



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FOGGIA

Corso di Dottorato in “Medicina Clinica e Sperimentale”

ciclo XXVIII

Coordinatore: Prof. Lo Muzio Lorenzo

---

TESI SPERIMENTALE DI DOTTORATO

**STUDIO DEI POLIMORFISMI RECETTORIALI E DEI LIVELLI  
PLASMATICI E DELLA TERAPIA LONG-ACTING IN PAZIENTI AFFETTI  
DA SCHIZOFRENIA**

**Relatore**

Prof.ssa PETITO Annamaria

**Dottorando**

dott. VENTRIGLIO Antonio

Anno Accademico 2014-2015

## INDICE

---

INTRODUZIONE.....	3
OBIETTIVI.....	13
MATERIALI E METODI.....	14
RISULTATI.....	35
DISCUSSIONE.....	45
LIMITI .....	46
CONCLUSIONI.....	47
<i>Bibliografia</i> .....	48

## INTRODUZIONE

---

Numerose evidenze di letteratura e la pratica clinica confermano che esiste una variabilità individuale di risposta e tollerabilità al trattamento antipsicotico. Sebbene taluni pazienti raggiungano una remissione sintomatologica in seguito al trattamento con un determinato antipsicotico, altri, trattati con il medesimo farmaco, mostrano una risposta parziale oppure mostrano reazioni avverse come effetti extrapiramidali o disturbi cardiometabolici. Sebbene fattori ambientali quali lo stile di vita (fumo, dieta), fattori demografici (sesso, etnia), e legati alla salute (assunzioni di terapie concomitanti, durata di malattia ed esordio, comorbidità mediche) contribuiscano sia alla risposta al trattamento che alla tollerabilità al farmaco, esiste anche un chiaro contributo a questa variabilità individuale legato a fattori genetici [1] [2].

Negli ultimi anni vi sono stati molti progressi nell'identificazione delle varianti geniche associate alla risposta agli antipsicotici ed alle reazioni avverse ai farmaci. Una considerevole attenzione è stata rivolta nei riguardi dello studio di geni coinvolti nella farmacodinamica dei farmaci antipsicotici (ovvero quelli che codificano per i trasportatori dei neurotrasmettitori o per i recettori postsinaptici) [3].

L'individuazione di polimorfismi genici dei target recettoriali dei farmaci e dei trasportatori potrebbe quindi incrementare l'abilità del clinico nell'individuare il giusto trattamento antipsicotico (tailored therapy), riducendo il tempo di latenza di risposta al farmaco ed i potenziali effetti avversi [4] [5].

Nella maggior parte degli studi relativi alle varianti geniche che giocano un ruolo nella risposta agli antipsicotici, l'antagonismo dei recettori della Dopamina è stato diffusamente descritto [6] e, secondariamente, nel caso della risposta agli antipsicotici atipici, il sistema serotoninergico [7].

Esistono tuttavia recenti evidenze che riguardano il ruolo dei recettori del glutammato nella eziopatogenesi della schizofrenia e nella risposta alle terapie antipsicotiche. Ad ogni modo, il blocco dei recettori DRD2 è una proprietà comune a

tutti gli antipsicotici noti e sono stati descritti diversi polimorfismi relativi a questo recettore [8] [9].

### ***Polimorfismi dei recettori della dopamina e risposta alla terapia antipsicotica***

#### *Recettore D2*

Il polimorfismo **D2 TaqI** è associato ad efficace risposta a terapia con Risperidone in pazienti omozigoti per la variante **A1** e mostranti un significativo miglioramento ai punteggi della scala PANSS rispetto a pazienti con altri genotipi [10]. Anche rispetto alla terapia con Aripiprazolo in un gruppo di pazienti asiatici il polimorfismo **TaqIA** si è mostrato predittore di risposta positiva [11] [12] [13].

In letteratura, tuttavia vi sono evidenze non univoche. Infatti in un recente studio condotto su 117 pazienti cinesi drug-naive e affetti da Schizofrenia trattati con Risperidone o Clorpromazina per 10 settimane, Reynolds e colleghi [14] riscontravano che il polimorfismo **Taq1A** non era significativamente associato a cambiamenti nei punteggi alla PANSS. Altri studi evidenziano che il polimorfismo **DRD2 TaqIA** è associato ad un basso legame del farmaco antipsicotico con i rispettivi recettori D2 [15]. Anche un recente studio descrive che il polimorfismo **-141C Ins/Del** ed il **TaqIA**, studiati su un campione di 77 pazienti affetti da schizofrenia trattati con Risperidone e 107 pazienti affetti da Schizofrenia e trattati con Olanzapina, non risultano entrambi associati con la risposta ai rispettivi trattamenti con Risperidone o Olanzapina [16]. In linea con queste evidenze, altri studi mostrano come le varianti alleliche **D2 -141C Del** e **TaqI A2** appaiano relativamente più frequenti in pazienti che mostrano scarsa risposta ai farmaci [17] [18].

Gli Aplotipi D2 risultano in genere associati alla risposta efficace della terapia con Risperidone [19]. Infatti, pazienti trattati e riportanti allele **D2-241-A** mostravano miglioramento psicopatologico significativo se confrontati con i pazienti riportanti

allele **-241-G** [20] [21] [22] [23] [24] . Lencz e colleghi [22] hanno esaminato la regione promotrice del gene del DRD2 come predittore di tempo di risposta al Risperidone e all'Olanzapina nel primo episodio di Schizofrenia e, utilizzando l'analisi della sopravvivenza, hanno riscontrato che l'allele **-241G** mostrava un tempo di risposta significativamente più rapido alla terapia e l'allele **-141C Del** un tempo invece più lungo. Il diplotipo sprovvisto dell'allele **-241G** e **-141C Del** era associato invece ad un tasso di risposta significativamente inferiore. Yamanouchi e colleghi [25] hanno esaminato questi stessi polimorfismi in 73 pazienti giapponesi affetti da Schizofrenia trattati con Risperidone per riacutizzazione psicotica. Una combinazione di polimorfismi **-141C Ins/Del** e **Taq 1A** correlava con una migliore risposta clinica e pazienti con diplotipo **Ins-A2/Del-A1** (n= 10) mostravano il 40% di miglioramento nei punteggi alla Scala dei sintomi Positivi e Negativi (PANSS) se confrontati con pazienti con diplotipo **Ins-A2/Ins A2** (n= 25) [25].

Risperidone è risultato meno efficace in pazienti con allele **D2 Ser311** [26] [27].

