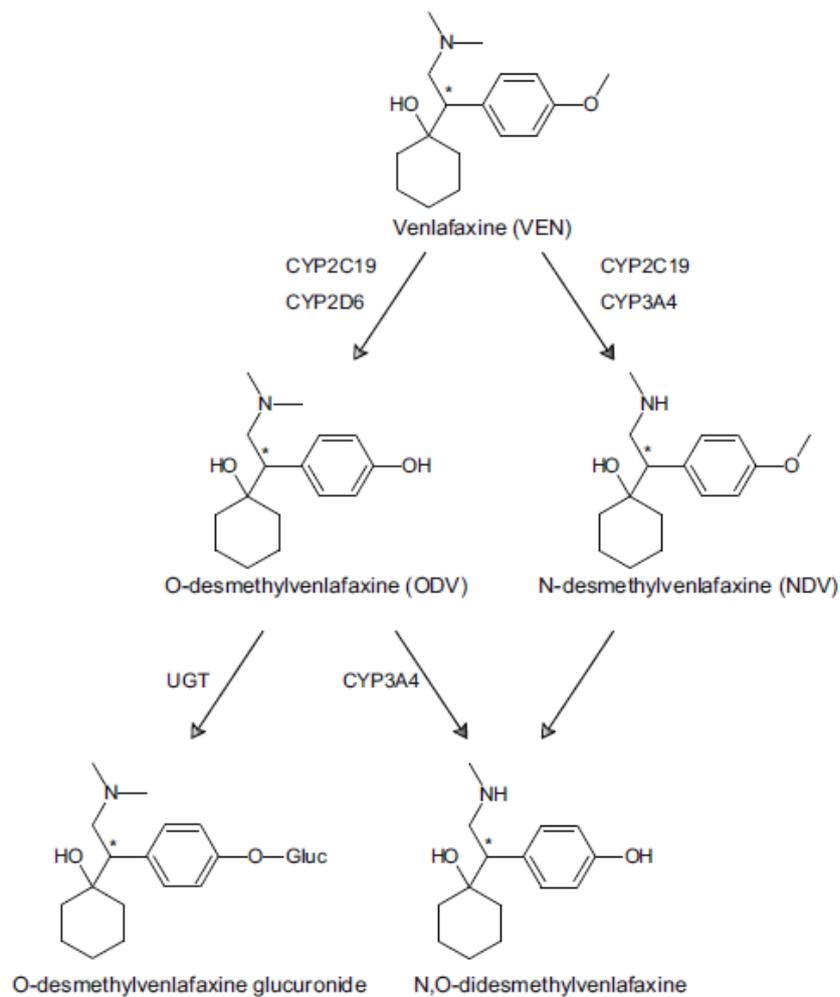
Generalmente la somministrazione base è di 100-200 mg al mattino con la possibilità, dopo qualche settimana, di aggiungere una seconda dose nel

pomeriggio, fino a un massimo di 600 mg (Dauvilliers et al., 2007). Le reazioni avverse più comuni sono cefalea, nervosismo e nausea; in alcuni casi è stato osservato anche un aumento dell'ansia e della pressione sanguigna (Mignot, 2012)

Molti sono i fattori che rendono il modafinil un'allettante alternativa all'utilizzo di stimolanti anfetaminici: ha meno effetti sulla pressione sanguigna e può essere prescritto anche a pazienti cardiopatici o ipertesi; ha meno effetti neurotossici e l'astinenza dal farmaco non porta ad ipersonnolenza (Hirai and Nishino, 2011); inoltre la dipendenza e la tolleranza da modafinil appaiono molto limitate (Myrick et al., 2004). Studi clinici suggeriscono anche che l'effetto del modafinil sull'EDS sia qualitativamente differente da quello delle anfetamine, portando i pazienti a sentirsi meno irritabili o agitati (Bastuji et al., 1988).

Per molto tempo il trattamento della cataplessia è stato affidato all'utilizzo degli antidepressivi triciclici: anche se questo effetto non è stato ancora pienamente compreso, si pensa che i triciclici siano responsabili della soppressione del sonno REM. Tale effetto viene perciò sfruttato per il controllo non solo della cataplessia ma anche degli altri fenomeni REM della narcolessia come le paralisi del sonno e le allucinazioni ipnagogiche. L'utilizzo degli antidepressivi triciclici è però legato a significativi effetti collaterali, come effetti cardiovascolari ed effetti anticolinergici (vertigini, costipazione, ipotensione ortostatica, ritenzione urinaria e vista annebbiata). In particolare, nei narcolettici, è stato osservato un fenomeno da sospensione dei triciclici, con esacerbazione della cataplessia fino a un possibile *status cataplecticus*, che consiste in una condizione di attacchi cataplettici subentranti, che riducono in maniera drammatica le funzioni del paziente per ore o addirittura giorni (Peacock and Benca, 2010). Per questo motivo gli antidepressivi

di nuova generazione, come gli inibitori selettivi della serotonina (SSRI) e gli inibitori della ricaptazione della serotonina e della noradrenalina (SNRI) vengono generalmente scelti in luogo dei triciclici (Mignot, 2012). Tra questi composti, la venlafaxina, un SNRI, o più raramente la duloxetina e la desmetilvenlafaxina, vengono comunemente utilizzati e considerati di prima scelta (Mignot e Nishino, 2005; Møller et al., 2009). La venlafaxina ha una breve durata d'azione, dunque resta preferibile la formulazione a rilascio prolungato, e si dimostra efficace già a dosi inferiori, rispetto a quelle normalmente utilizzate per trattare ansia e depressione.



**Figura 7:** metabolismo di venlafaxina e o-desmetilvenlafaxina ed enzimi coinvolti. UGT: UDP glicuronil transferasi. (Jornil et al., 2013)

La O-desmetilvenlafaxina rappresenta il metabolita attivo della venlafaxina (figura 7). Studi in vitro hanno mostrato che CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 e CYP3A4 sono coinvolti nel metabolismo di questo antidepressivo (Fogelman et al., 1999) mentre per tutte queste isoforme, eccetto per il CYP2C9, è stato dimostrato un coinvolgimento nell'eliminazione del farmaco in vivo (Lindh et al., 2003; McAlpine et al., 2011). La venlafaxina è anche un substrato della glicoproteina P (Uhr et al., 2003; Karlsson et al., 2010), inoltre inibisce (Weiss et al., 2003) e induce (Bachmeier et al., 2011) la sua attività *in vitro*.

La somministrazione minima di venlafaxina varia in genere fra i 37,5 mg e i 150 mg, o anche oltre in alcuni casi (Mignot, 2012). Un vantaggio nella terapia antidepressiva nella narcolessia con cataplessia, a differenza della depressione, è l'essere immediatamente attiva sulla cataplessia, nonostante anche per gli antidepressivi di nuova generazione permanga il rischio di un forte effetto di rimbalzo (*rebound*) all'interruzione del trattamento (Broderick et al., 2009).

Un altro farmaco utilizzato nel trattamento dei sintomi della narcolessia e approvato dalla *U.S. Food and Drug Administration* è il sodio oxibato, detto anche acido gamma idrossibutirrico (GHB). Il GHB venne inizialmente sviluppato come agente ipnoiducevole in ambito anestesilogico ma, diversamente dagli altri anestetici e sedativo-ipnotici, ha la capacità di indurre il sonno a onde lente e conservare il sonno REM, dando perciò un sonno che appare più simile al sonno naturale (Thorpy et al. 2007).

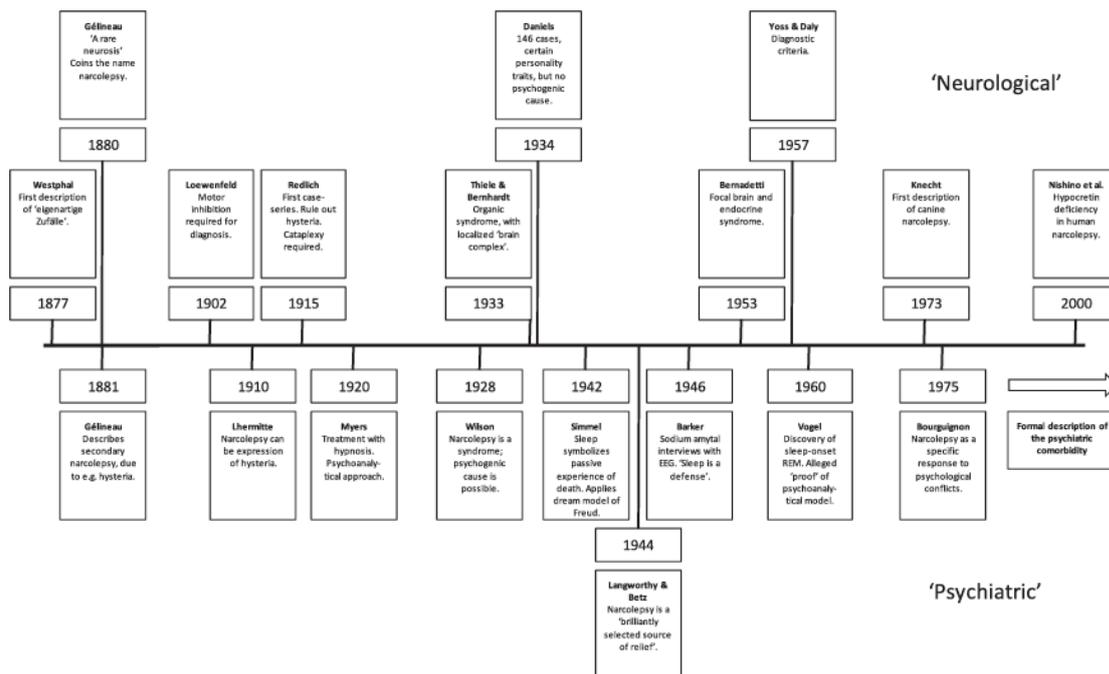
Data, dunque, questa sua particolarità, la molecola venne testata con l'ipotesi che aumentando il sonno e diminuendo la pressione del sonno REM durante la notte, il paziente avrebbe potuto beneficiare di una minore sonnolenza durante il giorno. Infatti è stato dimostrato che il GHB non solo riesce ad indurre un sonno notturno

ristoratore e prolungato ma ha buoni effetti sulla EDS (Broughton e Mamelak, 1979). Successivamente, numerosi studi hanno dimostrato l'efficacia del GHB per il trattamento della cataplessia, delle paralisi del sonno e delle allucinazioni ipnagogiche (Black e Houghton, 2006; Black et al., 2010, Mignot, 2012).

Il GHB ha una brevissima emivita (circa 30 minuti) (Scharf et al., 1998) e una durata d'azione che va dalle 2 alle 4 ore: per questo motivo va somministrato due volte durante la notte per garantire un sonno di circa 6-8 ore. La quantità somministrata per notte è di circa 6-9 gr negli adulti, anche se la dose viene comunque aggiustata a seconda del paziente o divisa in due o tre somministrazioni notturne (Mignot, 2012). I più comuni effetti collaterali del GHB includono cefalea, vertigini, nausea, vomito, nasofaringite, sonnolenza, incontinenza urinaria e, per via della quantità sodio presente, può anche dare effetti collaterali cardiovascolari (Dauvilliers et al., 2007; Peacock and Benca, 2010). L'uso del GHB è limitato non solo per via degli effetti collaterali ma anche per la difficoltà nella prescrizione: infatti il GHB era stato inizialmente sintetizzato come droga da abuso e viene tutt'ora usato come cosiddetta "droga dello stupro", perché dà un'amnesia anterograda e ha effetti disinibitori (Gahlinger, 2004). Inoltre con l'uso continuativo ad alte dosi, la cessazione del farmaco può portare a severe crisi di astinenza (van Noorden et al., 2009) mentre l'overdose può risultare fatale, soprattutto in un contesto politerapico. A questo proposito, si consiglia la prescrizione del GHB all'interno dell'intervallo terapeutico soprascritto e limitatamente alle ore notturne (Mignot, 2012).

## 2.7 COMORBIDITÀ PSICHIATRICHE

Fino alla sua prima descrizione (1877, figura 8), la narcolessia è stata associata alla psichiatria in vari modi. Durante tutto il XX secolo, l'inquadramento neurologico è stato affiancato da quello psichiatrico suggerendo come causa della malattia un disturbo di tipo psichiatrico.



**Figura 8:** evoluzione delle visioni neurologica e psichiatrica della narcolessia negli ultimi 130 anni (Droogleever Fortuyn et al., 2011).

Gli psichiatri che trattavano pazienti narcolettici suggerivano deviazioni sessuali e quadri psicopatologici come fattori sottostanti ai meccanismi psicosomatici della malattia. Questa visione persistette per lungo tempo, fino al XX secolo. Successivamente, quando il difetto nella trasmissione nei neuroni ipocretinergici nell'ipotalamo venne indicata come causa primaria della malattia, la narcolessia venne definita come un disturbo organico di tipo neurologico. In seguito, la scoperta secondo cui il sistema ipocretinergico è fortemente connesso non solo ai

processi sonno-veglia, ma anche ad altre regioni del cervello incluso il sistema limbico, ha suscitato un forte interesse per il fenotipo psichiatrico della narcolessia portando alla concezione che le comorbidità psichiatriche fossero parte essenziale del disturbo e diretta conseguenza dei suoi meccanismi fisiopatologici. In molti casi di narcolessia sono stati osservati sintomi psichiatrici e recentemente sono stati condotti studi per meglio definire le comorbidità psichiatriche della narcolessia (Droogleever Fortuyn et al., 2011). La relazione tra depressione e narcolessia è stata valutata con diverse modalità, sia come esito secondario negli studi sulla qualità di vita del paziente, sia attraverso l'utilizzo di questionari, sia utilizzando strumenti diagnostici psichiatrici. In generale, gli studi più recenti indicano che i pazienti narcolettici mostrano un'elevata frequenza di sintomi depressivi, nonostante una vera e propria diagnosi di depressione maggiore sia rara. Una possibile sovrarappresentazione può risultare dalla sovrapposizione tra i sintomi della narcolessia e quelli della depressione: la scarsa attenzione, il sonno notturno disturbato, i cambiamenti di peso corporeo e l'affaticamento rientrano nello spettro sintomatologico della narcolessia ma fanno anche parte dei disturbi depressivi (Droogleever Fortuyn et al., 2011). Diversamente dalla depressione, l'ansia come comorbidità psichiatrica della narcolessia è stata presa in considerazione solo recentemente: in uno studio del 2010 si evidenzia una marcata prevalenza dell'ansia e dei disturbi ansiosi nel fenotipo psichiatrico della narcolessia (circa il 20%), anche maggiore rispetto alla depressione (Droogleever Fortuyn et al., 2010). Una possibile spiegazione dell'alta frequenza dei disturbi ansiosi in questo tipo di pazienti può risiedere nella perdita di controllo associata ai sintomi di narcolessia, per esempio in caso di cataplessia, attacchi bulimici o comportamenti automatici: questi sintomi possono aumentare il livello di stress del paziente, e per

di più l'ansia può essere collegata anche al timore di addormentarsi o di avere un episodio di cataplessia in pubblico. L'ansia può essere scatenata anche dalla difficoltà del paziente di distinguere la realtà dalle esperienze vissute durante le allucinazioni ipnagogiche: di conseguenza lo spavento derivante dalle allucinazioni può influenzare la realtà quotidiana (Droogleever Fortuyn et al., 2010).

Tra le comorbidità psichiatriche della narcolessia, quella maggiormente rappresentata è quella relativa ai disturbi alimentari. Attacchi di bulimia erano già stati descritti in bambini narcolettici (Kotagal et al., 2004) mentre uno studio del 2007 ha registrato un'altissima frequenza di disturbi alimentari non specificati tra cui il *Binge Eating Disorder* (Chabas et al., 2007), successivamente confermata in un altro studio (Droogleever Fortuyn et al., 2008). I disturbi alimentari sembrano essere parte integrante del fenotipo narcolettico e consistono soprattutto in un persistente desiderio di cibo e in un comportamento alimentare compulsivo e incontrollato. La prevalenza di questi disturbi alimentari è marcatamente più alta rispetto a quella che è possibile riscontrare nella popolazione generale (Droogleever Fortuyn et al., 2008). È interessante anche il fatto che, mentre i disturbi ansiosi possono essere esacerbati da effetti collaterali dei farmaci utilizzati nel trattamento della narcolessia, come le anfetamine o il modafinil, i disturbi alimentari non sembrano essere un effetto del trattamento farmacologico (Droogleever Fortuyn et al., 2008; Palaia et al., 2011). Inoltre i disturbi alimentari legati alla narcolessia non sono associati ad un aumento dell'indice di massa corporea o ai risvegli notturni, suggerendo un possibile coinvolgimento centrale dovuto alla mancanza di ipocretina (Palaia et al., 2011).

## 2.8 IMPLICAZIONI SOCIALI

La narcolessia è una malattia cronica che ha un profondo impatto sulla vita quotidiana spesso anche più severo rispetto ad altre malattie croniche (Broughton et al., 1984). Sono comuni le difficoltà nel campo delle relazioni sociali e sentimentali (Overeem et al., 2001) ed è risaputo che la psicopatologia possa verificarsi abbastanza frequentemente (Dodel et al., 2007). La narcolessia viene spesso mal diagnosticata o non riconosciuta e un errato trattamento dei sintomi può peggiorare il carico della malattia sul paziente (Jennum et al., 2012). I sintomi clinici del disturbo hanno un forte impatto sulle funzioni fisiche e psicosociali e, conseguentemente, sulla qualità della vita del paziente, per esempio l'EDS, anche se trattata, ha forti ripercussioni sulla quotidianità aumentando il rischio di incidenti dentro e fuori casa (Ervik et al., 2006). I sintomi della narcolessia influenzano profondamente anche le funzioni sociali: gli attacchi di sonno, la difficoltà di concentrazione e i problemi di memoria, i problemi interpersonali e il cambiamento di personalità sono solo alcune delle conseguenze della narcolessia che interferiscono con la vita sociale (Douglas et al., 1998; Broughton et al., 1994). Generalmente i pazienti affetti da narcolessia evitano situazioni sociali che possano provocare imbarazzo per il timore di avere attacchi di cataplessia e non è raro l'isolamento sociale (Douglas et al., 1998). Inoltre le paralisi del sonno e le allucinazioni ipnagogiche possono portare a serie conseguenze psicosociali, creando fraintendimenti e sospetti (Goswami et al., 1998).

È stato dimostrato che i pazienti affetti da narcolessia hanno più bassi tassi di impiego rispetto alla popolazione sana, anche ricevendo un adeguato trattamento (Overeem et al., 2001; Jennum et al., 2009; Jennum et al., 2012), infatti, per via dei problemi di concentrazione e memoria, la malattia influenza negativamente

anche le *performances* scolastiche e lavorative e la possibilità di avanzamento di carriera (Dodel et al., 2007). Uno studio recentemente effettuato su pazienti italiani dimostra invece una tendenza differente: i pazienti analizzati hanno, nel complesso, livelli di istruzione ed occupazione simili a quelli registrati per la popolazione sana dello stesso intervallo di età. Tuttavia i pazienti con un'insorgenza precoce della malattia hanno un più alto livello di istruzione, mentre coloro che hanno ricevuto una diagnosi dopo i 30 anni d'età cambiano lavoro più frequentemente o sono disoccupati e hanno una minore percezione del loro stato di salute (Ingravallo et al., 2012). E' stato perciò ipotizzato che un'insorgenza precoce della malattia abbia un effetto positivo sulla sfera educativa e lavorativa del paziente stimolandolo alla ricerca di un lavoro che meglio si adegui alle sue necessità (Ingravallo et al., 2012; Nevsimalova et al., 2009).