E' stato suggerito che un diplotipo del recettore **DRD2**, composto dagli alleli **Ins-A2/Del-A1**, possa predire una miglior risposta al Risperidone e che il polimorfismo **Ser311Cys** possa giocare un ruolo nel determinare l'efficacia del Risperidone sui sintomi positivi, negativi e cognitivi condizionando in generale la risposta al trattamento con diversi agenti antipsicotici [28].

Ancora, è stato studiato il polimorfismo caratterizzato dalla sostituzione della Citosina con la Serotonina in posizione **-311 (Ser311Cys)** nel gene DRD2. Questo polimorfismo è stato associato a risposta al trattamento con Risperidone in pazienti affetti da Schizofrenia [29]. Se confrontati a pazienti omozigoti per l'allele **Ser** (n= 111), i pazienti con genotipo **Ser311Cys** (n= 12) avevano una migliore risposta clinica in tutte le dimensioni comprendenti sintomi positivi, negativi, psicopatologia generale, sintomi cognitivi e funzionamento sociale. Questo è stato il primo studio ad indagare l'associazione fra effetti degli antipsicotici ed i polimorfismi **Ser311Cys** del gene DRD2 [30].

### *Recettore D3*

I recettori D3 della dopamina sono estesamente rappresentati a livello dell'area ventro-tegmentale, dell'ipotalamo e del pallido e la loro attivazione/inibizione è coinvolta in numerosi processi fisiologici, compresa la risposta di adattamento alle terapie antipsicotiche.

Alcuni varianti alleliche D3 sono state studiate in associazione alla risposta clinica della terapia antipsicotica sebbene i risultati forniscano evidenze non univoche [18] [22] .

Esistono alcuni reports di associazione fra varianti D3 e risposta clinica ad Olanzapina, antipsicotico, peraltro , che mostra alta affinità per i recettori D3. Le varianti **D3 Gly9** risultano inoltre associate ad efficace risposta alla terapia con Clozapina e miglioramento dei sintomi positivi durante trattamento con Olanzapina [31] [32], con eccezione per la coorte di pazienti indiani [33].

In aggiunta, il polimorfismo del recettore **D3 Ser9Gly** [34] è stato associato alla efficace risposta al Risperidone, sebbene non in maniera così significativa come per Clozapina o Olanzapina, con un solo studio, in pazienti Cinesi [35].

### ***Polimorfismi dei recettori della serotonina e risposta alla terapia antipsicotica***

Per quanto concerne i polimorfismi del recettore della Serotonina, aplotipi del **5-HT2A** sembrano mostrare un trend di associazione con l'efficacia della risposta alle terapie antipsicotiche [24].

Uno studio di Lane et al. [26] ha preso in esame la correlazione positiva fra risposta clinica al trattamento con Risperidone e polimorfismo **5HT2A 102T/C**. Vi sono inoltre evidenze che individui con genotipo **C/C** esprimano minori quantità di mRNA e quindi di proteina recettoriale di quelli con genotipo **T/T** [34]. Dopo 6 mesi di terapia con Risperidone, i pazienti con genotipo **C/C** (n= 10), nel confronto con pazienti con genotipo **T/C** (n= 47), presentavano punteggi inferiori alla PANSS

tranne nella sottoscala dei sintomi positivi [26]. Lane concludeva quindi che il polimorfismo **102 T/C** potesse influenzare la risposta clinica ai sintomi negativi ma non ai sintomi positivi. Altri studi hanno confermato l'associazione fra la variante **5-HT2A 102-C** ad una maggior efficacia della risposta a Risperidone in pazienti di origine cinese e coreana [36][37] mentre lo stesso allele è associato a minor risposta antipsicotica in pazienti caucasici [38].

Il genotipo **5-HT2A -1438-A/A** è più frequentemente associato a scarsa risposta agli antipsicotici in pazienti di diversi gruppi etnici [39]. In pazienti cinesi, invece, il già descritto genotipo **T102C** ed il **-1438G/A**, in complete-linkage-disequilibrium, influenzano la risposta al trattamento con Risperidone ed Olanzapina rispetto ai sintomi negativi della Schizofrenia (es. affettività negativa e ritiro sociale) [40].

Ellingrod e colleghi [41] descrivono relazioni fra il polimorfismo **5HTR2A -1438G/A** (che è in completo linkage-disequilibrium con il polimorfismo 102T/C) e la risposta ai sintomi negativi con Olanzapina in 41 soggetti affetti da Schizofrenia. Il genotipo A/A risultava associato al miglioramento dei sintomi negativi in risposta al trattamento con Olanzapina. Yamanouchi e colleghi [25] hanno esaminato i polimorfismi candidati (compresi **5HTR2A -1438G/A**, **102T/C**, **His452Tyr**) in 73 pazienti giapponesi in trattamento con Risperidone non ritrovando una influenza significativa sulla la risposta clinica. I ricercatori concludevano che i risultati potevano essere limitati dal campione insufficiente e dalla eterogeneità di pazienti rispetto alla storia di utilizzo di antipsicotici.

Il polimorfismo **5HTR6T267C** è stato correlato alla risposta con Risperidone per quanto concerne i sintomi positivi (deliri and allucinazioni) [34].

Infine il genotipo **5-HT1A -1019-C/C** è frequentemente riscontrato in pazienti che mostrano un miglioramento dei sintomi psicotici in coorti di Spagnoli caucasici in linea con precedenti risultati ottenuti fra pazienti cinesi trattati con Risperidone [40].

### ***Polimorfismi dei recettori del glutammato e risposta alla terapia antipsicotica***

Negli ultimi anni si consolidano le evidenze a favore del ruolo del glutammato nella pato-fisio-genesi della schizofrenia e nella risposta alla terapia antipsicotica. In particolare il recettore metabotropico GRM3/GRM2 è collegato alla risposta dei sintomi positivi e negativi della psicosi trattata. Varianti funzionali del GRM3 modulano i livelli sinaptici di glutammato.

Fijal Ba et al. identificavano un'associazione del polimorfismo **GRM3 rs724226** e variazioni dei punteggi alla PANSS in pazienti trattati con Risperidone [42].

Bishop e colleghi identificavano un'associazione fra polimorfismi GRM3 (**rs274622**, **rs724226**, **rs917071**, **rs1468412**, **rs1989796**, **rs1476455**) e miglioramento dei sintomi negativi in soggetti affetti da Schizofrenia e trattati con Olanzapina [6].

Bishop e colleghi, in un recente studio, identificavano un'associazione molto elevata fra polimorfismo **rs6465084** del GRM3 e risposta farmacologica ai sintomi negativi e polimorfismo **rs274622** e miglioramento dei sintomi positivi, misurati tramite miglioramento dei punteggi alla BPRS, in pazienti schizofrenici trattati prevalentemente con Risperidone [33].

Infine un polimorfismo **GRM3 rs724226** [43] e diversi polimorfismi di singoli nucleotidi nella proteina G di segnale subtipo 4 (RGS4) sono stati trovati in associazione all'efficacia di Risperidone in recenti reports che non sono stati tuttavia confermati in studi indipendenti.



## ***Background***

Sulla base di questi dati estrapolati dagli studi scientifici disponibili e considerando l'importanza di ampliare le conoscenze sulle basi molecolari degli effetti dei farmaci antipsicotici, abbiamo elaborato un'ipotesi di studio per confermare ed eventualmente approfondire, nella nostra popolazione di pazienti affetti da schizofrenia in trattamento antipsicotico continuativo, l'influenza della costituzione allelica sulla risposta alle terapie in formulazione long-acting. Oltre allo studio del recettore DRD2, abbiamo pensato di proporre lo studio del recettore GRM3 alla luce delle nuove teorie glutammatergiche formulate per la schizofrenia.

### ***Livelli plasmatici e risposta al trattamento antipsicotico***

In psicofarmacologia gli studi sul monitoraggio dei livelli plasmatici dei farmaci si sono spesso concentrati sulla valutazione della compliance dei pazienti, sulla valutazione degli effetti avversi e dei dosaggi tollerabili/terapeutici.

La relazione dose-effetto dei diversi farmaci varia considerevolmente fra i pazienti, soprattutto in relazione a differenze farmacocinetiche quali l'età, metabolismo del primo passaggio, induzione o inibizione microsomiale [44 ] [45].

La fonte maggiore di variabilità farmacocinetica è l'ossidazione del farmaco attraverso la via metabolica catalizzata dal sistema enzimatico del Citocromo P450. La sua attività varia molto da soggetto a soggetto a causa di differenze ambientali e genetiche [46].

Sebbene sia considerato come parte del meccanismo grazie al quale un farmaco viene inattivato ed escreto, il metabolismo conduce anche alla formazione di metaboliti attivi la cui attività può essere simile a quella del composto parente o del tutto differente [47]. Studi metabolici hanno dimostrato che, nella gestione clinica della terapia farmacologica, è utile determinare le concentrazioni plasmatiche sia del composto parente che del metabolita attivo. Per giunta, la ratio metabolica (rapporto fra concentrazioni plasmatiche dei due) potrebbe essere un indicatore genetico indiretto dello stato metabolico del soggetto ed un indice di farmaco resistenza costituzionale o acquisito (risultato di inibizione o induzione enzimatica) [48] [49].

Tra gli antipsicotici atipici long-acting il farmaco più studiato in letteratura è certamente il Risperidone (a rilascio prolungato in microsferi). Negli ultimi 10 anni alcuni autori hanno studiato la tappa di metabolismo epatico del risperidone idrossilato (-OH) in posizione -9 a livello del citocromo CYP2D6. Risperidone e la forma idrossilata 9-Idrossi-Risperidone costituiscono la componente attiva del farmaco ed i dosaggi plasmatici di tali composti sono stati confrontati con i miglioramenti psicopatologici registrati alla scala psicométrica PANSS (Positive and Negative Syndrome Scale) e polimorfismi del citocromo CYP2D6 [50] [51].

Sorprendentemente, gli studi hanno dimostrato che il miglioramento clinico non correlava con i livelli plasmatici della componente attiva del farmaco. Gli autori, pertanto, concludevano che le isoforme diverse del citocromo CYP2D6 non contribuivano ad alterare in maniera specifica l'efficacia clinica del Risperidone.

Piuttosto, emergeva come nei pazienti non-responder alle terapie i livelli della componente attiva del farmaco fossero associati a maggiori effetti collaterali (in particolare effetti extrapiramidali) [52] [53].

Gli effetti farmacologici del Risperidone dipendono dalla somma nel plasma delle concentrazioni del Risperidone e del suo metabolita 9-idrossirisperidone, perciò il monitoraggio delle concentrazioni nel plasma del primo composto soltanto potrebbe condurre ad erronee valutazioni. Sembrerebbe che monitorare le concentrazioni plasmatiche della molecola attiva potrebbe fornire utili informazioni ma sono necessarie ulteriori indagini volte a chiarire la discrepanza nei risultati. Sarebbe importante capire se esiste una correlazione fra risposta clinica e concentrazioni plasmatiche della molecola attiva dato che alcuni ricercatori hanno evidenziato una correlazione negativa in conflitto con studi precedenti [54] [55].

Malgrado la grande variabilità delle concentrazioni del farmaco nel plasma, la mancanza di studi utilizzanti dosaggi fissi e le discrepanze nei risultati, sembra che il monitoraggio delle concentrazioni nel plasma della parte attiva possa risultare utile. Tuttavia, non sono state ancora individuate ad oggi concentrazioni plasmatiche terapeutiche del Risperidone.

Gli studi disponibili inerenti la relazione fra risposta clinica e livelli plasmatici dell'Olanzapina sono studi a breve termine (periodo di trattamento non superiore alle sei settimane). Gli studi disponibili su Olanzapina indicano comunque una stretta correlazione fra risposta clinica e livelli plasmatici del farmaco.

Il monitoraggio del farmaco potrebbe quindi essere utilizzato per controllarne efficacia ed eventi avversi. Gli studi indicano un range terapeutico compreso fra 20–50 ng/mL [53] [54] [55].

Non vi è invece evidenza concernente il rapporto fra livelli plasmatici dell'Aripiprazolo ed efficacia sul piano clinico [53].

Vi sono ad oggi pochi studi disponibili ed inconsistenti sulla relazione efficacia clinica/livelli plasmatici nelle popolazione trattate con Olanzapina Pamoato, Paliperidone Palmitato e Aripiprazolo long-acting.

## OBIETTIVI

---

Scopo del presente studio è quello di descrivere la:

1. Relazione tra livelli plasmatici dei farmaci long-acting ed efficacia clinica. Un numero esiguo di studi ha indagato le relazioni tra livello plasmatico del farmaco antipsicotico ed efficacia clinica. Studi condotti su popolazioni trattate con terapia orale sono giunte a conclusioni diverse in base al farmaco indagato:

- Risperidone: assenza di associazione tra livelli plasmatici ed efficacia clinica.
- Olanzapina: associazione tra alti livelli sierici e risposta clinica.
- Paliperidone: non sono presenti dati consistenti in letteratura.
- Aripiprazolo: nessuna chiara evidenza.