# CAPITOLO 3: STUDIO SPERIMENTALE

---

## 3.1 SCOPO DELLO STUDIO

I sintomi della narcolessia influiscono profondamente sulla vita quotidiana del paziente, interferendo con le funzioni sociali e determinando in molti casi uno stato di isolamento e i sintomi di tipo psichiatrico come i disturbi alimentari possono interferire ancor più con le funzioni quotidiane del paziente, influenzandone negativamente la qualità della vita. Un appropriato trattamento dei sintomi classici della narcolessia, insieme ad un giusto inquadramento dei sintomi psichiatrici del disturbo in ambito clinico possono migliorare la qualità di vita del paziente.

Uno degli scopi di questo studio è quello di valutare statisticamente l'associazione tra il polimorfismo del *CYP2D6* e la presenza di comorbidità psichiatriche nei soggetti affetti da narcolessia con cataplessia, data l'associazione, trovata in soggetti sani, tra lo sviluppo di disturbi alimentari e il fenotipo UM.

Inoltre, i pazienti affetti da narcolessia con cataplessia sono trattati in regime di politerapia e alcuni dei farmaci utilizzati nel trattamento, nella fattispecie modafinil e venlafaxina, sono substrati di alcune isoforme del P450 e della glicoproteina P, e sono coinvolti nei meccanismi di inibizione o induzione di questi enzimi. Un altro scopo di questo studio è di analizzare il polimorfismo dei geni *CYP2D6*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A4*, *CYP3A5* e *ABCB1*, coinvolti nel metabolismo dei farmaci, attraverso la tecnica del *minisequencing*, in un campione di 108 pazienti con

diagnosi di narcolessia con cataplessia, componendone il profilo farmacogenetico al fine di inquadrare il trattamento nell'ambito di una terapia personalizzata.

## 3.2 MATERIALI E METODI

### 3.2.1 CAMPIONI

Lo studio ha previsto l'analisi di 108 campioni di DNA, già precedentemente estratti, di pazienti con diagnosi clinica e polisonnografica di narcolessia con cataplessia, provenienti dal Dipartimento di Scienze Neurologiche dell'Università di Bologna. I campioni appartengono per la maggior parte a individui di origine caucasica, fatta eccezione per due individui di origine africana, un asiatico e uno originario della Repubblica Dominicana. Ad ogni paziente erano stati precedentemente sottoposti il questionario *Eating Disorder Inventory-2* (EDI-2), che esplora 11 profili psicopatologici associati ai disturbi alimentari. Dei 108 campioni di DNA analizzati, 46 appartengono a pazienti che hanno riportato alti punteggi ai questionari somministrati, indicando un profilo psicopatologico.

### 3.2.2 QUANTIFICAZIONE

La quantificazione del DNA genomico è stata effettuata mediante NanoDrop 2000c UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Lo strumento sfrutta la tensione superficiale esercitata da piccoli volumi che si trovano tra due superfici vicine, in questo modo una goccia di campione

posizionata sulla piastra di lettura crea una colonna di liquido a contatto con due fibre ottiche, che eseguono così la lettura del campione a 260, 280 e 230 nm. Questo tipo di lettura non solo permette di ottenere la quantificazione del DNA ma fornisce anche un indice di purezza del campione inserito.

I campioni sono stati analizzati in doppio e quantificati utilizzando 1 µl di DNA genomico.

### 3.2.3 AMPLIFICAZIONE

#### 3.2.3.1 CYP2D6

I campioni sono stati amplificati mediante *long PCR (long Polymerase Chain Reaction)* attraverso l'utilizzo del GeneAmp XL PCR kit (Life Technologies, USA). Questa tecnica prevede l'utilizzo di DNA polimerasi specifiche ideate per l'amplificazione di frammenti di DNA di grandezza che variano tra 5 e >40 kb. L'enzima utilizzato è la rTth DNA Polimerasi XL che ha permesso l'amplificazione del frammento contenente l'intero gene *CYP2D6* di 5.1 kb (Sistonen et al., 2005). La PCR è stata effettuata in un volume finale di 25 µl di mix di reazione illustrato in tabella 1:

<b>REATTIVO</b>	<b>CONCENTRAZIONE</b>
3.3X XL Buffer	1X
Mg(OAc) <sub>2</sub>	1.25 mM
Deossinucleotidi trifosfato	0.2 mM each
Primer Forward	0.4 µM
Primer Reverse	0.4 µM
20–100 ng	DNA Genomico
rTth DNAPolymerase XL	1U
Acqua	A volume

**Tabella 1:** mix di reazione per l'amplificazione del CYP2D6

Il profilo termico, con le opportune modifiche (Riccardi et al., 2011), è riassunto in tabella 2:

Denaturazione iniziale	95°C	1 minuto	
Denaturazione	95°C	15 secondi	30 cicli
Annealing	66°C	45 secondi	
Estensione	68°C	4 minuti	
Estensione finale	72°C	7 minuti	

**Tabella 2:** profilo termico di PCR per l'amplificazione del CYP2D6

Per tutti i campioni è stata testata l'eventuale duplicazione o multiduplicazione del gene, mentre soltanto quelli omozigoti sono stati analizzati anche per la delezione genica; questa analisi è stata effettuata mediante una PCR allele specifica (Steen et al., 1995; Løvlie et al., 1996).

Le concentrazioni dei primer utilizzati nella verifica della duplicazione e della delezione del gene sono elencate in tabella 3.

PRIMER	[ ] DUPLICAZIONE	[ ] DELEZIONE
13-F	0,2 µM	0,6 µM
207-F	0,6 µM	0,2 µM
24-R	-	0,4 µM
32-R	0,4 µM	-

**Tabella 3:** primer utilizzati nella PCR allele specifica per testare eventuali duplicazioni o delezioni del CYP2D6 e relative concentrazioni in PCR

I primer 13-F e 32-R amplificano un frammento di controllo di 3.8 kb utile ad escludere i fallimenti della PCR, mentre il primer 207-F si appaia al DNA solo in caso di duplicazione genica per via della sua posizione, a cavallo tra il 3' del *CYP2D6* e il 5' del *CYP2D7*, ed amplifica insieme al primer 32-R, che possiede due siti di attacco, un frammento di 3.2 kb, confermando la duplicazione genica.

I primer 207-F e 24-R amplificano un frammento controllo di 3.0 kb che esclude un eventuale fallimento della reazione, mentre i primer 13-F e 24-R amplificano un

frammento di 3.5 kb in caso di delezione dell'intero gene, dato che i loro siti di legame si trovano a monte e a valle del *CYP2D6*.

Il ciclo di PCR utilizzato per effettuare la PCR allele specifica per la verifica sia di duplicazione sia di delezione è lo stesso utilizzato per l'amplificazione del frammento di 5,1 kb (Tabella 2).

### 3.2.3.2 CYP2C9/CYP2C19

La tecnica di PCR multiplex è stata utilizzata anche per ottenere l'amplificazione dei due frammenti relativi al *CYP2C9* (esoni 2-3 0.6 kb; esone 7, 0.4 kb) e un frammento target del *CYP2C19* (esoni 4-5, 1.9 kb). I primer utilizzati sono stati tratti da letteratura (Sistonen et al., 2009). La PCR è stata effettuata in un volume finale di 25 µl e la mix di reazione è illustrata in tabella 7.

REATTIVO	CONCENTRAZIONE
10X PCR Gold Buffer	0.9X
25mM Mg(Cl) <sub>2</sub> Solution	2mM
Deossinucleotidi trifosfato	0.2mM each
2C9-F1	0.1 µM
2C9-R1	0.1 µM
2C9-F2	0.1 µM
2C9-R2	0.1 µM
2C19-F	0.6 µM
2C19-R	0.6 µM
20–100 ng	DNA Genomico
AmpliTaq Gold	2U
Acqua	A volume

**Tabella 7:** mix di reazione per l'amplificazione dei frammenti relativi ai geni CYP2C9 e CYP2C19.

Il profilo termico, riassunto in tabella 8, è stato modificato rispetto al protocollo originale (Sistonen et al., 2009):

Denaturazione iniziale	95°C	7 minuti	
Denaturazione	95°C	30 secondi	35 cicli
<i>Annealing</i>	54°C	30 secondi	
Estensione	72°C	3 minuti	
Estensione finale	72°C	5 minuti	

**Tabella 8:** profilo termico di PCR per l'amplificazione dei geni CYP2C9 e CYP2C19.

### 3.2.3.3 CYP3A4/CYP3A5/ABCB1

L'amplificazione dei geni *CYP3A4*, *CYP3A5* e *ABCB1* ha interessato l'amplificazione di un frammento del *CYP3A4*, un frammento del *CYP3A5* e tre frammenti dell'*ABCB1*, in cui sono localizzati gli SNP di interesse per questo studio. La tecnica utilizzata è quella della PCR multiplex, una variante della PCR che permette la simultanea amplificazione di più *target* di interesse nell'ambito di una sola reazione usando tante coppie di primer quanti sono i frammenti da amplificare. I primer utilizzati in questo studio per amplificare i frammenti *target* di questi tre geni (tabella 4) sono stati disegnati ad hoc secondo criteri standard.

GENE	PRIMER	SEQUENZA	PESO MOLECOLARE
CYP3A4	3A4_F	AGGTGTGGCTTGTTGGGATGAA	420bp
	3A4_R	CCTTTCAGCTCTGTGTTGCTC	
CYP3A5	3A5_F	GCAGCATTTAGTCCTTGTGAGC	276bp
	3A5_R	CTCACACAGGAGCCACCCAA	
ABCB1	ABCB1 1F	TATCCTGTGTCTGTGAATTGCCTTG	320bp
	ABCB1 1R	CTAATATCCTGTCCATCAACACTG	
	ABCB1 2F	CATCTATGGTTGGCAACTAACACT	223bp
	ABCB1 2R	GAGCATAGTAAGCAGTAGGGAG	
	ABCB1 3F	GCTGAGAACATTGCCTATGGAG	122bp
	ABCB1 3R	GAAGAGAGACTTACATTAGGCAGT	

**Tabella 4:** sequenze dei primer utilizzati per l'amplificazione dei frammenti relativi ai geni CYP3A4, CYP3A5 e ABCB1 e relativo peso molecolare.

Per tutti i primer, le proprietà oligonucleotidiche come temperatura di *melting*, contenuto in GC e la potenziale formazione di *hairpin* o dimeri di primer, sono state

valutate grazie all'utilizzo di *Oligo Calc oligonucleotide properties calculator* versione 3.26 (Kibbe et al., 2007); in seguito, per valutarne a priori la specificità, i primer sono stati testati su BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) e In-Silico PCR (Fujita et al., 2011). Infine le interazioni tra primer e l'eventuale formazione di *hairpin* sono state valutate utilizzando il *software* Autodimer (Vallone et al., 2004). Dato che tra le sequenze del *CYP3A4* e del *CYP3A5* esiste una grande omologia di circa l'85%, le due sequenze sono state preventivamente allineate tra loro e con la sequenza del *CYP3A7* attraverso CLUSTALW (Larkin et al., 2007) allo scopo di trovare siti specifici su entrambi i geni per il posizionamento dei primer. In seguito, per confermare la specificità di questi primer, i relativi prodotti di PCR sono stati sequenziati in *forward* e *reverse* utilizzando il BigDye® Terminator v1.1 *cycle sequencing kit* (Life Technologies, USA) in accordo con le istruzioni consigliate dal produttore.

La PCR è stata effettuata in un volume finale di 25 µl di mix di reazione (tabella 5).

REATTIVO	CONCENTRAZIONE
10X PCR Gold Buffer	1X
25mM Mg(Cl) <sub>2</sub> Solution	2 mM
Deossinucleotidi trifosfato	0.2 mM each
3A4_F	0.2 µM
3A4_R	0.2 µM
3A5_F	0.2 µM
3A5_R	0.2 µM
ABCB1 1F	0.2 µM
ABCB1 1R	0.2 µM
ABCB1 2F	0.2 µM
ABCB1 2R	0.2 µM
ABCB1 3F	0.2 µM
ABCB1 3R	0.2 µM
20–60 ng	DNA Genomico
AmpliTaq Gold	1U
Acqua	A volume

**Tabella 5:** mix di reazione per l'amplificazione dei frammenti relativi ai geni CYP3A4, CYP3A5 e ABCB1.

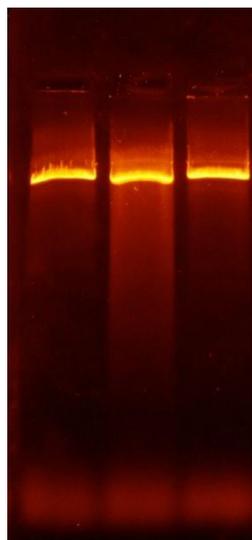
Il profilo termico è riassunto in tabella 6:

Denaturazione iniziale	95°C	7 minuti	
Denaturazione	95°C	30 secondi	30
Annealing	57°C	30 secondi	cicli
Estensione	72°C	2 minuti	
Estensione finale	72°C	5 minuti	

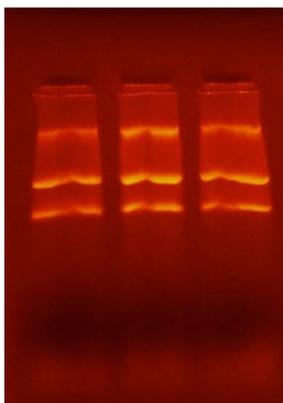
**Tabella 6:** profilo termico di PCR per l'amplificazione di CYP3A4, CYP3A5 e ABCB1.

### 3.2.4 ELETTROFORESI SU GEL D'AGAROSIO

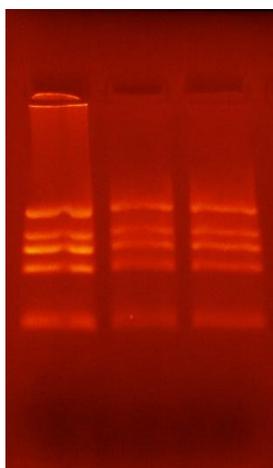
La verifica dell'avvenuta amplificazione è stata effettuata mediante elettroforesi orizzontale caricando 5 µl di amplificato su gel di agarosio all'1% (*CYP2D6*, figura 9; *CYP2C9/CYP2C19*, figura 10) o al 2% (*CYP3A4/CYP3A5/ABCB1*, figura 11) utilizzando come intercalante il colorante GelRed (Biotium, Inc. Hayward, California, USA) e visualizzando i risultati ottenuti per mezzo di un transilluminatore a luce ultravioletta.



**Figura 9:** Corsa elettroforetica del prodotto di amplificazione del CYP2D6.



**Figura 10:** Corsa elettroforetica dei prodotti di amplificazione dei geni CYP2C9 e CYP2C19.



**Figura 11:** Corsa elettroforetica dei prodotti di amplificazione dei geni CYP3A4, CYP3A5 e ABCB1.

### 3.2.5 MINISEQUENCING

Al fine di testare le posizioni SNP di interesse nei geni implicati nello studio è stata effettuata una reazione di minisequencing.

Prima di allestire la reazione, è necessaria una purificazione dei prodotti di PCR utilizzando 5  $\mu$ l di amplificato e 2  $\mu$ l dell'enzima ExoSAP-IT (USB Corporation) ed incubando per 15 minuti a 37°C e 15 minuti a 80°C. Questa purificazione rimuove gli eccessi di deossinucleotidi e primer che interferirebbero con la reazione di

minisequencing e il prodotto purificato viene utilizzato come template per la reazione.

La reazione di minisequencing, denominata anche estensione di una singola base, è stata effettuata mediante l'utilizzo di SNaPshot® Multiplex System (Life Technologies, USA). La chimica del reagente è basata sull'estensione di una singola base di sonde (o primer) non marcate mediante l'aggiunta di ddNTPs (dideossinucleotidi trifosfati), marcati con fluorocromi.

Le sonde utilizzate sono caratterizzate dalla presenza di una coda non omologa al 5' di diversa lunghezza al fine di evitare la sovrapposizione dei frammenti durante la corsa elettroforetica e facilitarne l'interpretazione.

Sono state analizzate con questo metodo 11 posizioni SNP per il CYP2D6 (100, 1023, 1661, 1707, 1846, 2549, 2613-15, 2850, 2988, 3183, 4180), come descritto da Sistonen et al. (2005); 4 SNP per il CYP2C9 (430, 1075, 1080, 1003) e 2 per il CYP2C19 (681 e 636) (Sistonen et al., 2009). Le sonde utilizzate per l'individuazione delle posizioni delle posizioni -392 per il CYP3A4, 6986 per il CYP3A5 e per le posizioni dell'ABCB1 (1236, 2677, 3435), sono state disegnate ad hoc per questo studio. Tutte le sonde utilizzate e le relative concentrazioni sono elencate in tabella 9.

GENE	SNP	SONDA	[ ] μM
CYP2D6	100C>T	ACGCTGGGCTGCACGCTAC	3
	1023C>T	(T) <sub>3</sub> ACCGCCCGCCTGTGCCCATCA	1.5
	1661G>C	(T) <sub>8</sub> CGAGCAGAGGCGCTTCTCCGT	1.5
	1707delT	(T) <sub>14</sub> GCAAGAAGTCGCTGGAGCAG	1.5
	1846G>A	(T) <sub>21</sub> CCGCATCTCCCACCCCA	1
	2549delA	(T) <sub>23</sub> GATGAGCTGCTAACTGAGCAC	1
	2615delAGA	(T) <sub>28</sub> GCCTTCTGGCAGAGATGGAG	1
	2850C>T	(T) <sub>33</sub> AGCTTCAATGATGAGAACCTG	2
	2988G>A	(T) <sub>45</sub> AGTGCAGGGGCCGAGGGAG	1
	3183G>A	(T) <sub>47</sub> TGTCCAACAGGAGATCGACGAC	1
	4180G>C	(T) <sub>38</sub> GTGTCTTTGCTTTCCTGGTGA	1
CYP2C9	430C>T	(T) <sub>4</sub> GGAAGAGGAGCATTGAGGAC	0.18
	1003C>T	(T) <sub>18</sub> GAACGTGTGATTGGCAGAAAC	0.08

	1075A>C	(T) <sub>9</sub> TGCACGAGGTCCAGAGATAC	0.04
	1080C>G	(T) <sub>16</sub> CAGGCTGGTGGGGAGAAG	0.04
CYP2C19	636G>A	(T) <sub>25</sub> GGATTGTAAGCACCCCCTG	0.07
	681G>A	(T) <sub>22</sub> TTTTCCCACTATCATTGATTATTTCCC	0.11
CYP3A4	-392A>G	GCCATAGAGACAAGGGCA	0.05
CYP3A5	6986A>G	(TC) <sub>2</sub> TCCAAACAGGGAAGAGATA	0.05
ABCB1	1236C>T	(CT) <sub>5</sub> CTGGTAGATCTTGAAGGG	0.05
	2677G>T/A	(TC) <sub>6</sub> GATAAGAAAGAAGGTTAGAAAGGT	0.05
	3435C>T	(T) <sub>19</sub> TGGTGTACAGGAAGAGAT	0.05

**Tabella 9:** sonde utilizzate per l'individuazione delle posizioni SNP di interesse nei geni in analisi e relative concentrazioni.