Pochi e inconsistenti studi hanno indagato tale aspetto in riferimento a terapie in formulazione long-acting.

2. Relazione tra polimorfismi genetici ed efficacia clinica in pazienti trattati con farmaci long-acting.

Dai più recenti studi di letteratura, le terapie orali con Risperidone ed Olanzapina si mostrano più efficaci in popolazioni con determinati polimorfismi. Il presente studio proponeva l'indagine di due geni studiati sia in popolazioni trattate con Risperidone che con Olanzapina.

1. D2 o (DRD2). Determinati polimorfismi di D2 risultano più responsivi a Risperidone ed Olanzapina.
2. GMR3. Polimorfismi associati ad un miglioramento della sintomatologia negativa e positiva. Dato ottenuto prevalentemente con terapie a base Risperidone.

## **MATERIALI E METODI**

---

Il disegno dello studio è prospettico longitudinale. Previa sottomissione del progetto e approvazione di questo da parte del comitato etico degli Ospedali Riuniti di Foggia, lo studio ha previsto l'arruolamento di un campione di pazienti affetti da Schizofrenia in trattamento stabile (ovvero al raggiunto steady-state) e continuativo con i seguenti farmaci long-acting:

1. Paliperidone Palmitato
2. Olanzapina Pamoato
3. Risperidone a rilascio prolungato
4. Aripiprazolo a rilascio prolungato

La scelta della formulazione long-acting in monoterapia ha permesso di escludere pazienti non complianti ai trattamenti e difformità/eterogeneità nei regimi terapeutici. Ciò ha reso metodologicamente il campione uniforme riducendo il numero di variabili confondenti.

L'arruolamento è avvenuto presso il Servizio Psichiatrico di Diagnosi e Cura di Foggia ed i Centri di Salute Mentale afferenti (CSM di Foggia, CSM di Manfredonia, Ambulatorio del SPDC di Manfredonia, CSM di Troia, CSM di Lucera), con valutazioni ambulatoriali o in regime di ricovero Day-Hospital o Ordinario.

Ogni paziente è stato adeguatamente informato delle finalità e delle modalità di indagine previste dallo studio ed il consenso alla partecipazione è risultato subordinato alla sottoscrizione di un modulo di consenso informato.

I criteri di inclusione sono stati i seguenti:

- I. Pazienti affetti da schizofrenia ed in trattamento monoterapico (eccetto in aggiunta benzodiazepine) continuativo con antipsicotici long-acting atipici;
- II. Età compresa fra i 18 ed i 65 anni;
- III. Disponibilità a firmare il consenso informato allo studio;

IV. Lingua parlata: italiano in modo sufficiente da poter comprendere gli strumenti di valutazione e sostenere un colloquio clinico;

I criteri di esclusione erano i seguenti:

- I. Pazienti affetti da deterioramento cognitivo clinicamente significativo (punteggio MMSE <24);
- II. Pazienti il cui stato psichico non consentisse la partecipazione all'intervista clinica;
- III. Pazienti in trattamento con antipsicotici depot tipici;
- IV. Pazienti in trattamento con farmaci long-acting atipici da meno di tre mesi (almeno alla quarta somministrazione);
- V. Pazienti che si siano rifiutati di firmare il modulo di consenso informato;
- VI. Problematiche internistiche di rilievo (severe condizioni cardiologiche, neurologiche; renali: nefriti, nefrosi, insufficienza renale; epatiche: insufficienza epatica; insufficienza respiratoria acuta e cronica; severe endocrinopatie; severe malattie reumatologiche; patologie ematologiche severe; condizioni oncologiche)
- VII. Stato di gravidanza.

Per ogni paziente sono state previste tre valutazioni a distanza di tre mesi l'una dall'altra per un totale di tre tempi (T0= arruolamento, T1= 3 mesi, T2= sei mesi).

La prima delle tre valutazioni previste è stata effettuata in un periodo di trattamento del paziente in cui la terapia antipsicotica aveva raggiunto lo steady state ovvero indicativamente dopo la quarta somministrazione di terapia long acting (tenendo conto dei periodi di induzione indicati nelle schede tecniche di Risperidone e Paliperidone a rilascio prolungato, Olanzapina Pamoato ed Aripiprazolo LAI).

Nel corso di ogni valutazione è stato eseguito prelievo ematico venoso al fine di valutare:

- Livello plasmatico del farmaco
- Polimorfismo genetico del
  - Recettore dopaminergico D2 (o DRD2)
  - Recettore glutammatergico metabotropico 3 (GRM3)

Le modalità e la strumentazione di prelievo sono state adeguate a quelle dei servizi sanitari ASL Foggia in cui lo studio ha avuto luogo e autorizzate secondo indicazioni del comitato etico aziendale informato.

L'invio di materiale biologico (sangue venoso) presso il laboratorio di Genetica degli Ospedali Riuniti di Foggia e di Casa Sollievo della Sofferenza di San Giovanni Rotondo (Foggia) è stato anch'esso adeguato alle indicazioni e le modalità autorizzate dagli enti e dal comitato etico interessati.

Al momento dell'arruolamento è stata compilata una cartella clinica comprensiva di dati anamnestici, sociodemografici e clinici del paziente.

Il quadro clinico di tutti i pazienti è stato valutato attraverso colloquio clinico e somministrazione di scale psicometriche PANSS (Positive and Negative Syndrome Scale), CGI (Clinical Global Impression), BPRS (Brief Psychiatric Rating Scale) al momento del prelievo ematico (arruolamento) e a 3 e 6 mesi dall'arruolamento. La prima delle tre valutazioni prevedeva anche il prelievo ematico per esami ematochimici di routine ed ECG.

Nel corso di ogni tempo sono stati inoltre monitorati i parametri metabolici (Peso, altezza, BMI, circonferenza vita) e sono stati registrati gli eventuali effetti collaterali da terapia.

Follow-up clinico dei pazienti in trattamento:

I pazienti sono stati valutati clinicamente, nel momento di stabilizzazione della terapia farmacologica long- acting, ed ad ogni successiva somministrazione mensile. Le valutazioni psicometriche di efficacia sono state eseguite ai tempi 0, 3 mesi e 6 mesi. Il prelievo ematico per lo studio dei livelli e dei polimorfismi è avvenuto



contestualmente all'arruolamento a terapia long- acting stabile e avviata (dopo la quarta somministrazione per ogni paziente). A proposito è stato considerato che Risperidone RP viene reinoculato ogni 15 giorni e che le prime due iniezioni non sono prontamente efficaci ma richiedono supplementazione con Risperidone orale per circa 21 giorni. Olanzapina Pamoato viene rieseguita ogni 28 giorni e lo steady state viene raggiunto solo dopo alcuni giorni (6-8) dalla iniezione. Paliperidone palmitato viene ripetuto ogni 30 giorni, prevede una induzione iniziale con dose da carico e che la seconda somministrazione si effettui dopo 8 giorni dall'iniezione di induzione. Dalla terza somministrazione viene rispettato l'intervallo circamensile. Aripiprazolo raggiunge il picco plasmatico dopo circa 5-7 giorni e lo steady state dopo la quarta somministrazione.

### ***Valutazione Diagnostica:***

La valutazione diagnostica ha tenuto conto dell'anamnesi, del colloquio clinico ed è stata convalidata dall'utilizzo della:

- Mini-International Neuropsychiatric Interview – (M.I.N.I.)

La diagnosi è stata formulata all'arruolamento in accordo coi criteri DSM 5/ICD 9 per le patologie in esame.

### ***Valutazione psicometrica***

Si è avvalsa delle seguenti scale:

- **Positive and Negative Syndrome Scale- Versione Italiana (PANSS)** (Kay et al., 1986-92): scala di valutazione composta da 30 item, suddivisi in tre sottoscale (positiva, negativa, psicopatologica generale). La prima sottoscala indaga la presenza della "sindrome positiva", la seconda della "sindrome negativa", la terza sottoscala indaga gli altri aspetti sintomatologici eventualmente presenti all'osservazione. Individuando e dando un punteggio ai sintomi inquadrabili come positivi e negativi,

quindi, è strutturata per descrivere se il paziente sia caratterizzabile per una forma patologica in cui prevale la produttività (sindrome positiva) o, viceversa, un ritiro cognitivo-emozionale (sindrome negativa). Ad ogni item è assegnato un punteggio che va da “assente” (1) a “estremamente grave” (7). Il valore (0) corrisponde a “non valutabile”. Questa scala indaga la sintomatologia presente al tempo della somministrazione, ma nel caso di valutazioni ripetute è adatta a monitorare il decorso clinico. Un punteggio pari a 58 corrisponde ad una malattia lieve, 75 malattia moderata, 95 malattia marcata e 116 malattia severa.

· **Brief Psychiatric Rating Scale – Versione Italiana (BPRS)** (Overall e Gorham, 1962): scala di eterovalutazione adatta soprattutto alla valutazione di pazienti psicotici, composta da 18 item che esplorano altrettanti sintomi. Ciascun item è valutato su una scala a 7 punti (da “assente” a “molto grave”); il punteggio totale della scala può essere assunto come espressione della gravità della malattia. Sulla base dell’analisi fattoriale gli item sono stati raggruppati secondo 5 aree sintomatologiche: ansia e depressione, anergia, disturbo del pensiero, attività, ostilità-sospettosità.

Il punteggio va da 24 a 168 e più alto è il punteggio maggiore è la severità.

· **Clinical Global Impression, Gravità di malattia – Versione Italiana (CGI):** formulata dallo Psychopharmacology Research Branch (PRB) del NIMH nell’ambito di una vasta ricerca sulla Schizofrenia, consente la formulazione di un giudizio globale in 3 aree, la gravità della malattia, il miglioramento globale e l’indice di efficacia terapeutica. La scala di gravità di malattia ha un range che va da 1 a 7 (rispettivamente normalità e malattia severa). Anche la scala relativa al miglioramento va da un punteggio di 1 (molto migliorato) a 7 (molto peggiorato). La scala relativa alla risposta al trattamento deve tener conto sia dell’efficacia terapeutica sia degli effetti collaterali e va da 0 (miglioramento marcato in assenza di effetti collaterali) a 4 (immodificato o peggiorato e comparsa di effetti collaterali).

Le scale sono state somministrate all’arruolamento ed a tre e sei mesi.

Al T0 erano previsti inoltre dei tests in autosomministrazione e nello specifico:

- **Temperament and Character Inventory (TCI) di Cloninger.** E' diviso in due parti, il Temperamento (tratti innati, non acquisiti, con 4 dimensioni contenenti 4 sottodimensioni ciascuna, per un totale di 16 sottodimensioni) e il Carattere (acquisito socio-culturalmente, con 3 dimensioni che includono un totale di 13 sottodimensioni): **Temperamento:** RICERCA DELLA NOVITÀ (*Novelty Seeking [NS]*): Eccitabilità esplorativa (*Exploratory excitability*), Impulsività (*Impulsiveness*), Eccesso e sperpero (*Extravagance*), Sregolatezza (*Disorderliness*); EVITAMENTO DEL DANNO: (*Harm Avoidance [HA]*); Ansia anticipatoria (*Anticipatory worry*), Paura dell'incertezza (*Fear of uncertainty*), Timidezza (*Shyness*), Affaticabilità (*Fatigability*); DIPENDENZA DALLA RICOMPENSA (*Reward Dependence [RD]*): Sentimentalità (*Sentimentality*), Apertura all'esperienza (*Openness to experience*), Attaccamento (*Attachment*), Dipendenza (*Dependence*); PERSISTENZA (*Persistence [P]*): Desideroso di impegnarsi (*Eagerness of effort*), Temprato dal lavoro (*Work hardened*), Ambizioso (*Ambitious*), Perfezionista (*Perfectionist*). **Carattere:** AUTODIREZIONALITÀ (*Self-Directedness [SD]*): Responsabilità (*Responsibility*), Propositività (*Purposefulness*), Ricchezza di risorse (*Resourcefulness*), Accettazione di sé (*Self-acceptance*), Abitudini connaturate (*Enlightened second nature*); COOPERATIVITÀ (*Cooperativeness [C]*), Accettazione sociale (*Social acceptance*), Empatia (*Empathy*), Altruismo (*Helpfulness*), Compassione (*Compassion*), Onestà morale (*Pure-heartedness*); AUTOTRASCENDENZA (*Self-Transcendence [ST]*): Dimenticanza di sé (*Self-forgetfulness*), Identificazione transpersonale (*Trans-identification*), Accettazione spirituale (*Spiritual acceptance*). Inizialmente Cloninger aveva proposto solo le prime tre dimensioni del temperamento (NS, HA, RD), ipotizzando che a ciascuna di esse corrispondesse uno dei principali sistemi neurotrasmettitoriali (rispettivamente la dopamina, la serotonina e la norepinefrina), ma non emersero sufficienti dati empirici per dimostrare un legame così stretto tra dimensioni temperamentali e neurobiologia. In seguito aggiunse una quarta dimensione temperamentale (P). Le quattro