Dopo la reazione di minisequencing è necessario sottoporre il campione ad una seconda purificazione enzimatica aggiungendo 1 U dell'enzima Calf Intestinal Phosphatase (CIP) (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA), incubando a 37°C per 60 minuti e 80°C per 15, minuti al fine di rimuovere i dideossinucleotidi trifosfati non incorporati durante la reazione di minisequenziamento e che renderebbero il risultato non interpretabile.

### 3.2.6 ELETTROFORESI CAPILLARE E GENOTIPIZZAZIONE

L'elettroforesi capillare è una tecnica analitica adoperata per separare un'ampia gamma di composti biologici. I vantaggi dell'elettroforesi capillare sono un'alta efficienza di separazione, grazie all'utilizzo di campi elettrici piuttosto elevati; la possibilità di utilizzare una piccola quantità di campione (1-10 µl), la velocità di separazione (1-45 min), l'automatizzazione e la riproducibilità.

La separazione avviene in un capillare con un diametro interno pari a 50 µm, quindi notevolmente ridotto, in modo che sia molto alto il rapporto tra la superficie e il volume del capillare stesso e ciò aumenta considerevolmente la dissipazione del calore. Anche la lunghezza del capillare ha un ruolo importante sia nel tempo

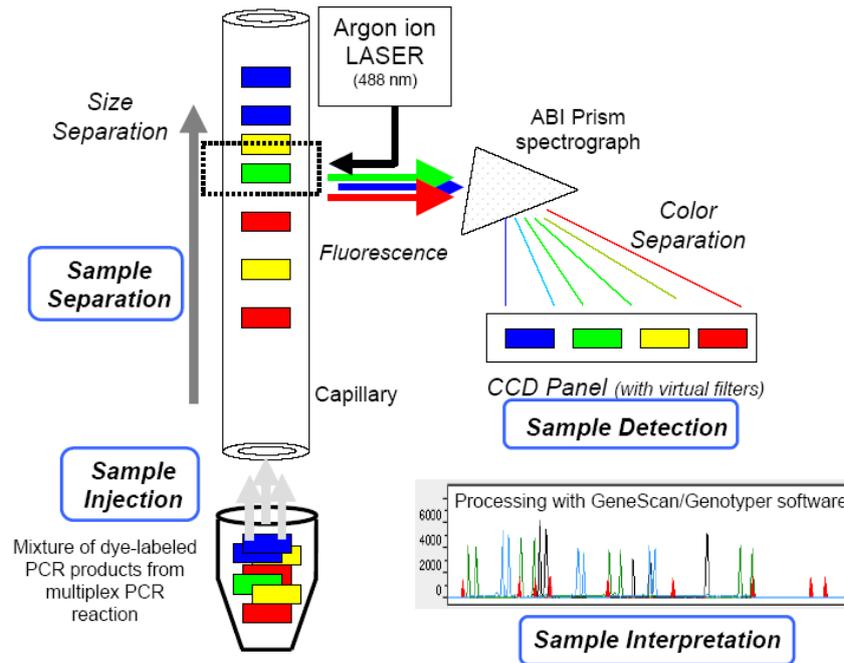
di migrazione sia nella risoluzione, infatti, a seconda della lunghezza vi sarà una proporzionalità diretta sulla durata dell'analisi e sulla capacità di risoluzione dei frammenti del DNA.

Altri componenti fondamentali per l'elettroforesi capillare sono il polimero e il buffer; il primo è costituito da dimetil poliacrilamide senza legami crociati a diverse concentrazioni, il secondo fornisce ioni per la conduzione della corrente elettroforetica e migliora l'iniezione del campione. Il funzionamento generale dell'elettroforesi capillare è il seguente: i campioni vengono caricati attraverso l'iniezione elettrocinetica che si verifica quando si applica un voltaggio all'elettrodo inserito nella provetta contenente il campione. Grazie a questo meccanismo l'analita viene attirato nel capillare. La quantità di materiale iniettato ( $[Q_{inj}]$ ) dipende dal campo elettrico ( $E$ ), dal tempo d'iniezione ( $t$ ), dalla reale concentrazione di DNA nel campione ( $[DNA_{sample}]$ ), dall'area del capillare ( $\pi r^2$ ) e dalla forza ionica del campione ( $\lambda_{sample}$ ) contro quella del buffer ( $\lambda_{buffer}$ ), come riporta l'equazione seguente:

$$[DNA_{inj}] = Et(\pi r^2)(\mu_{ep} + \mu_{eof}) [DNA_{sample}] (\lambda_{buffer} / \lambda_{sample})$$

dove  $r$  rappresenta il raggio del capillare,  $\mu_{ep}$  è la mobilità delle molecole del campione e  $\mu_{eof}$  è quella elettroosmotica, la quale è auspicabile sia nulla.

La migrazione e la separazione dei frammenti di DNA avviene grazie all'applicazione di una differenza di potenziale tra le due estremità del capillare, provocando il movimento delle molecole della soluzione con carica negativa verso l'elettrodo di carica opposta.



**Figura 12:** Schema della separazione e rilevazione degli SNP mediante ABI Prism 310. Tratta da Butler J.M. (2005) FORENSIC DNA TYPING -Biology, Technology, and Genetics of STR Markers- Elsevier Academic Press seconda edizione, London.

Esistono diversi sistemi di elettroforesi capillare prodotti; per questo lavoro è stato utilizzato un sequenziatore ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Life Technologies, USA).

Una quantità pari a 1,5 µl di ogni campione è stata diluita in 9,5 µl di formamide denaturante (Life Technologies, USA) aggiungendo 0,5 µl dello standard interno LIZ 120 (Life Technologies, USA), utile per la determinazione della lunghezza di ogni frammento. Dopo la preparazione i campioni vengono inseriti in un portacampioni da 48 posti per essere poi prelevati in modo del tutto automatico dall'apparecchiatura.

La presenza del nucleotide *wild-type* o mutato viene rilevata attraverso i fluorocromi legati ai dideossinucleotidi incorporati durante la reazione di minisequencing, che presentano la proprietà peculiare di essere eccitati dalla stessa lunghezza d'onda e di emettere ognuno con una lunghezza d'onda diversa.

Infatti, il charged-coupled device (CCD camera), dispositivo in grado di rilevare diverse lunghezze d'onda, registra la fluorescenza emessa da ciascun fluorocromo dopo esser stato eccitato dal laser, e in questo modo siamo in grado di dire quale base è presente in una determinata posizione analizzata.

Per quanto riguarda il *CYP2D6*, le informazioni quantitative utilizzate per definire l'assetto genotipico della duplicazione nei campioni eterozigoti, sono state ricavate dagli elettroferogrammi (Sistonen et al., 2005).

### 3.2.7 INFERENZA DELLA FASE GAMETICA

Dopo la lettura delle singole posizioni SNP è necessario inferire la fase gametica degli alleli per conoscere il genotipo del campione, a tal scopo è stato utilizzato il software PHASE ver2.1 (Stephens and Donnelly, 2003).

Il programma si basa su un metodo statistico Bayesiano che ricostruisce gli aplotipi a partire dai genotipi ottenuti dall'analisi effettuata nelle popolazioni (Stephens et al, 2001; Stephens and Donnelly, 2003).

In particolare il metodo bayesiano utilizzato per la ricostruzione aplotipica, tratta gli aplotipi (o alleli) sconosciuti come quantità casuali (*random*) e combina l'informazione a priori (quali *pattern* di aplotipi crediamo di poterci attendere di osservare nei campioni di popolazione), con la verosimiglianza (*likelihood*) data dall'informazione presente nei dati osservati in modo da calcolare la distribuzione a posteriori, cioè la distribuzione condizionata degli aplotipi non osservati (o frequenze aplotipiche), dati i genotipi osservati. Gli aplotipi (o alleli) possono essere stimati da questa distribuzione a posteriori, scegliendo, per esempio, la ricostruzione più probabile per ogni singolo individuo

### 3.2.8 DETERMINAZIONE DEL FENOTIPO E CONFRONTI STATISTICI TRA SOTTOGRUPPI

Una volta determinato il genotipo di ogni campione, il fenotipo è stato determinato sulla base della classificazione dell'*Activity Score* (Gaedigk et al., 2008) per tutte le isoforme del P450 analizzate in questo studio. Per quanto riguarda l'*ABCB1*, non essendo stati definiti "*star alleles*" in letteratura, in questo studio sono stati analizzati gli aplotipi individuati nel campione.

Le frequenze alleliche e fenotipiche ottenute sono state confrontate nei due sottogruppi presenti nel campione in analisi per mezzo del test di Fisher applicato a tabelle di contingenza RxC (RxC: [www.marksgeneticsoftware.net/rxc.htm](http://www.marksgeneticsoftware.net/rxc.htm)). Il programma calcola il test esatto di Fisher con tabelle di contingenza di qualsiasi dimensione attraverso l'uso dell'algoritmo Metropolis applicato a dati generati mediante catene di Markov al fine di ottenere una stima corretta del valore di p associato alle differenze osservate (Raymond e Rousset, 1995), considerando valori di  $p \leq 0,05$  come significativi.

### 3.2.9 VERIFICA DELLE CONDIZIONI DI EQUILIBRIO GENETICO

Per tutti i loci in esame è stata verificata la condizione di equilibrio genetico nelle popolazioni studiate, analizzando l'accordo tra frequenze attese ( $f_a$ ) e osservate ( $f_o$ ) secondo la legge di Hardy-Weinberg. Secondo questa legge in assenza di processi evolutivi come mutazione, migrazione, deriva, selezione, le frequenze geniche rimangono costanti da una generazione all'altra e le popolazioni si dicono in equilibrio genico. L'ipotesi nulla  $H_0$  che si va a testare assume che le popolazioni siano in equilibrio. A tale ipotesi di partenza è associato un valore p,

che indica la probabilità che le differenze tra frequenze attese e osservate siano casuali. Se il valore di quest'ultimo è inferiore al 5% (livello di significatività riferito al rischio che si corre di rigettare un'ipotesi anche se è vera) o al 1% (altamente significativo) non viene accettata l'ipotesi nulla perchè lo scostamento delle frequenze osservate da quelle attese è maggiore di quello attribuibile al caso. Se il valore di  $p$  è  $>0,05$ , la differenza tra frequenze osservate e attese è casuale e la popolazione risulta in equilibrio. Per la verifica delle condizioni di equilibrio genetico secondo Hardy-Weinberg, è stato utilizzato il software Arlequin versione 3.5 (Excoffier et al., 2010), che si basa su un metodo descritto da Guo e Thompson (1992).

### 3.3 RISULTATI

Le analisi sono state condotte analizzando un campione di 108 pazienti affetti da narcolessia con cataplessia e confrontando due sottopopolazioni presenti nello stesso campione, una composta da pazienti affetti da narcolessia con cataplessia ( $n=62$ ) e una che include 46 pazienti con diagnosi di narcolessia con cataplessia e con profilo psicopatologico evidenziato dalla somministrazione di questionari appositi riguardanti disturbi alimentari e tratti di personalità ansiosa e depressa.

### 3.3.1 CONDIZIONI DI EQUILIBRIO GENETICO

L'equilibrio genetico stabilisce che la composizione genetica di una popolazione rimanga in equilibrio in assenza di processi evolutivi quali mutazioni, migrazioni, deriva e selezione. Per tutti i loci analizzati in questo studio è stata verificata la condizione di equilibrio genetico nel campione. Il software Arlequin versione 3.5, utilizzato a questo proposito, ha restituito valori di  $p > 0,05$  per tutti i loci in esame, che soddisfano, quindi, le condizioni di equilibrio di Hardy-Weinberg.

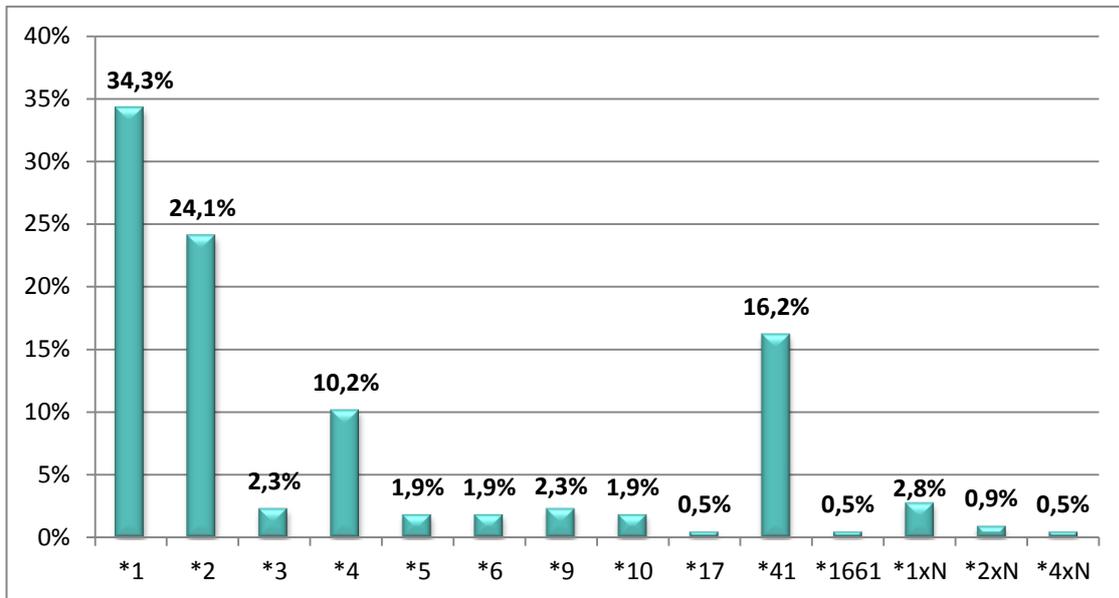
### 3.3.2 DISTRIBUZIONE DELLE FREQUENZE ALLELICHE E FENOTIPICHE

L'inferenza aplotipica è stata condotta separatamente per tutti i geni in analisi utilizzando il software Phase 2.1.1. Il programma restituisce un *output file* nel quale sono presenti tutte le permutazioni aplotipiche possibili. Per tutti i geni in esame, sono state analizzate le distribuzioni alleliche (o aplotipiche) e fenotipiche nel campione.

#### 3.3.3.1 CYP2D6

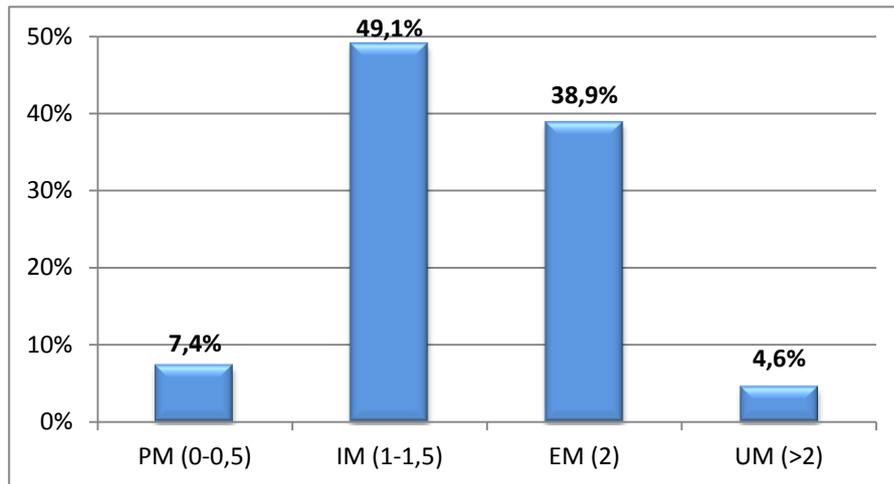
In figura 13 è mostrata la distribuzione delle frequenze degli alleli del *CYP2D6* nel campione analizzato. Le varianti più frequenti sono quelle a funzionalità normale: l'allele \*1 è il più rappresentato (34,3%), seguito dall'allele \*2. Tra gli alleli a funzionalità ridotta, l'allele \*41 è quello che raggiunge la frequenza più alta (16,2%), mentre tra gli alleli a funzionalità nulla, l'allele \*4, molto rappresentato nella popolazione caucasica, raggiunge la frequenza del 10,2%. Le duplicazioni

geniche di alleli funzionali (\*1xN, \*2xN) raggiungono complessivamente una frequenza del 3,7%, mentre solo 4 campioni tra quelli analizzati (1,9%) presentano la delezione dell'intero gene.



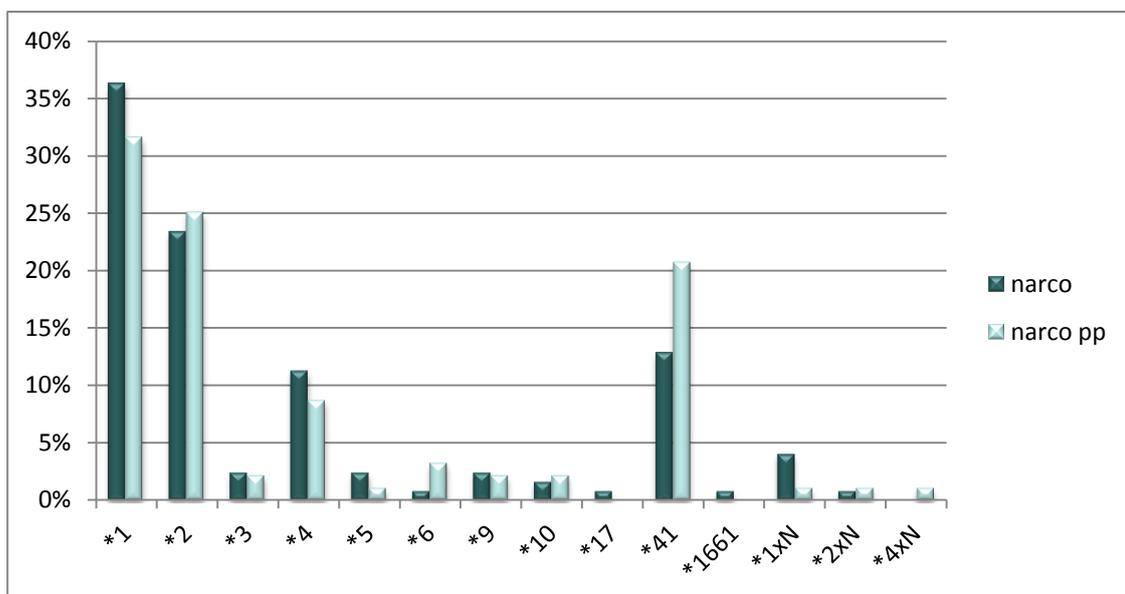
**Figura 13:** distribuzione delle frequenze alleliche del CYP2D6 nel campione di pazienti narcolettici.

La distribuzione delle frequenze fenotipiche mostra una frequenza molto alta del fenotipo IM (49,1%) che raggruppa, secondo la classificazione in base al calcolo dell'*Activity Score*, gli individui con un punteggio di 1 e 1,5. Il fenotipo EM è presente nel 38,9% dei campioni analizzati mentre gli individui a metabolismo lento e ultrarapido raggiungono frequenze rispettivamente del 7,4% e del 4,6% (figura 14).



**Figura 14:** frequenze dei fenotipi CYP2D6 nel campione analizzato. In ascissa sono indicati sia i fenotipi secondo la classificazione tradizionale che punteggi dell'Activity Score.