dimensioni del temperamento verrebbero ereditate in modo indipendente e sono distribuite nella popolazione normale. Le tre dimensioni del carattere (SD, C, ST) sarebbero invece scarsamente ereditabili, ma sarebbero dipendenti dall'apprendimento sociale, dai processi cognitivi superiori, dai valori acquisiti, ecc. Le sette dimensioni del TCI (di cui nel 1999 Cloninger ha costruito una Revisione, il TCI-R) interagiscono tra loro in un sistema complesso che si auto-organizza e si auto-regola per trovare pattern comportamentali che soddisfino tutti i vincoli interni ed esterni nel corso del ciclo vitale (Fossati & Borroni, 2008, pp. 415-450).

- **NEO Personality Inventory (Costa e McCrae, 1978, 1985, 2005)** è uno dei modelli più importanti del testing in Europa per la valutazione della personalità secondo la teoria dei Cinque fattori [156] (nevroticismo, estroversione, apertura all'esperienza, amicalità, coscienzialità). Lo strumento permette, quindi, di individuare in modo preciso le caratteristiche personologiche che si declinano nella persona su un totale di 30 scale.

### ***Dosaggio sierologico di Farmaci***

Il campione di sangue, raccolto in provette con sodio citrato al 3,8%, è stato prelevato nel SPDC di Foggia e nei CSM aderenti allo studio e trasportato presso il laboratorio di Genetica degli Ospedali Riuniti di Foggia (Università degli Studi di Foggia) ove è stato immediatamente centrifugato a 3000 rpm per 10'. Il plasma è stato prelevato, aliquotato e immediatamente congelato a -80°C, la parte corpuscolata, invece, è stata risospesa in soluzione fisiologica (NaCl 0.9%) e conservata ad una temperatura di -20°C per la successiva purificazione del DNA.

Il plasma è stato successivamente inviato presso il laboratorio di Emostasi e Trombosi dell'IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo, diretto

dalla Dott.ssa Elvira Grandone ove sono state eseguite le analisi relative ai livelli plasmatici dei farmaci.

In particolare, il farmaco è stato dosato per mezzo dello spettrometro di massa API 3000 Tandem Mass con metodo di cromatografia liquida (LC-MS/MS). Tale metodica è stata già descritta e pubblicata dal gruppo di lavoro dei laboratori dell'ospedale Casa Sollievo della Sofferenza di S.Giovanni Rotondo (FG), Italia. [157].

#### ✓ Spettrometro di massa

La spettrometria di massa è una metodica che consente l'identificazione e l'analisi quantitativa di una molecola a partire dalla sua massa.

Tale tecnica sfrutta due fenomeni correlati alla massa ( $m$ ) ed alla carica ( $z$ ):

1) la traiettoria di uno ione o di una particella carica in movimento può essere modificata per azione di un campo magnetico od elettrico, e l'entità della deviazione è funzione del rapporto  $m/z$  della particella: a parità di carica, particelle di massa minore subiranno deviazione maggiore.

2) ioni o particelle cariche, accelerati da un campo elettrico, assumono velocità diverse in dipendenza della loro massa: a parità di carica, particelle di massa maggiore assumono velocità minore.

Le tappe fondamentali del processo d'analisi sono:

1. ionizzazione delle molecole in esame, cioè la trasformazione in uno o più ioni, in genere con carica positiva;
2. accelerazione degli ioni per immissione in un campo elettrico;
3. separazione degli ioni con massa diversa;
4. rivelazione dei diversi ioni formati e la conseguente determinazione della loro massa.

Affinché si possano realizzare, lo spettrometro di massa deve essere dotato di almeno 4 componenti:

- 1) camera di ionizzazione per produrre ioni;

- 2) un campo elettrico per accelerare gli ioni prodotti;
- 3) un analizzatore di massa, che utilizzando un campo magnetico e/o un campo elettrico, separa gli ioni di massa diversa;
- 4) un rivelatore, che raccoglie gli ioni generando un impulso quantificabile e registrabile.

Il campione viene introdotto in una camera da vuoto mediante un opportuno sistema di introduzione, nel nostro caso un sistema HPLC usato come ingresso dello spettrometro di massa, dopo di che viene ionizzato nella camera di ionizzazione e gli ioni prodotti vengono separati nell'analizzatore sulla base del loro rapporto  $m/z$  e raccolti da un rivelatore. Nel rivelatore essi generano un segnale elettrico proporzionale al numero di ioni presenti. Il sistema di elaborazione dati registra questi segnali elettrici in funzione del rapporto  $m/z$  e li converte in uno spettro di massa.

Esistono diverse modalità di ionizzazione, che rappresentano il principale elemento di differenziazione tra le varie metodiche.

Nel nostro caso si è trattato di evaporazione ionica, meglio nota con il termine ESI (Electro Spray Ionization). La peculiarità dell'ESI è il fatto che la ionizzazione avviene a pressione atmosferica e dà origine a ioni multicarica della stessa molecola (ionizzazione positiva). Poiché la separazione avviene in base al rapporto  $m/z$ , aumentando il numero delle cariche  $z$  di uno ione è possibile che molecole di parecchi milioni di dalton rientrino nell'intervallo di massa rilevabile dalla maggior parte degli analizzatori esistenti.

Il campione, sciolto in una miscela acqua/solvente volatile (metanolo, acetonitrile o loro miscele), è nebulizzato a pressione atmosferica dentro la camera di ionizzazione attraverso un ago tenuto ad un alto potenziale elettrico.

Le goccioline di spray, che si sono caricate positivamente per azione del campo elettrico, vengono attratte verso una "lente di estrazione di ioni", che grossolanamente è costituito da un capillare mantenuto sotto vuoto e a un potenziale

negativo; in tal modo il sovente evapora e gli ioni carichi sono accelerati verso l'analizzatore (Fig.1).

Da un campione è possibile produrre ioni molecolari positivi o negativi a seconda della polarità del voltaggio del capillare e del solvente utilizzato.