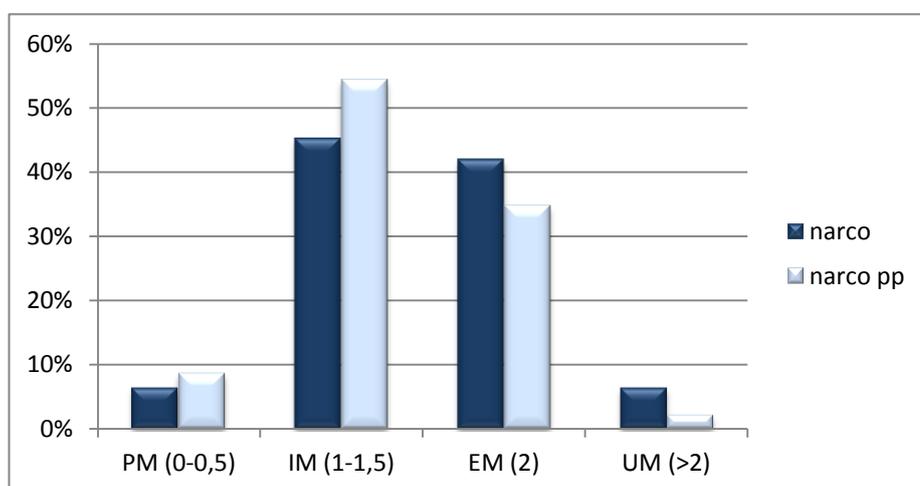
Confrontando le frequenze alleliche del CYP2D6 nei due sottogruppi popolazionistici presenti nel campione (figura 15), si osservano frequenze comparabili nonostante si osservi, nel gruppo dei campioni con profilo psicopatologico, una frequenza più alta di alleli \*41 (20,7%).



**Figura 15:** confronto della distribuzione delle frequenze alleliche tra i due sottogruppi del campione (narco pp: sottogruppo con profilo psicopatologico).

Le tabelle di contingenza RxC utilizzate per analizzare le differenze tra le due sottopopolazioni, restituiscono un *p-value* pari a 0,776820.

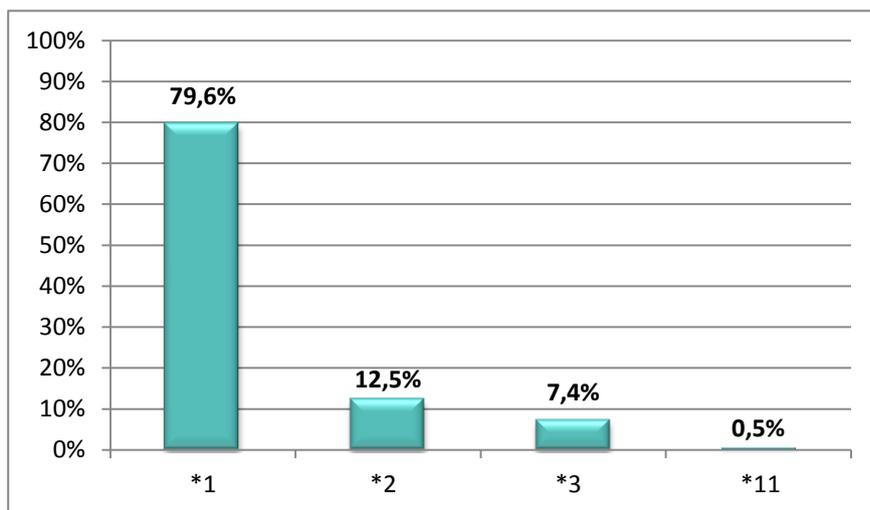
Anche la distribuzione delle frequenze fenotipiche a confronto non evidenzia sostanziali differenze nei due sottogruppi (figura 16); inoltre, l'analisi delle frequenze mediante tabelle di contingenza RxC restituisce un *p-value* di 0,580940.



**Figura 16:** confronto delle frequenze fenotipiche tra i due sottogruppi nel campione analizzato (narco pp: sottogruppo con profilo psicopatologico).

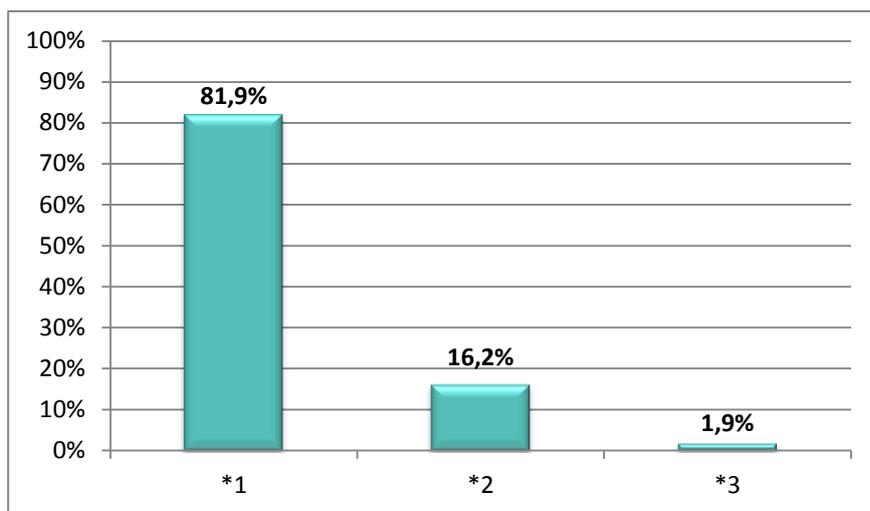
### 3.3.3.2 CYP2C9

La distribuzione delle frequenze alleliche del CYP2C9 nel campione analizzato, mostra una frequenza del 79,6% dell'allele *wild-type* (allele \*1). Gli alleli ad attività intermedia \*2, \*3 e \*11, invece, raggiungono, rispettivamente, frequenze di 12,5%, 7,4% e 0,5% (figura 17).



**Figura 17:** alleli del *CYP2C9* riscontrati nell'analisi e relative frequenze.

### 3.3.3.3 CYP2C19



**Figura 18:** frequenze alleliche del *CYP2C19*.

Anche per quanto riguarda il *CYP2C19*, all'interno del campione analizzato l'allele \*1 risulta essere il più frequente (81,9%) mentre gli alleli ad attività nulla \*2 e \*3 raggiungono rispettivamente una frequenza del 16,2% e dell'1,9%, rispettivamente (figura 18).

### 3.3.3.4 CYP3A4

La figura 19 mostra la distribuzione allelica del gene CYP3A4 nel campione analizzato. Come si evince dall'istogramma in figura x, si registra un'alta frequenza dell'allele \*1 (97,7%), *wild-type* del CYP3A4, ed una bassa frequenza dell'allele \*1B (2,3%) ad attività intermedia.

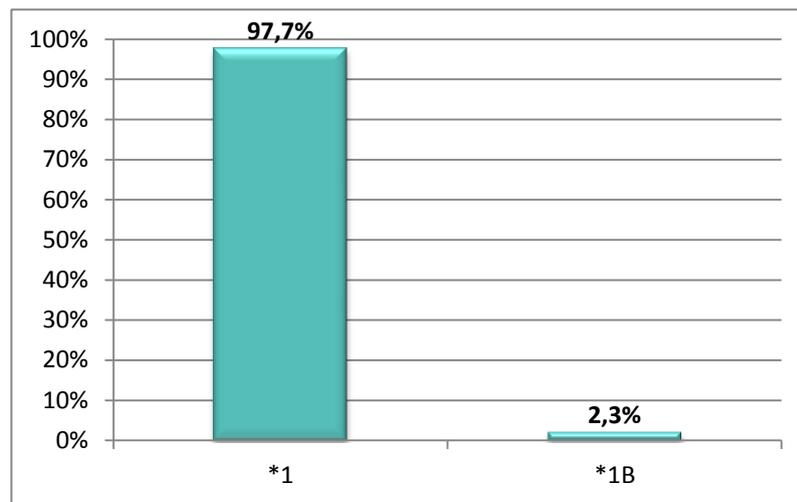
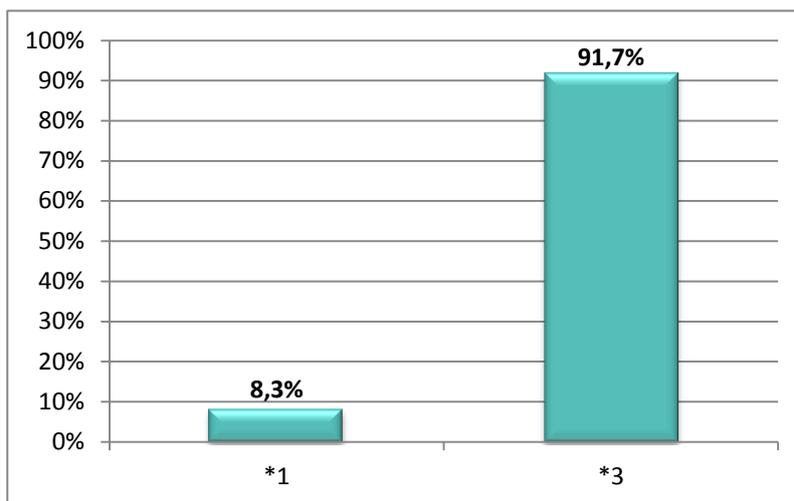


Figura 19: alleli del CYP3A4 e relative frequenze.

### 3.3.3.5 CYP3A5

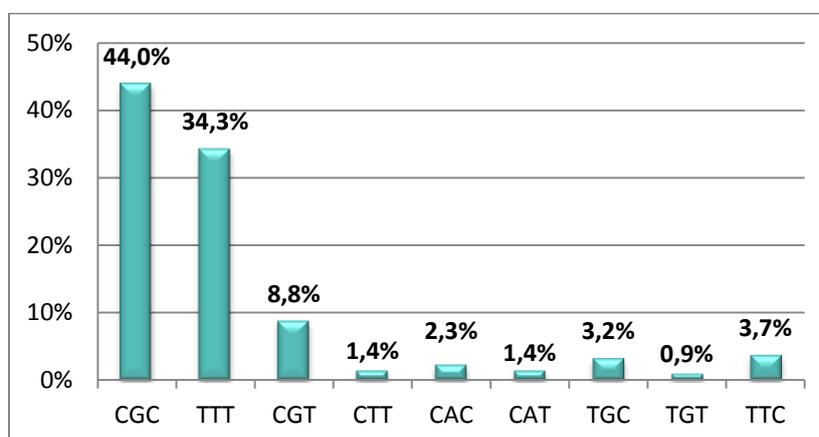
Per quanto riguarda il CYP3A5 (figura 20), l'allele ad attività intermedia \*3 (91,7%) è molto più frequente nel campione rispetto all'allele *wild-type* (allele \*1, 8,3%).



**Figura 20:** distribuzione degli alleli del CYP3A5 riscontrati nel campione.

### 3.3.3.6 ABCB1

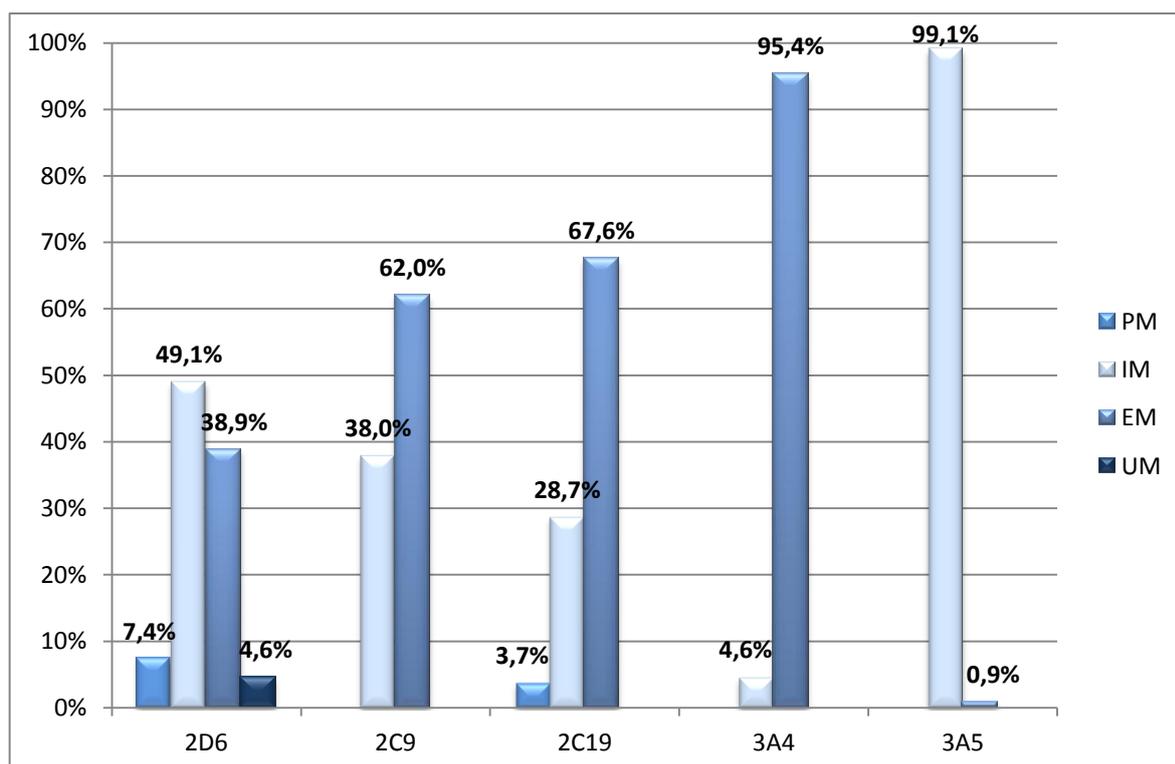
Per quanto riguarda la distribuzione aplotipica dell'ABCB1, gli aplotipi più frequenti nella popolazione dei pazienti narcolettici sono l'aplotipo *wild-type* CGC (44%) e l'aplotipo TTT (34,3%), in cui tutte le posizioni SNP analizzate si trovano nella variante mutata. Tutti gli altri aplotipi osservati nel campione raggiungono frequenze relativamente più basse che vanno dallo 0,9% dell'aplotipo TGT all'8,8% dell'aplotipo CGT (figura 21).



**Figura 21:** distribuzione delle frequenze aplotipiche del gene ABCB1 osservate nel campione.

### 3.3.4 DISTRIBUZIONE FENOTIPICA NEL CAMPIONE

L'istogramma in figura 22 mostra la distribuzione delle frequenze fenotipiche relative alle isoforme del P450 analizzate in questo studio e fornisce una visione d'insieme dell'attività metabolica presente nel campione.



**Figura 22:** distribuzione delle frequenze fenotipiche relative a tutte le isoforme del P450 analizzate nel campione.

Per il CYP2D6, il fenotipo IM è rappresentato in quasi la metà degli individui analizzati (49,1%). Per quanto riguarda il CYP2C9, la distribuzione dei fenotipi nella popolazione rispecchia quella delle frequenze alleliche, mostrando una prevalenza di individui EM (62,0%). Anche per il CYP2C19 e per il CYP3A4 si osserva una più alta frequenza di individui a metabolismo normale (67,6%, 95,4%) rispetto a quelli con metabolismo lento o intermedio. Diversamente, per il CYP3A5, la distribuzione delle frequenze fenotipiche mostra un'alta percentuale di

fenotipi IM (99,1%), mentre è stata riscontrata la presenza di un unico campione con fenotipo EM (0,9%).

### 3.4 DISCUSSIONE

Le differenze interindividuali che portano ad una diversa risposta alla terapia dipendono, oltre che da fattori ambientali e fisiopatologici, anche dalla variabilità degli enzimi implicati nel metabolismo e nel trasporto dei farmaci. Lo studio di questi geni nell'ambito della ricerca farmacogenetica può permettere di impostare, nella pratica clinica, una terapia personalizzata, prescrivendo il farmaco appropriato nella giusta dose al giusto paziente, massimizzando l'efficacia della terapia ed evitando le reazioni avverse al farmaco. Questo obiettivo potrebbe avere particolare importanza nei disturbi cronici trattati in regime politerapico, come la narcolessia. La narcolessia è un disturbo neurologico cronico la cui terapia di tipo sintomatologico coinvolge la somministrazione di più farmaci che comprendono la venlafaxina e il modafinil. La venlafaxina viene metabolizzata principalmente dal CYP2D6 e il fenotipo PM di questo gene è stato associato ad elevate concentrazioni plasmatiche del farmaco e ad aritmia (Ereshefsky e Dugan, 2000). La venlafaxina è anche substrato anche della glicoproteina P (Uhr et al., 2003; Karlsson et al., 2010) e delle isoforme CYP2C19 e CYP3A4 (Lindh et al., 2003; McAlpine et al., 2011) ed è stato dimostrato un coinvolgimento del CYP2C9 nel metabolismo di questo farmaco *in vitro* (Fogelman et al., 1999). Il modafinil è metabolizzato dal CYP3A4 e gioca un ruolo nell'induzione del CYP3A4 e

nell'inibizione del CYP2C19 (Robertson e Hellriegel, 2003) e della glicoproteina P (Uhr et al., 2003; Karlsson et al., 2010).

Le analisi sono state condotte su un campione di 108 pazienti con diagnosi di narcolessia con cataplessia afferenti al Dipartimento di Scienze Neurologiche dell'Università di Bologna. Il campione analizzato è stato suddiviso in due sottogruppi, uno dei quali composto da pazienti con diagnosi di narcolessia e con un profilo psicopatologico determinato da alti punteggi nei questionari riguardanti i disturbi alimentari.

Uno degli obiettivi di questo studio era di confrontare la distribuzione fenotipica del *CYP2D6* tra i due sottogruppi presenti nel campione, nel tentativo di verificare l'associazione tra i soggetti che presentano un profilo psicopatologico e una distribuzione fenotipica con una maggiore frequenza di soggetti a metabolismo ultrarapido. Le frequenze fenotipiche nei due gruppi sono state confrontate mediante tabelle di contingenza RxC che hanno riportato un *p-value* superiore al livello di significatività utilizzato ( $p=0,05$ ), indicando una sostanziale omogeneità tra i due gruppi. Inoltre, sono state confrontate nei due gruppi le distribuzioni delle frequenze alleliche e, anche in questo caso, le differenze non sono risultate essere statisticamente significative. Di conseguenza, il profilo psicopatologico rilevato per questo sottogruppo di pazienti potrebbe essere parte integrante del fenotipo sintomatologico della malattia e non un carattere associato al fenotipo del *CYP2D6*.

Al fine di comporne il profilo farmacogenetico, i campioni sono stati tipizzati per il gene *ABCB1* e per le isoforme del P450 *CYP2D6*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A4* e *CYP3A5*.

La distribuzione delle frequenze alleliche del *CYP2D6* evidenzia un'alta frequenza dell'allele \*41. Una presenza così elevata di questo allele non concilia con la frequenza individuata in altri studi effettuati sulla popolazione caucasica, in cui la frequenza registrata è del 7% (Sistonen et al., 2007), come dimostrato dalle tabelle di contingenza RxC ( $p=0,00042$ ). L'allele \*41 codifica per una proteina ad attività ridotta e in questa popolazione di pazienti narcolettici è la variante responsabile dell'elevata frequenza di individui a metabolismo intermedio.

Per quanto riguarda i geni *CYP2C9* e *CYP2C19*, le frequenze alleliche sono in accordo con i dati disponibili in letteratura (Sistonen et al., 2009) e mostrano che nonostante gli alleli maggiormente distribuiti siano le varianti *wild-type* (\*1), gli alleli ad attività ridotta e annullata (2C9\*2, \*3, \*11; 2C19\*2, \*3) mostrano comunque una frequenza complessiva di circa il 40%.