Da una stessa molecola si formano molteplici ioni molecolari *ciascuno recante un diverso numero di cariche*, che vengono quindi inviati all'analizzatore sotto vuoto dell'apparecchio: si ottiene così uno spettro in cui i numerosi *picchi adiacenti differiscono tra loro per una unità di carica*, più comunemente un singolo protone.

Il programma computerizzato che gestisce lo spettrometro provvede a calcolare il valore della carica di ogni singolo picco e ciò consente di determinare il valore della massa con una accuratezza superiore a qualsiasi altra tecnica disponibile. Se ne ricava il così detto "spettro deconvoluto" che riporta un unico picco, il cui valore di massa è quello del campione analizzato. I vari analizzatori differiscono tra loro principalmente per: il massimo rapporto  $m/z$  misurabile; il potere risolutivo; la sensibilità; la velocità di analisi e la facile utilizzazione se lo spettrometro è interfacciato ad un altro apparecchio (HPLC, GC, EC). Tra questi l'elemento più importante è il *potere risolutivo* che non è altro che la capacità di separare due picchi di massa diversa; ne consegue che all'aumentare del potere risolutivo dell'analizzatore aumenta l'accuratezza della misura che indica di quanto il valore ottenuto o massa misurata si discosta dal valore reale o massa reale, indica cioè l'ampiezza dell'errore insito nella misurazione. L'accuratezza dipende da molteplici fattori connessi alle metodiche seguite nell'analisi per la ionizzazione, la rilevazione, l'acquisizione dei dati, che possono influire singolarmente o congiuntamente sul risultato finale. Per determinare l'accuratezza di un'analisi si effettua una calibrazione con una molecola di cui si conosce la massa esatta.

L'analizzatore da noi utilizzato è a quadrupolo, questo è formato da quattro barre metalliche parallele di 10 – 20 cm di lunghezza poste in una camera sotto vuoto. Le barre hanno sezione circolare od iperbolica e sono disposte a coppie sovrapposte.

Le barre sono collegate sia ad una sorgente di corrente continua, sia ad una sorgente di corrente alternata a radiofrequenza. Ad una coppia di barre diagonalmente opposte è applicato un potenziale positivo, all'altra coppia un potenziale negativo. A tutte e due le coppie è sovrapposta una corrente a RF, ma il voltaggio di RF sovrapposto alle barre negative è tale da trovarsi di  $180^\circ$  fuori fase rispetto alla coppia positiva. La funzione della corrente alternata a radiofrequenza è quella di far variare la polarità ed il voltaggio delle barre, più o meno rapidamente a seconda della frequenza applicata (Fig.2,3).



Fig. 1 Introduzione del campione nello spettrometro attraverso il capillare

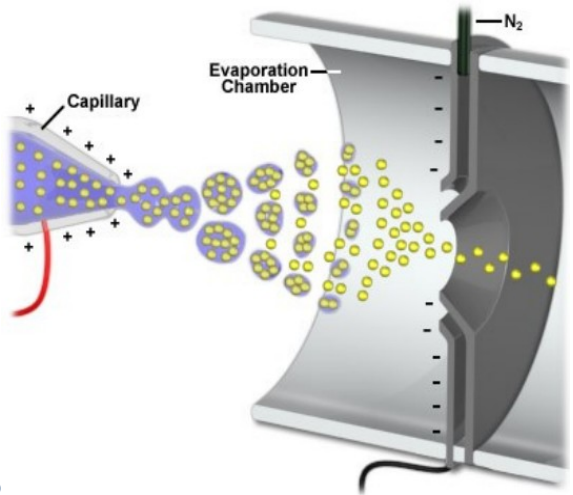


Fig.2 Analizzatore a quadrupolo

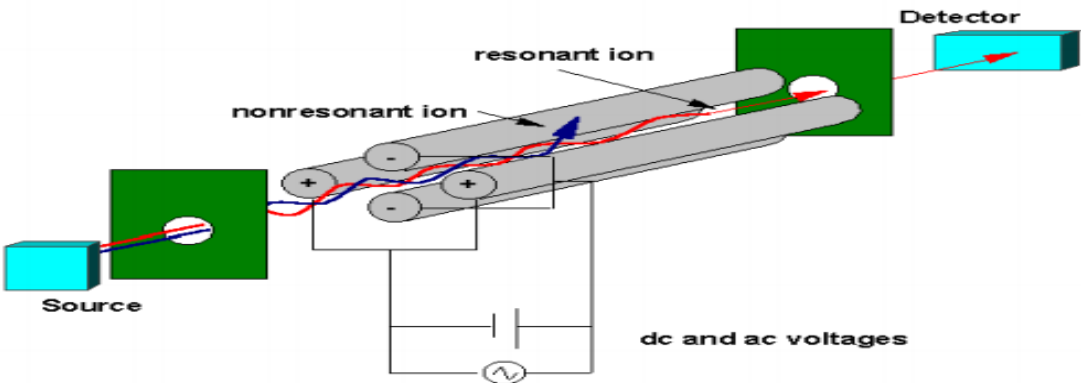
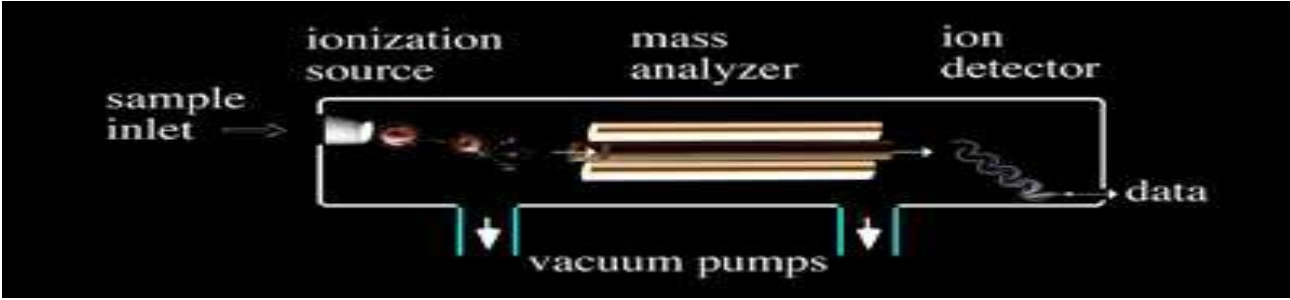


Fig.3 Spettrometro di massa



Il movimento di uno ione che entra nel quadrupolo subisce oscillazioni in quanto viene alternativamente attratto e respinto dalle coppie di barre che variano in continuo il loro potenziale da + a -. Lungo il cammino degli ioni si genera un campo elettrico che varia continuamente, e la traiettoria seguita dagli ioni non è pertanto lineare, ma segue un andamento a spirale.