Nel campione è stata rilevata anche una frequenza del 2,3% dell'allele 3A4\*1B, causato dalla mutazione dello SNP -392A>G, dato in accordo con la letteratura (van Schaik et al., 2000). L'effetto di questo SNP sulla funzionalità enzimatica del *CYP3A4* non è stato ancora pienamente chiarito, anche se molti studi suggeriscono che possa conferire un'attività diminuita (Dally et al., 2003).

Una funzionalità enzimatica ridotta è stata pienamente dimostrata anche per l'allele \*3 del *CYP3A5*, riscontrato nel 91,7% dei campioni: tale frequenza, comunque, collima con quella attestata in letteratura (van Schaik et al., 2002).

La distribuzione fenotipica relativa a tutti i geni P450 analizzati, mostra un'alta frequenza di fenotipi a metabolismo normale, anche se comunque, è presente una parte di individui con un metabolismo ad attività alterata. In generale, individui con un metabolismo alterato richiedono una particolare attenzione nella prescrizione di farmaci al fine di evitare eventuali reazioni farmacologiche avverse o fallimento

terapeutico. Data la possibile interazione farmacologica tra venlafaxina e modafinil, la co-somministrazione dei due farmaci, eventualmente in dosi elevate, potrebbe dar luogo a fenomeni di *phenocopying* e *autophenocopying* portando anche pazienti portatori di alleli a funzionalità normale ad esperire reazioni avverse al farmaco.

La distribuzione aplotipica dell'*ABCB1* mostra che i due aplotipi più frequenti sono il wild-type CGC e il mutato TTT. L'alta frequenza (34,3%) dell'aplotipo TTT è da tenere in considerazione poiché, nonostante non sia stata ad oggi accertata quale sia la funzionalità conferita dall'aplotipo TTT alla glicoproteina P, alcuni studi mostrano che questo aplotipo influisce marcatamente sulla struttura quaternaria della glicoproteina P e, conseguentemente, sulla sua funzione (Kimchi-Sarfaty et al., 2007 a, b; Fung e Gottesman, 2009) contribuendo ad una farmacocinetica alterata dei farmaci substrato della P-gp. La glicoproteina P è importante per il trasporto della venlafaxina (Uhr et al., 2003; Karlsson et al., 2010), di conseguenza gli individui portatori dell'aplotipo TTT in eterozigosi e soprattutto in omozigosi possono essere soggetti a reazioni avverse al farmaco. Inoltre, dato che la glicoproteina P può subire un'inibizione dell'attività enzimatica attraverso il modafinil (Zhu et al., 2008), in caso di coterapia, le reazioni avverse possono manifestarsi anche in soggetti portatori dell'aplotipo *wild-type*.

# CONCLUSIONI

---

Nonostante i progressi effettuati, la farmacoterapia deve affrontare ancora molte sfide come le reazioni avverse ai farmaci, a volte molto gravi o letali, ed il fallimento delle terapie standard. L'elevata variabilità interindividuale alla risposta terapeutica dipende in parte da fattori quali età, sesso, peso, la presenza di eventuali patologie epatiche o renali, la concomitanza di altre terapie, eterogeneità delle malattie, stato nutrizionale o stili di vita non salutari come il fumo. A tutti questi parametri si aggiunge la variabilità degli enzimi metabolizzanti i farmaci, delle proteine di trasporto, dei recettori e delle molecole che attivano le cascate trasduzionali. La farmacogenetica tenta di definire l'influenza di tutti questi fattori genetici sull'efficacia della terapia e sulle reazioni avverse, focalizzandosi sullo studio degli effetti delle mutazioni nei singoli geni.

Tra gli enzimi implicati nel metabolismo dei farmaci, il sistema P450, con il suo vasto polimorfismo genetico, costituisce la famiglia enzimatica che catalizza la biotrasformazione della maggior parte dei farmaci somministrati nella pratica clinica. In particolare, il *CYP2D6*, l'isoforma maggiormente polimorfica e caratterizzata a livello molecolare, è coinvolto nel metabolismo di una grande varietà di farmaci nel fegato e sostanze endogene nel cervello.

La predizione degli effetti di un farmaco su un determinato paziente rappresenta ancora una visione molto lontana dall'attuale pratica clinica e riconoscere i fattori genetici che contribuiscono alla variabilità nella risposta ai farmaci ha una importante ricaduta in ambito clinico soprattutto per i farmaci con un basso indice terapeutico e in trattamenti a regime politerapico, come per esempio nel caso della

narcolessia. Il trattamento della narcolessia coinvolge infatti la somministrazione contemporanea di più farmaci al fine di effettuare un trattamento di tipo unicamente sintomatologico. La narcolessia è un disturbo neurologico cronico la cui terapia coinvolge la somministrazione di più farmaci tra cui la venlafaxina e il modafinil. La venlafaxina viene metabolizzata principalmente dal CYP2D6 e da altre isoforme, quali CYP2C19 e CYP3A4, mentre studi *in vitro* indicano un coinvolgimento del CYP2C9, inoltre il trasporto del farmaco è a carico della glicoproteina P. Il modafinil è metabolizzato dal CYP3A4 e gioca un ruolo nella sua induzione, nell'inibizione del CYP2C19, nell'induzione e nell'inibizione del CYP3A5, nella soppressione dell'attività del CYP2C9 *in vitro* e pare inibire l'attività enzimatica della glicoproteina P.

La scoperta del coinvolgimento del CYP2D6 nella biosintesi di sostanze endogene a livello cerebrale, ha portato alla produzione scientifica di studi relativi all'associazione tra il polimorfismo del *CYP2D6* e disordini di tipo psichiatrico. In particolare, uno studio effettuato su soggetti sani, ha identificato una associazione tra il metabolismo ultrarapido e i disturbi alimentari. In letteratura, i sintomi associati a disturbi alimentari sono stati frequentemente osservati nei pazienti con narcolessia, giustificando la necessità di una maggiore attenzione nel trattamento di questi pazienti.

In questo studio sperimentale sono stati tipizzati i geni *CYP2D6*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A4*, *CYP3A5* e *ABCB1* allo scopo sia di indagare l'associazione tra fenotipo ultrarapido del *CYP2D6* e disturbi alimentari in pazienti affetti da narcolessia con cataplessia, che di caratterizzare il profilo farmacogenetico di tali pazienti. La tecnica utilizzata è quella del *minisequencing*, che permette

l'estensione di una singola base di sonde non marcate mediante l'aggiunta di dideossinucleotidi trifosfato marcati con fluorocromi.

I risultati di questo studio indicano che il fenotipo ultrarapido del *CYP2D6* non correla in maniera statisticamente significativa con i disturbi alimentari nei pazienti affetti da narcolessia con cataplessia. Questo risultato induce quindi a pensare che i disturbi alimentari siano strettamente correlati al quadro sintomatologico del disturbo oppure che rappresentino un carattere associato a basi genetiche o fisiopatologiche di diverso tipo. Ulteriori studi in questo senso, potrebbero migliorare gli aspetti relativi alla qualità della vita, dato che sintomi di tipo psichiatrico, come i disturbi alimentari, possono interferire con le funzioni quotidiane del paziente.

La qualità di vita dei pazienti affetti da narcolessia con cataplessia potrebbe essere migliorata anche ottimizzando gli effetti della terapia farmacologica. Le reazioni avverse al farmaco rappresentano oggi una frequente causa di morte e di ammissione ospedaliera e sono spesso dovute a interazioni tra farmaci somministrati in politerapia e alla prescrizione di farmaci spesso non appropriati o in dosi errate. Ne deriva inevitabilmente che la conoscenza della responsività individuale ad un determinato farmaco permetta sia di raggiungere l'obiettivo terapeutico prefissato grazie ad una terapia personalizzata, sia di ridurre le probabilità di manifestare effetti indesiderati. I progressi effettuati nel campo della ricerca farmacogenetica possono gettare le basi per la predizione della risposta di un paziente ad un determinato farmaco consentendo di creare in futuro dei percorsi terapeutici personalizzati.

La distribuzione fenotipica osservata per i geni *CYP2D6*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A4*, *CYP3A5* e *ABCB1*, tipizzati in questo studio mostra un'alta frequenza di

fenotipi ad attività intermedia e questo dato, insieme alla possibile interazione tra i farmaci utilizzati nel trattamento dei pazienti affetti da narcolessia con cataplessia, indica la necessità di una maggiore attenzione alla genetica del paziente a monte della prescrizione farmacologica. Inquadrare i trattamenti farmacologici nell'ambito di una terapia personalizzata, soprattutto per i disturbi cronici e in pazienti trattati in regime politerapico, porterebbe alla selezione del farmaco appropriato nel giusto dosaggio per il giusto paziente migliorando l'effetto terapeutico e la qualità di vita del paziente, evitando quel processo di aggiustamento terapeutico per tentativi ed errori, tipico dell'attuale pratica medica. Infine, l'inquadramento della terapia nel contesto della medicina personalizzata, attuati grazie all'impiego delle conoscenze in campo farmacogenetico, potrebbe anche apportare benefici in materia di sanità pubblica riducendo l'incidenza delle reazioni avverse al farmaco e portando ad una diminuzione dei costi per il sistema sanitario.

# BIBLIOGRAFIA

---

Aarnoudse AJ, Dieleman JP, Visser LE, Arp PP, van der Heiden IP, van Schaik RH, Molokhia M, Hofman A, Uitterlinden AG, Stricker BH. Common ATP-binding cassette B1 variants are associated with increased digoxin serum concentration. *Pharmacogenet Genomics*. 2008 Apr;18(4):299-305.

Abraham JE, Maranian MJ, Driver KE, Platte R, Kalmyrzaev B, Baynes C, Luccarini C, Shah M, Ingle S, Greenberg D, Earl HM, Dunning AM, Pharoah PD, Caldas C. CYP2D6 gene variants: association with breast cancer specific survival in a cohort of breast cancer patients from the United Kingdom treated with adjuvant tamoxifen. *Breast Cancer Res*. 2010;12(4):R64.

Agundez JA. Cytochrome P450 gene polymorphism and cancer. *Curr Drug Metab*. 2004 Jun;5(3):211-24.

Ahn TJ, Park K, Son DS, Huh N, Oh S, Bae T, Park JS, Lee JH, Rho K, Kim S, Park T, Lee K. Selecting SNPs for pharmacogenomic association study. *Int J Data Min Bioinform*. 2012;6(5):521-34.

Alexanderson B, Evans DA, Sjöqvist F. Steady-state plasma levels of nortriptyline in twins: influence of genetic factors and drug therapy. *Br Med J*. 1969 Dec 27;4(5686):764-8.

Alving AS, Carson PE, Flanagan CL, Ickes CE. Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. *Science* 1956 124:484-485.

American Academy of Sleep Medicine. *International Classification of Sleep Disorders: diagnostic and coding manual*. 2nd ed. Westchester, IL: American Academy of Sleep Medicine; 2005.

Bachmeier CJ, Beaulieu-Abdelahad D, Ganey NJ, Mullan MJ, Levin GM. Induction of drug efflux protein expression by venlafaxine but not desvenlafaxine. *Biopharm Drug Dispos*. 2011 May;32(4):233-44.

Bastuji H, Jouvet M. Successful treatment of idiopathic hypersomnia and narcolepsy with modafinil. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1988;12(5):695-700.

Bertilsson L, Dahl ML, Sjöqvist F, Aberg-Wistedt A, Humble M, Johansson I, Lundqvist E, Ingelman-Sundberg M. Molecular basis for rational megaprescribing in ultrarapid hydroxylators of debrisoquine. *Lancet*. 1993 Jan 2;341(8836):63.

Bertilsson L, Henthorn TK, Sanz E, Tybring G, Säwe J, Villén T. Importance of genetic factors in the regulation of diazepam metabolism: relationship to S-

mephenytoin, but not debrisoquin, hydroxylation phenotype. *Clin Pharmacol Ther.* 1989 Apr;45(4):348-55.

Bertilsson L. Metabolism of antidepressant and neuroleptic drugs by cytochrome p450s: clinical and interethnic aspects. *Clin Pharmacol Ther.* 2007 Nov;82(5):606-9.

Biederman J, Pliszka SR. Modafinil improves symptoms of attention-deficit/hyperactivity disorder across subtypes in children and adolescents. *J Pediatr.* 2008 Mar;152(3):394-9.

Bijl MJ, Visser LE, van Schaik RH, Kors JA, Witteman JC, Hofman A, Vulto AG, van Gelder T, Stricker BH. Genetic variation in the CYP2D6 gene is associated with a lower heart rate and blood pressure in beta-blocker users. *Clin Pharmacol Ther.* 2009 Jan;85(1):45-50.

Black J, Houghton WC. Sodium oxybate improves excessive daytime sleepiness in narcolepsy. *Sleep.* 2006 Jul;29(7):939-46.

Black J, Pardi D, Hornfeldt CS, Inhaber N. The nightly use of sodium oxybate is associated with a reduction in nocturnal sleep disruption: a double-blind, placebo-controlled study in patients with narcolepsy. *J Clin Sleep Med.* 2010 Dec 15;6(6):596-602.

Black JE, Brooks SN, Nishino S. Conditions of primary excessive daytime sleepiness. *Neurol Clin.* 2005 Nov;23(4):1025-44.

Blakey JD, Hall IP. Current progress in pharmacogenetics. *Br J Clin Pharmacol.* 2011 Jun;71(6):824-31.

Boulenc X, Djebli N, Shi J, Perrin L, Brian W, Van Horn R, Hurbin F. Effects of omeprazole and genetic polymorphism of CYP2C19 on the clopidogrel active metabolite. *Drug Metab Dispos.* 2012 Jan;40(1):187-97.

Bourgin P, Zeitzer JM, Mignot E. CSF hypocretin-1 assessment in sleep and neurological disorders. *Lancet Neurol.* 2008 Jul;7(7):649-62. Erratum in: *Lancet Neurol.* 2008 Sep;7(9):771.

Brauch H, Mürdter TE, Eichelbaum M, Schwab M. Pharmacogenomics of tamoxifen therapy. *Clin Chem.* 2009 Oct;55(10):1770-82.

Brauch H, Schroth W, Goetz MP, Mürdter TE, Winter S, Ingle JN, Schwab M, Eichelbaum M. Tamoxifen use in postmenopausal breast cancer: CYP2D6 matters. *J Clin Oncol.* 2013 Jan 10;31(2):176-80.

Brinkmann U, Roots I, Eichelbaum M. Pharmacogenetics of the human drug-transporter gene MDR1: impact of polymorphisms on pharmacotherapy. *Drug Discov Today.* 2001 Aug 15;6(16):835-839.

Broderick M, Guilleminault C. Rebound cataplexy after withdrawal from antidepressants. *Sleep Med.* 2009 Apr;10(4):403-4.

- Bromek E, Haduch A, Gołombiowska K, Daniel WA. Cytochrome P450 mediates dopamine formation in the brain in vivo. *J Neurochem*. 2011 Sep;118(5):806-15.
- Brøsen K. Some aspects of genetic polymorphism in the biotransformation of antidepressants. *Therapie*. 2004 Jan-Feb;59(1):5-12.
- Broughton R, Mamelak M. The treatment of narcolepsy-cataplexy with nocturnal gamma-hydroxybutyrate. *Can J Neurol Sci*. 1979 Feb;6(1):1-6.
- Broughton RJ, Guberman A, Roberts J. Comparison of the psychosocial effects of epilepsy and narcolepsy/cataplexy: a controlled study. *Epilepsia*. 1984 Aug;25(4):423-33.
- Broughton WA, Broughton RJ. Psychosocial impact of narcolepsy. *Sleep*. 1994 Dec;17(8 Suppl):S45-9.
- Cascorbi I, Gerloff T, John A, Meisel C, Hoffmeyer S, Schwab M, Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U, Roots I. Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther*. 2001 Mar;69(3):169-74. Erratum in: *Clin Pharmacol Ther*. 2004 Jan;75(1):124.
- Chabas D, Foulon C, Gonzalez J, Nasr M, Lyon-Caen O, Willer JC, Derenne JP, Arnulf I. Eating disorder and metabolism in narcoleptic patients. *Sleep*. 2007 Oct;30(10):1267-73.
- Christensen PM, Gøtzsche PC, Brøsen K. The sparteine/debrisoquine (CYP2D6) oxidation polymorphism and the risk of Parkinson's disease: a meta-analysis. *Pharmacogenetics*. 1998 Dec;8(6):473-9.
- Clark AG. Invasion and maintenance of a gene duplication. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994 Apr 12;91(8):2950-4.
- Cohen JP. Overcoming regulatory and economic challenges facing pharmacogenomics. *N Biotechnol*. 2012 Sep 15;29(6):751-6.
- Coller JK, Krebsfaenger N, Klein K, Endrizzi K, Wolbold R, Lang T, Nüssler A, Neuhaus P, Zanger UM, Eichelbaum M, Mürdter TE. The influence of CYP2B6, CYP2C9 and CYP2D6 genotypes on the formation of the potent antioestrogen Z-4-hydroxy-tamoxifen in human liver. *Br J Clin Pharmacol*. 2002 Aug;54(2):157-67.
- Collet JP, Hulot JS, Pena A, Villard E, Esteve JB, Silvain J, Payot L, Brugier D, Cayla G, Beygui F, Bensimon G, Funck-Brentano C, Montalescot G. Cytochrome P450 2C19 polymorphism in young patients treated with clopidogrel after myocardial infarction: a cohort study. *Lancet*. 2009 Jan 24;373(9660):309-17.
- Crisafulli C, Fabbri C, Porcelli S, Drago A, Spina E, De Ronchi D, Serretti A. Pharmacogenetics of antidepressants. *Front Pharmacol*. 2011;2:6.
- Dahmen N, Kasten M, Mittag K, Müller MJ. Narcoleptic and schizophrenic hallucinations. Implications for differential diagnosis and pathophysiology. *Eur J Health Econ*. 2002 Nov;3 Suppl 2:S94-8.

Dally H, Edler L, Jäger B, Schmezer P, Spiegelhalder B, Dienemann H, Drings P, Schulz V, Kayser K, Bartsch H, Risch A. The CYP3A4\*1B allele increases risk for small cell lung cancer: effect of gender and smoking dose. *Pharmacogenetics*. 2003 Oct;13(10):607-18.

Daly AK, Fairbrother KS, Andreassen OA, London SJ, Idle JR, Steen VM. Characterization and PCR-based detection of two different hybrid CYP2D7P/CYP2D6 alleles associated with the poor metabolizer phenotype. *Pharmacogenetics*. 1996 Aug;6(4):319-28.

Daly AK. Significance of the minor cytochrome P450 3A isoforms. *Clin Pharmacokinet*. 2006;45(1):13-31.

Danielson PB. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Curr Drug Metab*. 2002 Dec;3(6):561-97.

Dansette PM, Rosi J, Bertho G, Mansuy D. Cytochromes P450 catalyze both steps of the major pathway of clopidogrel bioactivation, whereas paraoxonase catalyzes the formation of a minor thiol metabolite isomer. *Chem Res Toxicol*. 2012 Feb 20;25(2):348-56.

Darbar D, Roden DM. Pharmacogenetics of antiarrhythmic therapy. *Expert Opin Pharmacother*. 2006 Aug;7(12):1583-90.

Darwish M, Kirby M, Hellriegel ET, Robertson P Jr. Armodafinil and modafinil have substantially different pharmacokinetic profiles despite having the same terminal half-lives: analysis of data from three randomized, single-dose, pharmacokinetic studies. *Clin Drug Investig*. 2009;29(9):613-23.

Darwish M, Kirby M, Robertson P Jr, Hellriegel ET. Interaction profile of armodafinil with medications metabolized by cytochrome P450 enzymes 1A2, 3A4 and 2C19 in healthy subjects. *Clin Pharmacokinet*. 2008;47(1):61-74.

Dauvilliers Y, Arnulf I, Mignot E. Narcolepsy with cataplexy. *Lancet*. 2007 Feb 10;369(9560):499-511.

Dauvilliers Y, Baumann CR, Carlander B, Bischof M, Blatter T, Lecendreux M, Maly F, Besset A, Touchon J, Billiard M, Tafti M, Bassetti CL. CSF hypocretin-1 levels in narcolepsy, Kleine-Levin syndrome, and other hypersomnias and neurological conditions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2003 Dec;74(12):1667-73.

Dauvilliers Y, Billiard M, Montplaisir J. Clinical aspects and pathophysiology of narcolepsy. *Clin Neurophysiol*. 2003 Nov;114(11):2000-17.

Dauvilliers Y, Gosselin A, Paquet J, Touchon J, Billiard M, Montplaisir J. Effect of age on MSLT results in patients with narcolepsy-cataplexy. *Neurology*. 2004 Jan 13;62(1):46-50.

Dauvilliers Y, Montplaisir J, Molinari N, Carlander B, Ondze B, Besset A, Billiard M. Age at onset of narcolepsy in two large populations of patients in France and Quebec. *Neurology*. 2001 Dec 11;57(11):2029-33.

de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS 2nd, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jan 6;95(1):322-7.

De Morais SM, Wilkinson GR, Blaisdell J, Meyer UA, Nakamura K, Goldstein JA. Identification of a new genetic defect responsible for the polymorphism of (S)-mephenytoin metabolism in Japanese. *Mol Pharmacol*. 1994a Oct;46(4):594-8.

de Morais SM, Wilkinson GR, Blaisdell J, Nakamura K, Meyer UA, Goldstein JA. The major genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans. *J Biol Chem*. 1994b Jun 3;269(22):15419-22.

Dehal SS, Kupfer D. CYP2D6 catalyzes tamoxifen 4-hydroxylation in human liver. *Cancer Res*. 1997 Aug 15;57(16):3402-6.

Dey S. Single nucleotide polymorphisms in human P-glycoprotein: its impact on drug delivery and disposition. *Expert Opin Drug Deliv*. 2006 Jan;3(1):23-35.

Ding X, Kaminsky LS. Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2003;43:149-73. Epub 2002 Jan 10.

Dodel R, Peter H, Spottke A, Noelker C, Althaus A, Siebert U, Walbert T, Kesper K, Becker HF, Mayer G. Health-related quality of life in patients with narcolepsy. *Sleep Med*. 2007 Nov;8(7-8):733-41.

Douglas NJ. The psychosocial aspects of narcolepsy. *Neurology*. 1998 Feb;50(2 Suppl 1):S27-30.

Droogleever Fortuyn HA, Lappenschaar MA, Furer JW, Hodiament PP, Rijnders CA, Renier WO, Buitelaar JK, Overeem S. Anxiety and mood disorders in narcolepsy: a case-control study. *Gen Hosp Psychiatry*. 2010 Jan-Feb;32(1):49-56.

Droogleever Fortuyn HA, Mulders PC, Renier WO, Buitelaar JK, Overeem S. Narcolepsy and psychiatry: an evolving association of increasing interest. *Sleep Med*. 2011 Aug;12(7):714-9.

Droogleever Fortuyn HA, Swinkels S, Buitelaar J, Renier WO, Furer JW, Rijnders CA, Hodiament PP, Overeem S. High prevalence of eating disorders in narcolepsy with cataplexy: a case-control study. *Sleep*. 2008 Mar;31(3):335-41.

Eckhardt K, Li S, Ammon S, Schänzle G, Mikus G, Eichelbaum M. Same incidence of adverse drug events after codeine administration irrespective of the genetically determined differences in morphine formation. *Pain*. 1998 May;76(1-2):27-33.

Eichelbaum M, Ingelman-Sundberg M, Evans WE. Pharmacogenomics and individualized drug therapy. *Annu Rev Med*. 2006;57:119-37.

Ereshefsky L, Dugan D. Review of the pharmacokinetics, pharmacogenetics, and drug interaction potential of antidepressants: focus on venlafaxine. *Depress Anxiety*. 2000;12 Suppl 1:30-44.

Ervik S, Abdelnoor M, Heier MS, Ramberg M, Strand G. Health-related quality of life in narcolepsy. *Acta Neurol Scand*. 2006 Sep;114(3):198-204.

Evans DA, Manley KA, Mckusick VA. Genetic control of isoniazid metabolism in man. *Br Med J*. 1960 Aug 13;2(5197):485-91.

Evans WE, McLeod HL. Pharmacogenomics--drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med*. 2003 Feb 6;348(6):538-49.

Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science*. 1999 Oct 15;286(5439):487-91.

Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science*. 1999 Oct 15;286(5439):487-91.

Excoffier L, Lischer HE. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour*. 2010 May;10(3):564-7.

Extraordinary association between HLA-DR2 and narcolepsy. *Lancet*. 1985 Jan 26;1(8422):226-7.

Fogelman SM, Schmider J, Venkatakrishnan K, von Moltke LL, Harmatz JS, Shader RI, Greenblatt DJ. O- and N-demethylation of venlafaxine in vitro by human liver microsomes and by microsomes from cDNA-transfected cells: effect of metabolic inhibitors and SSRI antidepressants. *Neuropsychopharmacology*. 1999 May;20(5):480-90.

Fonne-Pfister R, Meyer UA. Xenobiotic and endobiotic inhibitors of cytochrome P-450db1 function, the target of the debrisoquine/sparteine type polymorphism. *Biochem Pharmacol*. 1988 Oct 15;37(20):3829-35.

Frank D, Jaehde U, Fuhr U. Evaluation of probe drugs and pharmacokinetic metrics for CYP2D6 phenotyping. *Eur J Clin Pharmacol*. 2007 Apr;63(4):321-33.

Fromherz S, Mignot E. Narcolepsy research: past, present, and future perspectives. *Arch Ital Biol*. 2004 Jul;142(4):479-86.

Fujita PA, Rhead B, Zweig AS, Hinrichs AS, Karolchik D, Cline MS, Goldman M, Barber GP, Clawson H, Coelho A, Diekhans M, Dreszer TR, Gardine BM, Harte RA, Hillman-Jackson J, Hsu F, Kirkup V, Kuhn RM, Learned K, Li CH, Meyer LR, Pohl A, Raney BJ, Rosenbloom KR, Smith KE, Haussler D, Kent WJ. The UCSC Genome Browser database: update 2011. *Nucleic Acids Res*. 2011 Jan;39(Database issue):D876-82.

Fung KL, Gottesman MM. A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function. *Biochim Biophys Acta*. 2009 May;1794(5):860-71.

Furuta T, Ohashi K, Kamata T, Takashima M, Kosuge K, Kawasaki T, Hanai H, Kubota T, Ishizaki T, Kaneko E. Effect of genetic differences in omeprazole metabolism on cure rates for *Helicobacter pylori* infection and peptic ulcer. *Ann Intern Med*. 1998 Dec 15;129(12):1027-30.

Furuta T, Shirai N, Kodaira M, Sugimoto M, Nogaki A, Kuriyama S, Iwaizumi M, Yamade M, Terakawa I, Ohashi K, Ishizaki T, Hishida A. Pharmacogenomics-based tailored versus standard therapeutic regimen for eradication of *H. pylori*. *Clin Pharmacol Ther*. 2007 Apr;81(4):521-8.

Furuta T, Shirai N, Sugimoto M, Ohashi K, Ishizaki T. Pharmacogenomics of proton pump inhibitors. *Pharmacogenomics*. 2004 Mar;5(2):181-202.

Fux R, Mörike K, Pröhmer AM, Delabar U, Schwab M, Schaeffeler E, Lorenz G, Gleiter CH, Eichelbaum M, Kivistö KT. Impact of CYP2D6 genotype on adverse effects during treatment with metoprolol: a prospective clinical study. *Clin Pharmacol Ther*. 2005 Oct;78(4):378-87.

Gaedigk A, Blum M, Gaedigk R, Eichelbaum M, Meyer UA. Deletion of the entire cytochrome P450 CYP2D6 gene as a cause of impaired drug metabolism in poor metabolizers of the debrisoquine/sparteine polymorphism. *Am J Hum Genet*. 1991 May;48(5):943-50.

Gaedigk A, Ndjountché L, Divakaran K, Dianne Bradford L, Zineh I, Oberlander TF, Brousseau DC, McCarver DG, Johnson JA, Alander SW, Wayne Riggs K, Steven Leeder J. Cytochrome P4502D6 (CYP2D6) gene locus heterogeneity: characterization of gene duplication events. *Clin Pharmacol Ther*. 2007 Feb;81(2):242-51.

Gaedigk A, Simon SD, Pearce RE, Bradford LD, Kennedy MJ, Leeder JS. The CYP2D6 activity score: translating genotype information into a qualitative measure of phenotype. *Clin Pharmacol Ther*. 2008 Feb;83(2):234-42.

Gaedigk A, Twist GP, Leeder JS. CYP2D6, SULT1A1 and UGT2B17 copy number variation: quantitative detection by multiplex PCR. *Pharmacogenomics*. 2012 Jan;13(1):91-111.

Gahlinger PM. Club drugs: MDMA, gamma-hydroxybutyrate (GHB), Rohypnol, and ketamine. *Am Fam Physician*. 2004 Jun 1;69(11):2619-26.

Gasche Y, Daali Y, Fathi M, Chiappe A, Cottini S, Dayer P, Desmeules J. Codeine intoxication associated with ultrarapid CYP2D6 metabolism. *N Engl J Med*. 2004 Dec 30;351(27):2827-31. Erratum in: *N Engl J Med*. 2005 Feb 10;352(6):638.

Gelston EA, Coller JK, Lopatko OV, James HM, Schmidt H, White JM, Somogyi AA. Methadone inhibits CYP2D6 and UGT2B7/2B4 in vivo: a study using codeine in methadone- and buprenorphine-maintained subjects. *Br J Clin Pharmacol*. 2012 May;73(5):786-94.

Goetz MP, Knox SK, Suman VJ, Rae JM, Safgren SL, Ames MM, Visscher DW, Reynolds C, Couch FJ, Lingle WL, Weinshilboum RM, Fritcher EG, Nibbe AM, Desta Z, Nguyen A, Flockhart DA, Perez EA, Ingle JN. The impact of cytochrome

P450 2D6 metabolism in women receiving adjuvant tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat.* 2007 Jan;101(1):113-21.

Gonzalez FJ, Nebert DW. Evolution of the P450 gene superfamily: animal-plant 'warfare', molecular drive and human genetic differences in drug oxidation. *Trends Genet.* 1990 Jun;6(6):182-6.

González I, Peñas-Lledó EM, Pérez B, Dorado P, Alvarez M, LLerena A. Relation between CYP2D6 phenotype and genotype and personality in healthy volunteers. *Pharmacogenomics.* 2008 Jul;9(7):833-40.

Goswami M. The influence of clinical symptoms on quality of life in patients with narcolepsy. *Neurology.* 1998 Feb;50(2 Suppl 1):S31-6.

Griese EU, Zanger UM, Brudermanns U, Gaedigk A, Mikus G, Mörike K, Stüven T, Eichelbaum M. Assessment of the predictive power of genotypes for the in-vivo catalytic function of CYP2D6 in a German population. *Pharmacogenetics.* 1998 Feb;8(1):15-26.

Grossman I. ADME pharmacogenetics: current practices and future outlook. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2009 May;5(5):449-62.

Guilleminault C. Amphetamines and narcolepsy: use of the Stanford database. *Sleep.* 1993 Apr;16(3):199-201.

Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics.* 1992 Jun;48(2):361-72.

He SM, Zhou ZW, Li XT, Zhou SF. Clinical drugs undergoing polymorphic metabolism by human cytochrome P450 2C9 and the implication in drug development. *Curr Med Chem.* 2011;18(5):667-713.

Hendrychová T, Anzenbacherová E, Hudeček J, Skopalík J, Lange R, Hildebrandt P, Otyepka M, Anzenbacher P. Flexibility of human cytochrome P450 enzymes: molecular dynamics and spectroscopy reveal important function-related variations. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Jan;1814(1):58-68.

Henneberg R. Über genuine Narkolepsie. *Neurol Centralbl* 1916;35:282–90.

Hirono A, Beutler E. Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for human glucose-6-phosphate dehydrogenase variant A-. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1988 85:3951–3954.

Hishikawa Y, Shimizu T. Physiology of REM sleep, cataplexy, and sleep paralysis. *Adv Neurol.* 1995;67:245-71.

Hodges LM, Markova SM, Chinn LW, Gow JM, Kroetz DL, Klein TE, Altman RB. Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Pharmacogenet Genomics.* 2011 Mar;21(3):152-61.

Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmöller J, Johné A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U. Functional polymorphisms of

the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Mar 28;97(7):3473-8.

Holstein A, Plaschke A, Ptak M, Egberts EH, El-Din J, Brockmöller J, Kirchheiner J. Association between CYP2C9 slow metabolizer genotypes and severe hypoglycaemia on medication with sulphonylurea hypoglycaemic agents. *Br J Clin Pharmacol*. 2005 Jul;60(1):103-6.

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> (ultimo accesso, luglio 2012)

Hughes HB, Biehl JP, Jones AP, Schmidt LH. Metabolism of isoniazid in man as related to the occurrence of peripheral neuritis. *Am Rev Tuberc*. 1954 Aug;70(2):266-73.

Hulot JS, Bura A, Villard E, Azizi M, Remones V, Goyenvalle C, Aiach M, Lechat P, Gaussem P. Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism is a major determinant of clopidogrel responsiveness in healthy subjects. *Blood*. 2006 Oct 1;108(7):2244-7.

Hustert E, Haberl M, Burk O, Wolbold R, He YQ, Klein K, Nuessler AC, Neuhaus P, Klattig J, Eiselt R, Koch I, Zibat A, Brockmöller J, Halpert JR, Zanger UM, Wojnowski L. The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics*. 2001 Dec;11(9):773-9.

Ingelman-Sundberg M, Daly AK, Oscarson M, Nebert DW. Human cytochrome P450 (CYP) genes: recommendations for the nomenclature of alleles. *Pharmacogenetics*. 2000 Feb;10(1):91-3.

Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, McLellan RA. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharmacol Sci*. 1999 Aug;20(8):342-9.

Ingelman-Sundberg M, Oscarson M. Human CYP allele database: submission criteria procedures and objectives. *Methods Enzymol*. 2002;357:28-36.

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.

Ingelman-Sundberg M, Sim SC. Pharmacogenetic biomarkers as tools for improved drug therapy; emphasis on the cytochrome P450 system. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 May 21;396(1):90-4.

Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J*. 2005;5(1):6-13.

Ingravallo F, Gnucchi V, Pizza F, Vignatelli L, Govi A, Dormi A, Pelotti S, Cicognani A, Dauvilliers Y, Plazzi G. The burden of narcolepsy with cataplexy: how disease

history and clinical features influence socio-economic outcomes. *Sleep Med.* 2012 Dec;13(10):1293-300.

Irvin WJ Jr, Walko CM, Weck KE, Ibrahim JG, Chiu WK, Dees EC, Moore SG, Olajide OA, Graham ML, Canale ST, Raab RE, Corso SW, Peppercorn JM, Anderson SM, Friedman KJ, Ogburn ET, Desta Z, Flockhart DA, McLeod HL, Evans JP, Carey LA. Genotype-guided tamoxifen dosing increases active metabolite exposure in women with reduced CYP2D6 metabolism: a multicenter study. *J Clin Oncol.* 2011 Aug 20;29(24):3232-9.

Jennum P, Ibsen R, Petersen ER, Knudsen S, Kjellberg J. Health, social, and economic consequences of narcolepsy: a controlled national study evaluating the societal effect on patients and their partners. *Sleep Med.* 2012 Sep;13(8):1086-93.

Jennum P, Knudsen S, Kjellberg J. The economic consequences of narcolepsy. *J Clin Sleep Med.* 2009 Jun 15;5(3):240-5.

Johansson I, Ingelman-Sundberg M. CNVs of human genes and their implication in pharmacogenetics. *Cytogenet Genome Res.* 2008;123(1-4):195-204.

Johansson I, Lundqvist E, Bertilsson L, Dahl ML, Sjöqvist F, Ingelman-Sundberg M. Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Dec 15;90(24):11825-9.

Johnson MD, Zuo H, Lee KH, Trebley JP, Rae JM, Weatherman RV, Desta Z, Flockhart DA, Skaar TC. Pharmacological characterization of 4-hydroxy-N-desmethyl tamoxifen, a novel active metabolite of tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat.* 2004 May;85(2):151-9.

Jonas DE, McLeod HL. Genetic and clinical factors relating to warfarin dosing. *Trends Pharmacol Sci.* 2009 Jul;30(7):375-86.

Jornil J, Nielsen TS, Rosendal I, Ahlner J, Zackrisson AL, Boel LW, Brock B. A poor metabolizer of both CYP2C19 and CYP2D6 identified by mechanistic pharmacokinetic simulation in a fatal drug poisoning case involving venlafaxine. *Forensic Sci Int.* 2013 Jan 16

Juji T, Satake M, Honda Y, Doi Y. HLA antigens in Japanese patients with narcolepsy. All the patients were DR2 positive. *Tissue Antigens.* 1984 Nov;24(5):316-9.

Kalow W, Staron N. On distribution and inheritance of atypical forms of human serum cholinesterase, as indicated by dibucaine numbers. *Can J Biochem Physiol.* 1957 Dec;35(12):1305-20.

Kalow W. *Pharmacogenetics: heredity and the response to drugs*(W. B. Saunders & co., Philadelphia, USA, 1962).

Karlsson L, Schmitt U, Josefsson M, Carlsson B, Ahlner J, Bengtsson F, Kugelberg FC, Hiemke C. Blood-brain barrier penetration of the enantiomers of

venlafaxine and its metabolites in mice lacking P-glycoprotein. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2010 Sep;20(9):632-40.

Kawashima S, Kobayashi K, Takama K, Higuchi T, Furihata T, Hosokawa M, Chiba K. Involvement of hepatocyte nuclear factor 4alpha in the different expression level between CYP2C9 and CYP2C19 in the human liver. *Drug Metab Dispos.* 2006 Jun;34(6):1012-8.

Kazui M, Nishiya Y, Ishizuka T, Hagihara K, Farid NA, Okazaki O, Ikeda T, Kurihara A. Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite. *Drug Metab Dispos.* 2010 Jan;38(1):92-9.

Kerb R, Fux R, Mörike K, Kremsner PG, Gil JP, Gleiter CH, Schwab M. Pharmacogenetics of antimalarial drugs: effect on metabolism and transport. *Lancet Infect Dis.* 2009 Dec;9(12):760-74.

Keshava C, McCanlies EC, Weston A. CYP3A4 polymorphisms--potential risk factors for breast and prostate cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2004 Nov 1;160(9):825-41.

Kibbe WA. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res.* 2007 Jul;35(Web Server issue):W43-6.

Kilduff TS, Peyron C. The hypocretin/orexin ligand-receptor system: implications for sleep and sleep disorders. *Trends Neurosci.* 2000 Aug;23(8):359-65.

Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwarz UI, Taylor A, Xie HG, McKinsey J, Zhou S, Lan LB, Schuetz JD, Schuetz EG, Wilkinson GR. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther.* 2001 Aug;70(2):189-99.

Kimchi-Sarfaty C, Marple AH, Shinar S, Kimchi AM, Scavo D, Roma MI, Kim IW, Jones A, Arora M, Gribar J, Gurwitz D, Gottesman MM. Ethnicity-related polymorphisms and haplotypes in the human ABCB1 gene. *Pharmacogenomics.* 2007 a Jan;8(1):29-39.

Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, Gottesman MM. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science.* 2007 b Jan 26;315(5811):525-8. Erratum in: *Science.* 2011 Oct 7;334(6052):39. *Science.* 2007 Nov 30;318(5855):1382-3.

Kimura S, Umeno M, Skoda RC, Meyer UA, Gonzalez FJ. The human debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D) locus: sequence and identification of the polymorphic CYP2D6 gene, a related gene, and a pseudogene. *Am J Hum Genet.* 1989 Dec;45(6):889-904.

Kirchheiner J, Henckel HB, Franke L, Meineke I, Tzvetkov M, Uebelhack R, Roots I, Brockmüller J. Impact of the CYP2D6 ultra-rapid metabolizer genotype on doxepin pharmacokinetics and serotonin in platelets. *Pharmacogenet Genomics.* 2005 Aug;15(8):579-87.

- Kirchheiner J, Nickchen K, Bauer M, Wong ML, Licinio J, Roots I, Brockmüller J. Pharmacogenetics of antidepressants and antipsychotics: the contribution of allelic variations to the phenotype of drug response. *Mol Psychiatry*. 2004 May;9(5):442-73.
- Kirchheiner J, Seeringer A, Godoy AL, Ohmle B, Maier C, Beschoner P, Sim EJ, Viviani R. CYP2D6 in the brain: genotype effects on resting brain perfusion. *Mol Psychiatry*. 2011 Mar;16(3):237, 333-41.
- Kiyotani K, Mushiroda T, Imamura CK, Tanigawara Y, Hosono N, Kubo M, Sasa M, Nakamura Y, Zembutsu H. Dose-adjustment study of tamoxifen based on CYP2D6 genotypes in Japanese breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Jan;131(1):137-45.
- Klein K, Thomas M, Winter S, Nussler AK, Niemi M, Schwab M, Zanger UM. PPARA: a novel genetic determinant of CYP3A4 in vitro and in vivo. *Clin Pharmacol Ther*. 2012 Jun;91(6):1044-52.
- Klingenberg M. Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys*. 2003 Jan 1;409(1):2-6.
- Klotz U. Antiarrhythmics: elimination and dosage considerations in hepatic impairment. *Clin Pharmacokinet*. 2007;46(12):985-96.
- Klotz U. Clinical impact of CYP2C19 polymorphism on the action of proton pump inhibitors: a review of a special problem. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2006 Jul;44(7):297-302.
- Koren G, Cairns J, Chitayat D, Gaedigk A, Leeder SJ. Pharmacogenetics of morphine poisoning in a breastfed neonate of a codeine-prescribed mother. *Lancet*. 2006 Aug 19;368(9536):704.
- Kosaki K, Tamura K, Sato R, Samejima H, Tanigawara Y, Takahashi T. A major influence of CYP2C19 genotype on the steady-state concentration of N-desmethyloclobazam. *Brain Dev*. 2004 Dec;26(8):530-4.
- Kotagal S, Krahn LE, Slocumb N. A putative link between childhood narcolepsy and obesity. *Sleep Med*. 2004 Mar;5(2):147-50.
- Koukouritaki SB, Manro JR, Marsh SA, Stevens JC, Rettie AE, McCarver DG, Hines RN. Developmental expression of human hepatic CYP2C9 and CYP2C19. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004 Mar;308(3):965-74.
- Kroetz DL, Pauli-Magnus C, Hodges LM, Huang CC, Kawamoto M, Johns SJ, Stryke D, Ferrin TE, DeYoung J, Taylor T, Carlson EJ, Herskowitz I, Giacomini KM, Clark AG; Pharmacogenetics of Membrane Transporters Investigators. Sequence diversity and haplotype structure in the human ABCB1 (MDR1, multidrug resistance transporter) gene. *Pharmacogenetics*. 2003 Aug;13(8):481-94. Erratum in: *Pharmacogenetics*. 2003 Nov;13(11):701.
- Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, Watkins PB, Daly A, Wrighton SA, Hall SD, Maurel P, Relling M, Brimer C, Yasuda K, Venkataramanan

R, Strom S, Thummel K, Boguski MS, Schuetz E. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet.* 2001 Apr;27(4):383-91.

Küpfer A, Preisig R. Pharmacogenetics of mephenytoin: a new drug hydroxylation polymorphism in man. *Eur J Clin Pharmacol.* 1984;26(6):753-9.

Kuwata S, Tokunaga K, Jin F et al. (1991). Letter to the editor after Dr Aldrich's review on narcolepsy. *N Engl J Med* 324: 270–272.

Langdon N, Welsh KI, van Dam M, Vaughan RW, Parkes D. Genetic markers in narcolepsy. *Lancet.* 1984 Nov 24;2(8413):1178-80.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 2007 Nov 1;23(21):2947-8.

Lee CR, Goldstein JA, Pieper JA. Cytochrome P450 2C9 polymorphisms: a comprehensive review of the in-vitro and human data. *Pharmacogenetics.* 2002 Apr;12(3):251-63.

Leeder JS, Gaedigk R, Marcucci KA, Gaedigk A, Vyhldal CA, Schindel BP, Pearce RE. Variability of CYP3A7 expression in human fetal liver. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005 Aug;314(2):626-35.

Lehmann H, Ryan E. The familial incidence of low pseudocholinesterase level. *Lancet.* 1956 Jul 21;271(6934):124.

Leibowitz SM, Brooks SN, Black JE. Excessive daytime sleepiness: considerations for the psychiatrist. *Psychiatr Clin North Am.* 2006 Dec;29(4):921-45; abstract viii.

Leppert W. CYP2D6 in the metabolism of opioids for mild to moderate pain. *Pharmacology.* 2011;87(5-6):274-85.

Leschziner GD, Andrew T, Pirmohamed M, Johnson MR. ABCB1 genotype and PGP expression, function and therapeutic drug response: a critical review and recommendations for future research. *Pharmacogenomics J.* 2007 Jun;7(3):154-79.

Lewis DF, Lake BG, Dickins M. Substrates of human cytochromes P450 from families CYP1 and CYP2: analysis of enzyme selectivity and metabolism. *Drug Metabol Drug Interact.* 2004;20(3):111-42.

Lin L, Faraco J, Li R, Kadotani H, Rogers W, Lin X, Qiu X, de Jong PJ, Nishino S, Mignot E. The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell.* 1999 Aug 6;98(3):365-76.

Lindh JD, Annas A, Meurling L, Dahl ML, AL-Shurbaji A. Effect of ketoconazole on venlafaxine plasma concentrations in extensive and poor metabolisers of debrisoquine. *Eur J Clin Pharmacol.* 2003 Sep;59(5-6):401-6.

Littner MR, Kushida C, Wise M, Davila DG, Morgenthaler T, Lee-Chiong T, Hirshkowitz M, Daniel LL, Bailey D, Berry RB, Kapen S, Kramer M; Standards of Practice Committee of the American Academy of Sleep Medicine. Practice parameters for clinical use of the multiple sleep latency test and the maintenance of wakefulness test. *Sleep*. 2005 Jan;28(1):113-21.

Longstreth WT Jr, Koepsell TD, Ton TG, Hendrickson AF, van Belle G. The epidemiology of narcolepsy. *Sleep*. 2007 Jan;30(1):13-26.

Løvlie R, Daly AK, Molven A, Idle JR, Steen VM. Ultrarapid metabolizers of debrisoquine: characterization and PCR-based detection of alleles with duplication of the CYP2D6 gene. *FEBS Lett*. 1996 Aug 19;392(1):30-4.

Lu Y, Won KA, Nelson BJ, Qi D, Rausch DJ, Asinger RW. Characteristics of the amiodarone-warfarin interaction during long-term follow-up. *Am J Health Syst Pharm*. 2008 May 15;65(10):947-52.

Madadi P, Avard D, Koren G. Pharmacogenetics of opioids for the treatment of acute maternal pain during pregnancy and lactation. *Curr Drug Metab*. 2012 Jul;13(6):721-7.

Madadi P, Ross CJ, Hayden MR, Carleton BC, Gaedigk A, Leeder JS, Koren G. Pharmacogenetics of neonatal opioid toxicity following maternal use of codeine during breastfeeding: a case-control study. *Clin Pharmacol Ther*. 2009 Jan;85(1):31-5.

Madlensky L, Natarajan L, Tchu S, Pu M, Mortimer J, Flatt SW, Nikoloff DM, Hillman G, Fontecha MR, Lawrence HJ, Parker BA, Wu AH, Pierce JP. Tamoxifen metabolite concentrations, CYP2D6 genotype, and breast cancer outcomes. *Clin Pharmacol Ther*. 2011 May;89(5):718-25.

Mancinelli L, Cronin M, Sadée W. Pharmacogenomics: the promise of personalized medicine. *AAPS PharmSci*. 2000;2(1):E4.

Marshall A. Genset-Abbott deal heralds pharmacogenomics era. *Nat. Biotechnol*. 1997 15, 829–830.

Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther*. 2004 Jan;75(1):13-33.

Mayer G, Kesper K, Ploch T, Peter H, Peter J. The implications of gender and age at onset of first symptoms in narcoleptic patients in Germany—results from retrospective evaluation of hospital records. *Somnologie* 2002;6:13–8.

McAlpine DE, Biernacka JM, Mrazek DA, O'Kane DJ, Stevens SR, Langman LJ, Courson VL, Bhagia J, Moyer TP. Effect of cytochrome P450 enzyme polymorphisms on pharmacokinetics of venlafaxine. *Ther Drug Monit*. 2011 Feb;33(1):14-20.

Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Hockett RD, Brandt JT, Walker JR, Antman EM, Macias W, Braunwald E, Sabatine MS. Cytochrome p-450

polymorphisms and response to clopidogrel. *N Engl J Med.* 2009 Jan 22;360(4):354-62.

Mette L, Mitropoulos K, Vozikis A, Patrinos GP. Pharmacogenomics and public health: implementing 'populationalized' medicine. *Pharmacogenomics.* 2012 May;13(7):803-13.

Mignot E, Hayduk R, Black J, Grumet FC, Guilleminault C. HLA DQB1\*0602 is associated with cataplexy in 509 narcoleptic patients. *Sleep.* 1997 Nov;20(11):1012-20.

Mignot E, Lammers GJ, Ripley B, Okun M, Nevsimalova S, Overeem S, Vankova J, Black J, Harsh J, Bassetti C, Schrader H, Nishino S. The role of cerebrospinal fluid hypocretin measurement in the diagnosis of narcolepsy and other hypersomnias. *Arch Neurol.* 2002 Oct;59(10):1553-62.

Mignot E, Lin L, Finn L, Lopes C, Pluff K, Sundstrom ML, Young T. Correlates of sleep-onset REM periods during the Multiple Sleep Latency Test in community adults. *Brain.* 2006 Jun;129(Pt 6):1609-23.

Mignot E, Lin L, Rogers W, Honda Y, Qiu X, Lin X, Okun M, Hohjoh H, Miki T, Hsu S, Leffell M, Grumet Fernandez-Vina M, Honda M, Risch N. Complex HLA-DR and -DQ interactions confer risk of narcolepsy-cataplexy in three ethnic groups. *Am J Hum Genet.* 2001 Mar;68(3):686-99.

Mignot E, Nishino S. Emerging therapies in narcolepsy-cataplexy. *Sleep.* 2005 Jun;28(6):754-63.

Mignot E, Wang C, Rattazzi C, Gaiser C, Lovett M, Guilleminault C, Dement WC, Grumet FC. Genetic linkage of autosomal recessive canine narcolepsy with a mu immunoglobulin heavy-chain switch-like segment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Apr 15;88(8):3475-8.

Mignot E. Genetic and familial aspects of narcolepsy. *Neurology.* 1998 Feb;50(2 Suppl 1):S16-22.

Mignot EJ. A practical guide to the therapy of narcolepsy and hypersomnia syndromes. *Neurotherapeutics.* 2012 Oct;9(4):739-52.

Mikus G, Scholz IM, Weiss J. Pharmacogenomics of the triazole antifungal agent voriconazole. *Pharmacogenomics.* 2011 Jun;12(6):861-72.

Miller MP. R by C: a program that performs Fishers exact test on any sized contingency table through the use of the Metropolis algorithm. 1997 Available at [www.marksgeneticsoftware.net](http://www.marksgeneticsoftware.net).

Mitchell RS, Bell JC. Clinical implications of isoniazid, PAS and streptomycin blood levels in pulmonary tuberculosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 1957-1958;69:98-102; discussion 103-5.

Møller LR, Østergaard JR. Treatment with venlafaxine in six cases of children with narcolepsy and with cataplexy and hypnagogic hallucinations. *J Child Adolesc Psychopharmacol*. 2009 Apr;19(2):197-201.

Mörrike K, Kivistö KT, Schaeffeler E, Jägle C, Igel S, Drescher S, Fux R, Marx C, Hofmann U, Engel C, Wagner F, Delabar U, Meisner C, Bail D, Böhm JO, Gleiter CH, Ziemer G, Rein JG, Hellberg KD, Eichelbaum M, Schwab M. Propafenone for the prevention of atrial tachyarrhythmias after cardiac surgery: a randomized, double-blind placebo-controlled trial. *Clin Pharmacol Ther*. 2008 Jul;84(1):104-10.

Morrish E, King MA, Smith IE, Shneerson JM. Factors associated with a delay in the diagnosis of narcolepsy. *Sleep Med*. 2004 Jan;5(1):37-41.

Motulsky AG. Drug reactions enzymes, and biochemical genetics. *J. Am. Med. Assoc*. 1957 165, 835–837.

Mürdter TE, Schroth W, Bacchus-Gerybadze L, Winter S, Heinkele G, Simon W, Fasching PA, Fehm T; German Tamoxifen and AI Clinicians Group, Eichelbaum M, Schwab M, Brauch H. Activity levels of tamoxifen metabolites at the estrogen receptor and the impact of genetic polymorphisms of phase I and II enzymes on their concentration levels in plasma. *Clin Pharmacol Ther*. 2011 May;89(5):708-17. Erratum in: *Clin Pharmacol Ther*. 2012 Jun;91(6):1087.

Myrick H, Malcolm R, Taylor B, LaRowe S. Modafinil: preclinical, clinical, and post-marketing surveillance--a review of abuse liability issues. *Ann Clin Psychiatry*. 2004 Apr-Jun;16(2):101-9.

Nakamura Y, Ratain MJ, Cox NJ, McLeod HL, Kroetz DL, Flockhart DA. Re: CYP2D6 genotype and tamoxifen response in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: the Breast International Group 1-98 trial. *J Natl Cancer Inst*. 2012 Aug 22;104(16):1264; author reply 1266-8.

Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O, et al. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol*. 1993 Jan-Feb;12(1):1-51.

Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*. 1996 Feb;6(1):1-42.

Nevsimalova S, Buskova J, Kemlink D, Sonka K, Skibova J. Does age at the onset of narcolepsy influence the course and severity of the disease? *Sleep Med*. 2009 Oct;10(9):967-72.

Newman WG. Pharmacogenetics: transforming clinical medicine. *J R Coll Physicians Edinb*. 2012;42(3):244-7.

Nishino S, Mignot E. Narcolepsy and cataplexy. *Handb Clin Neurol*. 2011;99:783-814.

- Ohayon MM, Ferini-Strambi L, Plazzi G, Smirne S, Castronovo V. How age influences the expression of narcolepsy. *J Psychosom Res.* 2005 Dec;59(6):399-405.
- Okun ML, Lin L, Pelin Z, Hong S, Mignot E. Clinical aspects of narcolepsy-cataplexy across ethnic groups. *Sleep.* 2002 Feb 1;25(1):27-35.
- Overeem S, Mignot E, van Dijk JG, Lammers GJ. Narcolepsy: clinical features, new pathophysiologic insights, and future perspectives. *J Clin Neurophysiol.* 2001 Mar;18(2):78-105.
- Owen RP, Sangkuhl K, Klein TE, Altman RB. Cytochrome P450 2D6. *Pharmacogenet Genomics.* 2009 Jul;19(7):559-62.
- Palaia V, Poli F, Pizza F, Antelmi E, Franceschini C, Moghadam KK, Provini F, Pagotto U, Montagna P, Schenck CH, Mignot E, Plazzi G. Narcolepsy with cataplexy associated with nocturnal compulsive behaviors: a case-control study. *Sleep.* 2011 Oct 1;34(10):1365-71.
- Patsopoulos NA, Ntzani EE, Zintzaras E, Ioannidis JP. CYP2D6 polymorphisms and the risk of tardive dyskinesia in schizophrenia: a meta-analysis. *Pharmacogenet Genomics.* 2005 Mar;15(3):151-8.
- Peacock J, Benca RM. Narcolepsy: clinical features, co-morbidities & treatment. *Indian J Med Res.* 2010 Feb;131:338-49.
- Pelin Z, Guilleminault C, Risch N, Grumet FC, Mignot E. HLA-DQB1\*0602 homozygosity increases relative risk for narcolepsy but not disease severity in two ethnic groups. US Modafinil in Narcolepsy Multicenter Study Group. *Tissue Antigens.* 1998 Jan;51(1):96-100.
- Peñas-Lledó EM, Dorado P, Agüera Z, Gratacós M, Estivill X, Fernández-Aranda F, Llerena A. CYP2D6 polymorphism in patients with eating disorders. *Pharmacogenomics J.* 2012 Apr;12(2):173-5.
- Peñas-Lledó EM, Dorado P, Pacheco R, González I, Llerena A. Relation between CYP2D6 genotype, personality, neurocognition and overall psychopathology in healthy volunteers. *Pharmacogenomics.* 2009 Jul;10(7):1111-20.
- Perera MA. The missing linkage: what pharmacogenetic associations are left to find in CYP3A? *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2010 Jan;6(1):17-28.
- Peterson PC, Husain AM. Pediatric narcolepsy. *Brain Dev.* 2008 Nov;30(10):609-23.
- Peyron C, Faraco J, Rogers W, Ripley B, Overeem S, Charnay Y, Nevsimalova S, Aldrich M, Reynolds D, Albin R, Li R, Hungs M, Pedrazzoli M, Padigaru M, Kucherlapati M, Fan J, Maki R, Lammers GJ, Bouras C, Kucherlapati R, Nishino S, Mignot E. A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat Med.* 2000 Sep;6(9):991-7.

Pharoah PD, Abraham J, Caldas C. Re: CYP2D6 genotype and tamoxifen response in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: the Breast International Group 1-98 trial and Re: CYP2D6 and UGT2B7 genotype and risk of recurrence in tamoxifen-treated breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst.* 2012 Aug 22;104(16):1263-4; author reply 1266-8.

Poirier G, Montplaisir J, Décary F, Momège D, Lebrun A. HLA antigens in narcolepsy and idiopathic central nervous system hypersomnolence. *Sleep.* 1986;9(1 Pt 2):153-8.

Poli F, Overeem S, Lammers GJ, Plazzi G, Lecendreux M, Bassetti CL, Dauvilliers Y, Keene D, Khatami R, Li Y, Mayer G, Nohynek H, Pahud B, Paiva T, Partinen M, Scammell TE, Shimabukuro T, Sturkenboom M, van Dinter K, Wiznitzer M, Bonhoeffer J. Narcolepsy as an adverse event following immunization: Case definition and guidelines for data collection, analysis and presentation. *Vaccine.* 2013 Jan 30;31(6):994-1007.

Rae JM, Drury S, Hayes DF, Stearns V, Thibert JN, Haynes BP, Salter J, Sestak I, Cuzick J, Dowsett M; ATAC trialists. CYP2D6 and UGT2B7 genotype and risk of recurrence in tamoxifen-treated breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst.* 2012 Mar 21;104(6):452-60.

Rau T, Wuttke H, Michels LM, Werner U, Bergmann K, Kreft M, Fromm MF, Eschenhagen T. Impact of the CYP2D6 genotype on the clinical effects of metoprolol: a prospective longitudinal study. *Clin Pharmacol Ther.* 2009 Mar;85(3):269-72.

Rebeck TR, Jaffe JM, Walker AH, Wein AJ, Malkowicz SB. Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst.* 1998 Aug 19;90(16):1225-9. Erratum in: *J Natl Cancer Inst* 1999 Jun 16;91(12):1082.

Regan MM, Leyland-Jones B, Bouzyk M, Pagani O, Tang W, Kammler R, Dell'orto P, Biasi MO, Thürlimann B, Lyng MB, Ditzel HJ, Neven P, Debled M, Maibach R, Price KN, Gelber RD, Coates AS, Goldhirsch A, Rae JM, Viale G; Breast International Group (BIG) 1-98 Collaborative Group. CYP2D6 genotype and tamoxifen response in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: the breast international group 1-98 trial. *J Natl Cancer Inst.* 2012 Mar 21;104(6):441-51.

Rettie AE, Jones JP. Clinical and toxicological relevance of CYP2C9: drug-drug interactions and pharmacogenetics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005;45:477-94.

Riccardi LN, Lanzilotto R, Luiselli D, Ceccardi S, Falconi M, Bini C, Pelotti S. CYP2D6 genotyping in natives and immigrants from the Emilia-Romagna Region (Italy). *Genet Test Mol Biomarkers.* 2011 Nov;15(11):801-6.

Riemann D. Insomnia and comorbid psychiatric disorders. *Sleep Med.* 2007 Dec;8 Suppl 4:S15-20.

- Ripley B, Fujiki N, Okura M, Mignot E, Nishino S. Hypocretin levels in sporadic and familial cases of canine narcolepsy. *Neurobiol Dis.* 2001 Jun;8(3):525-34.
- Robertson P Jr, Hellriegel ET. Clinical pharmacokinetic profile of modafinil. *Clin Pharmacokinet.* 2003;42(2):123-37.
- Robertson P, DeCory HH, Madan A, Parkinson A. In vitro inhibition and induction of human hepatic cytochrome P450 enzymes by modafinil. *Drug Metab Dispos.* 2000 Jun;28(6):664-71.
- Rodriguez-Antona C, Gomez A, Karlgren M, Sim SC, Ingelman-Sundberg M. Molecular genetics and epigenetics of the cytochrome P450 gene family and its relevance for cancer risk and treatment. *Hum Genet.* 2010 Jan;127(1):1-17.
- Rodríguez-Antona C, Sayi JG, Gustafsson LL, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M. Phenotype-genotype variability in the human CYP3A locus as assessed by the probe drug quinine and analyses of variant CYP3A4 alleles. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Dec 9;338(1):299-305.
- Rousset F, Raymond M. Testing heterozygote excess and deficiency. *Genetics.* 1995 Aug;140(4):1413-9.
- Roy JN, Lajoie J, Zijenah LS, Barama A, Poirier C, Ward BJ, Roger M. CYP3A5 genetic polymorphisms in different ethnic populations. *Drug Metab Dispos.* 2005 Jul;33(7):884-7.
- Sachse C, Brockmöller J, Bauer S, Roots I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet.* 1997 Feb;60(2):284-95.
- Sadee W, Wang D, Papp AC, Pinsonneault JK, Smith RM, Moyer RA, Johnson AD. Pharmacogenomics of the RNA world: structural RNA polymorphisms in drug therapy. *Clin Pharmacol Ther.* 2011 Mar;89(3):355-65.
- Saito S, Iida A, Sekine A, Miura Y, Ogawa C, Kawauchi S, Higuchi S, Nakamura Y. Three hundred twenty-six genetic variations in genes encoding nine members of ATP-binding cassette, subfamily B (ABCB/MDR/TAP), in the Japanese population. *J Hum Genet.* 2002;47(1):38-50.
- Sakaeda T, Nakamura T, Okumura K. Pharmacogenetics of MDR1 and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs. *Pharmacogenomics.* 2003 Jul;4(4):397-410.
- Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell.* 1998 Mar 6;92(5):1 page following 696.
- Sakuyama K, Sasaki T, Ujiie S, Obata K, Mizugaki M, Ishikawa M, Hiratsuka M. Functional characterization of 17 CYP2D6 allelic variants (CYP2D6.2, 10, 14A-B,

18, 27, 36, 39, 47-51, 53-55, and 57). *Drug Metab Dispos.* 2008 Dec;36(12):2460-7.

Scammell TE, Estabrooke IV, McCarthy MT, Chemelli RM, Yanagisawa M, Miller MS, Saper CB. Hypothalamic arousal regions are activated during modafinil-induced wakefulness. *J Neurosci.* 2000 Nov 15;20(22):8620-8.

Scammell TE. The neurobiology, diagnosis, and treatment of narcolepsy. *Ann Neurol.* 2003 Feb;53(2):154-66.

Schaeffeler E, Schwab M, Eichelbaum M, Zanger UM. CYP2D6 genotyping strategy based on gene copy number determination by TaqMan real-time PCR. *Hum Mutat.* 2003 Dec;22(6):476-85.

Scharf MB, Lai AA, Branigan B, Stover R, Berkowitz DB. Pharmacokinetics of gammahydroxybutyrate (GHB) in narcoleptic patients. *Sleep.* 1998 Aug 1;21(5):507-14.

Schroth W, Antoniadou L, Fritz P, Schwab M, Muerdter T, Zanger UM, Simon W, Eichelbaum M, Brauch H. Breast cancer treatment outcome with adjuvant tamoxifen relative to patient CYP2D6 and CYP2C19 genotypes. *J Clin Oncol.* 2007 Nov 20;25(33):5187-93.

Schroth W, Goetz MP, Hamann U, Fasching PA, Schmidt M, Winter S, Fritz P, Simon W, Suman VJ, Ames MM, Safgren SL, Kuffel MJ, Ulmer HU, Boländer J, Strick R, Beckmann MW, Koelbl H, Weinshilboum RM, Ingle JN, Eichelbaum M, Schwab M, Brauch H. Association between CYP2D6 polymorphisms and outcomes among women with early stage breast cancer treated with tamoxifen. *JAMA.* 2009 Oct 7;302(13):1429-36.

Schuler MA. The role of cytochrome P450 monooxygenases in plant-insect interactions. *Plant Physiol.* 1996 Dec;112(4):1411-9.

Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF. Genetic polymorphisms of the human MDR1 drug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2003;43:285-307.

Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF. Genetic polymorphisms of the human MDR1 drug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2003;43:285-307.

Schwab M, Klotz U, Hofmann U, Schaeffeler E, Leodolter A, Malferteiner P, Treiber G. Esomeprazole-induced healing of gastroesophageal reflux disease is unrelated to the genotype of CYP2C19: evidence from clinical and pharmacokinetic data. *Clin Pharmacol Ther.* 2005 Dec;78(6):627-34.

Schwab M, Schaeffeler E, Klotz U, Treiber G. CYP2C19 polymorphism is a major predictor of treatment failure in white patients by use of lansoprazole-based quadruple therapy for eradication of *Helicobacter pylori*. *Clin Pharmacol Ther.* 2004 Sep;76(3):201-9.

Schwab M, Schaeffeler E. Warfarin pharmacogenetics meets clinical use. *Blood.* 2011 Sep 15;118(11):2938-9.

Scordo MG, Dahl ML, Spina E, Cordici F, Arena MG. No association between CYP2D6 polymorphism and Alzheimer's disease in an Italian population. *Pharmacol Res.* 2006 Feb;53(2):162-5.

Scott SA, Jaremko M, Lubitz SA, Kornreich R, Halperin JL, Desnick RJ. CYP2C9\*8 is prevalent among African-Americans: implications for pharmacogenetic dosing. *Pharmacogenomics.* 2009 Aug;10(8):1243-55.

Siegle I, Fritz P, Eckhardt K, Zanger UM, Eichelbaum M. Cellular localization and regional distribution of CYP2D6 mRNA and protein expression in human brain. *Pharmacogenetics.* 2001 Apr;11(3):237-45.

Silber MH, Krahn LE, Olson EJ, Pankratz VS. The epidemiology of narcolepsy in Olmsted County, Minnesota: a population-based study. *Sleep.* 2002 Mar 15;25(2):197-202.

Sim SC, Risinger C, Dahl ML, Aklillu E, Christensen M, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M. A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants. *Clin Pharmacol Ther.* 2006 Jan;79(1):103-13.

Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, Quteineh L, Drouet E, Méneveau N, Steg PG, Ferrières J, Danchin N, Becquemont L; French Registry of Acute ST-Elevation and Non-ST-Elevation Myocardial Infarction (FAST-MI) Investigators. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2009 Jan 22;360(4):363-75.

Singh M, Drake CL, Roth T. The prevalence of multiple sleep-onset REM periods in a population-based sample. *Sleep.* 2006 Jul;29(7):890-5.

Sistonen J, Fuselli S, Levo A, Sajantila A. CYP2D6 genotyping by a multiplex primer extension reaction. *Clin Chem.* 2005 Jul;51(7):1291-5.

Sistonen J, Fuselli S, Palo JU, Chauhan N, Padh H, Sajantila A. Pharmacogenetic variation at CYP2C9, CYP2C19, and CYP2D6 at global and microgeographic scales. *Pharmacogenet Genomics.* 2009 Feb;19(2):170-9.

Sistonen J, Sajantila A, Lao O, Corander J, Barbujani G, Fuselli S. CYP2D6 worldwide genetic variation shows high frequency of altered activity variants and no continental structure. *Pharmacogenet Genomics.* 2007 Feb;17(2):93-101.

Snyder L H. Studies in human inheritance IX. The inheritance of taste deficiency in man. *Ohio J Sci* 1932; 32:436–468.

Sofi F, Giusti B, Marcucci R, Gori AM, Abbate R, Gensini GF. Cytochrome P450 2C19\*2 polymorphism and cardiovascular recurrences in patients taking clopidogrel: a meta-analysis. *Pharmacogenomics J.* 2011 Jun;11(3):199-206.

Staatz CE, Goodman LK, Tett SE. Effect of CYP3A and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors: Part I. *Clin Pharmacokinet.* 2010 Mar;49(3):141-75.

Staatz CE, Goodman LK, Tett SE. Effect of CYP3A and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors: Part II. *Clin Pharmacokinet*. 2010 Apr;49(4):207-21.

Stamer UM, Zhang L, Stüber F. Personalized therapy in pain management: where do we stand? *Pharmacogenomics*. 2010 Jun;11(6):843-64.

Stanton V Jr. Re: CYP2D6 genotype and tamoxifen response in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: the Breast International Group 1-98 trial. *J Natl Cancer Inst*. 2012 Aug 22;104(16):1265-6; author reply 1266-8.

Steen VM, Andreassen OA, Daly AK, Tefre T, Børresen AL, Idle JR, Gulbrandsen AK. Detection of the poor metabolizer-associated CYP2D6(D) gene deletion allele by long-PCR technology. *Pharmacogenetics*. 1995 Aug;5(4):215-23.

Steimer W, Zöpf K, von Amelunxen S, Pfeiffer H, Bachofer J, Popp J, Messner B, Kissling W, Leucht S. Amitriptyline or not, that is the question: pharmacogenetic testing of CYP2D6 and CYP2C19 identifies patients with low or high risk for side effects in amitriptyline therapy. *Clin Chem*. 2005 Feb;51(2):376-85.

Stephens M, Donnelly P. A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet*. 2003 Nov;73(5):1162-9.

Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet*. 2001 Apr;68(4):978-89.

Stingl JC, Brockmüller J, Viviani R. Genetic variability of drug-metabolizing enzymes: the dual impact on psychiatric therapy and regulation of brain function. *Mol Psychiatry*. 2012 May 8.

Sturzenegger C, Bassetti CL. The clinical spectrum of narcolepsy with cataplexy: a reappraisal. *J Sleep Res*. 2004 Dec;13(4):395-406.

Tai ES, Demissie S, Cupples LA, Corella D, Wilson PW, Schaefer EJ, Ordovas JM. Association between the PPARA L162V polymorphism and plasma lipid levels: the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002 May 1;22(5):805-10.

Tang K, Ngoi SM, Gwee PC, Chua JM, Lee EJ, Chong SS, Lee CG. Distinct haplotype profiles and strong linkage disequilibrium at the MDR1 multidrug transporter gene locus in three ethnic Asian populations. *Pharmacogenetics*. 2002 Aug;12(6):437-50.

Thannickal TC, Moore RY, Nienhuis R, Ramanathan L, Gulyani S, Aldrich M, Cornford M, Siegel JM. Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron*. 2000 Sep;27(3):469-74.

Thorpy M. Therapeutic advances in narcolepsy. *Sleep Med*. 2007 Jun;8(4):427-40. Epub 2007 May 1.

Thorpy MJ. Cataplexy associated with narcolepsy: epidemiology, pathophysiology and management. *CNS Drugs*. 2006;20(1):43-50.

Toscano C, Klein K, Blievernicht J, Schaeffeler E, Saussele T, Raimundo S, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM. Impaired expression of CYP2D6 in intermediate metabolizers carrying the \*41 allele caused by the intronic SNP 2988G>A: evidence for modulation of splicing events. *Pharmacogenet Genomics*. 2006 Oct;16(10):755-66.

Twyman RM. SNP discovery and typing technologies for pharmacogenomics. *Curr Top Med Chem*. 2004;4(13):1423-31.

Tzvetkov M, von Ahsen N. Pharmacogenetic screening for drug therapy: from single gene markers to decision making in the next generation sequencing era. *Pathology*. 2012 Feb;44(2):166-80.

Uhr M, Grauer MT, Holsboer F. Differential enhancement of antidepressant penetration into the brain in mice with *abcb1ab* (*mdr1ab*) P-glycoprotein gene disruption. *Biol Psychiatry*. 2003 Oct 15;54(8):840-6.

Vallone PM, Butler JM. AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. *Biotechniques*. 2004 Aug;37(2):226-31.

van Noorden MS, van Dongen LC, Zitman FG, Vergouwen TA. Gamma-hydroxybutyrate withdrawal syndrome: dangerous but not well-known. *Gen Hosp Psychiatry*. 2009 Jul-Aug;31(4):394-6.

van Schaik RH, de Wildt SN, van Iperen NM, Uitterlinden AG, van den Anker JN, Lindemans J. CYP3A4-V polymorphism detection by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis and its allelic frequency among 199 Dutch Caucasians. *Clin Chem*. 2000 Nov;46(11):1834-6.

van Schaik RH, van der Heiden IP, van den Anker JN, Lindemans J. CYP3A5 variant allele frequencies in Dutch Caucasians. *Clin Chem*. 2002 Oct;48(10):1668-71.

Vesell ES. Twin studies in pharmacogenetics. *Hum Genet Suppl*. 1978;(1):19-30.

Vogel F. Moderne problem der humangenetik. *Ergeb Inn Med U Kinderheilk*. 1959 12:52-125.

Weiss J, Dormann SM, Martin-Facklam M, Kerpen CJ, Ketabi-Kiyanvash N, Haefeli WE. Inhibition of P-glycoprotein by newer antidepressants. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 Apr;305(1):197-204.

Wennerholm A, Dandara C, Sayi J, Svensson JO, Abdi YA, Ingelman-Sundberg M, Bertilsson L, Hasler J, Gustafsson LL. The African-specific CYP2D617 allele encodes an enzyme with changed substrate specificity. *Clin Pharmacol Ther*. 2002 Jan;71(1):77-88.

Williams JA, Ring BJ, Cantrell VE, Jones DR, Eckstein J, Ruterbories K, Hamman MA, Hall SD, Wrighton SA. Comparative metabolic capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7. *Drug Metab Dispos*. 2002 Aug;30(8):883-91.

Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Yanagisawa M. To eat or to sleep? Orexin in the regulation of feeding and wakefulness. *Annu Rev Neurosci*. 2001;24:429-58.

Wise MS, Arand DL, Auger RR, Brooks SN, Watson NF; American Academy of Sleep Medicine. Treatment of narcolepsy and other hypersomnias of central origin. *Sleep*. 2007 Dec;30(12):1712-27.

Wu AH. Drug metabolizing enzyme activities versus genetic variances for drug of clinical pharmacogenomic relevance. *Clin Proteomics*. 2011 Jul 28;8(1):12.

Wu H, Kang H, Liu Y, Tong W, Liu D, Yang X, Lian M, Yao W, Zhao H, Huang D, Sha X, Wang E, Wei M. Roles of ABCB1 gene polymorphisms and haplotype in susceptibility to breast carcinoma risk and clinical outcomes. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012 Sep;138(9):1449-62

Xu H, Murray M, McLachlan AJ. Influence of genetic polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmaco-dynamics of sulfonylurea drugs. *Curr Drug Metab*. 2009 Jul;10(6):643-58.

Xu P, Jiang ZP, Zhang BK, Tu JY, Li HD. Impact of MDR1 haplotypes derived from C1236T, G2677T/A and C3435T on the pharmacokinetics of single-dose oral digoxin in healthy Chinese volunteers. *Pharmacology*. 2008;82(3):221-7.

Yamauchi A, Ieiri I, Kataoka Y, Tanabe M, Nishizaki T, Oishi R, Higuchi S, Otsubo K, Sugimachi K. Neurotoxicity induced by tacrolimus after liver transplantation: relation to genetic polymorphisms of the ABCB1 (MDR1) gene. *Transplantation*. 2002 Aug 27;74(4):571-2.

Yoo HD, Lee YB. Interplay of pharmacogenetic variations in ABCB1 transporters and cytochrome P450 enzymes. *Arch Pharm Res*. 2011 Nov;34(11):1817-28.

Yu AM, Idle JR, Byrd LG, Krausz KW, Küpfer A, Gonzalez FJ. Regeneration of serotonin from 5-methoxytryptamine by polymorphic human CYP2D6. *Pharmacogenetics*. 2003b Mar;13(3):173-81.

Yu KS, Yim DS, Cho JY, Park SS, Park JY, Lee KH, Jang IJ, Yi SY, Bae KS, Shin SG. Effect of omeprazole on the pharmacokinetics of moclobemide according to the genetic polymorphism of CYP2C19. *Clin Pharmacol Ther*. 2001 Apr;69(4):266-73.

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.

Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther*. 2013 Jan 16.

Zanger UM, Turpeinen M, Klein K, Schwab M. Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal Bioanal Chem.* 2008 Nov;392(6):1093-108.

Zhu HJ, Wang JS, Donovan JL, Jiang Y, Gibson BB, DeVane CL, Markowitz JS. Interactions of attention-deficit/hyperactivity disorder therapeutic agents with the efflux transporter P-glycoprotein. *Eur J Pharmacol.* 2008 Jan 14;578(2-3):148-58.