Solo per certi valori di voltaggio e radiofrequenza gli ioni con un dato valore  $m/z$  mantengono un'oscillazione stabile, escono dall'analizzatore e giungono fino al rivelatore; gli altri, con diverso rapporto  $m/z$  subiranno delle oscillazioni instabili che li porteranno a collidere con le barre del quadrupolo ed ad annullarsi. Una proprietà del quadrupolo è che la massa degli ioni che lo attraversano fino al rivelatore è proporzionale al voltaggio applicato alle barre; pertanto variando voltaggio e RF si ottiene la filtrazione successiva, e quindi l'arrivo al rivelatore, di ioni a massa diversa. Ciò consente la selezione di un particolare ione, oppure la scansione nel campo delle masse tramite la variazione delle tensioni. Se si applica la sola RF tutti gli ioni sono inviati al rivelatore.

Il potere risolutivo di questi analizzatori è nell'ordine di 3.000 e quindi il quadrupolo è da considerarsi un analizzatore a bassa risoluzione; è però meno costoso di un analizzatore a settore magnetico e l'acquisizione di uno spettro avviene in pochi secondi.

L'analizzatore a quadrupolo è quello più frequentemente accoppiato alla ionizzazione per elettrospray, e trova ampia applicazione come sistema di rivelazione nella cromatografia liquida e nella gas cromatografia accoppiate alla spettrometria di massa.

I rivelatori o detectors usati negli spettrometri di massa sono rapportabili a due tipi principali:

- quelli a misura diretta;
- quelli a moltiplicatore.

Quello da noi usato è il moltiplicatore elettrico costituito da una serie di elettrodi in cascata. Quando uno ione arriva sul primo elettrodo questo emette un fascio di

elettroni che vanno a colpire il secondo elettrodo, il quale a sua volta emette una quantità maggiore di elettroni e così via.

Il risultato è una forte amplificazione del segnale che viene poi digitalizzato ed elaborato infine dal calcolatore dello spettrometro per la presentazione dello spettro di massa.

Lo spettro di massa si presenta quindi come un insieme di linee verticali (*picchi*) di intensità diversa, ciascuna corrispondente al valore di massa di uno ione frammento.

### ***Esame dei polimorfismi***

I polimorfismi sono stati indagati presso il laboratorio di Genetica degli Ospedali Riuniti di Foggia - Università degli Studi di Foggia, diretto dal Prof. Maurizio Margaglione .

Il campione di sangue, raccolto in sodio citrato al 3,8% presso SPDC di Foggia, è stato inviato presso il laboratorio di Genetica. Per confermare ed approfondire i dati di letteratura, abbiamo ricercato presso il laboratorio di Genetica Medica degli OO.RR. di Foggia, diretto dal Prof. Maurizio Margaglione, le varianti geniche (SNPs) dei geni GMR3 e DRD2.

Innanzitutto è stato estratto il DNA dal sangue di ogni paziente con metodica Salting out, successivamente è stata effettuata l'analisi attraverso amplificazione genica dei frammenti genici d'interesse (PCR), grazie a primers specifici per i 6 polimorfismi in studio, è stato osservato il prodotto di PCR su gel di agarosio e, infine, è stato eseguito il sequenziamento diretto per la caratterizzazione molecolare.

#### ✓ Estrazione di DNA da sangue (Salting out)

Per il recupero dell'acido nucleico i pazienti sono stati sottoposti a prelievo di tre provette di sangue venoso di circa 5 ml in provetta con sodio citrato 3.8% o EDTA.

Il sangue è stato trasferito in una falcon da 50 ml, alla quale sono stati aggiunti 45 ml di una soluzione lisante (*lysis buffer*) costituita da Saccarosio 0.32 M, Tris-HCl 10 mM PH 7.5; MgCl<sub>2</sub> 5mM, Triton X-100 1%. Dopo aver centrifugato la sospensione a

3500 rpm per 10 minuti, è stato eliminato il sovrantante e il pellet ottenuto è stato sottoposto a un doppio lavaggio mediante un buffer di lavaggio (*fisio buffer*) costituito da NaCl 0.075 M, EDTA 0.025 M e successivamente centrifugato a 3500 rpm per recuperare un pellet costituito da acidi nucleici contaminati ancora da materiale proteico e glicoproteico. Quindi, il pellet è stato trattato con 3 ml di un'ulteriore soluzione di lavaggio (*buffer A*) costituito da Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 2 mM, con l'aggiunta di SDS 10% e *Proteinase K* (enzima proteolitico) ed incubato a 65° C per 1 ora.

Al termine dell'incubazione è stato aggiunto 1/6 ( $\approx 5 \mu\text{l}$ ) del volume totale di NaCl 5M per allontanare le proteine ancora presenti. Questo passaggio determina una riduzione della solubilità delle proteine degradate all'interno del solvente e facilita l'aggregazione e la successiva precipitazione dopo centrifugazione a 3000 rpm per 10 minuti (salting out) del DNA.

- ✓ Il sovrantante, contenente il DNA, è stato trasferito in una falcon sterile, nella quale sono stati precedentemente aggiunti 2 volumi di alcool isopropilico (6ml), si è così reso visibile il DNA sottoforma di nuvola bianca, la cosiddetta “medusa”, che è stata prelevata utilizzando una pasteur di vetro, precedentemente chiusa e curvata ad un'estremità, e lavata ripetutamente in etanolo 70% per eliminare i sali residui e l'eccesso di alcool isopropilico. Dopo aver fatto evaporare l'etanolo per qualche secondo a temperatura ambiente, il DNA è stato risospeso in 500  $\mu\text{l}$  di TE 1X o acqua sterile. Reazione di amplificazione(PCR) delle regioni geniche di interesse

Per amplificare le regioni geniche di nostro interesse, è stata utilizzata la reazione a catena della polimerasi (PCR, Polimerase Chain Reaction). Per effettuare tale amplificazione abbiamo utilizzato 3 coppie di primers complementari alle estremità del frammento specifico di nostro interesse.

La reazione di PCR è stata condotta in un volume finale di 50 $\mu\text{l}$ , con i reagenti e secondo le condizioni riportate in tabella:

Reagenti	C <sub>i</sub>	C <sub>f</sub>	V <sub>i</sub>
Buffer (5mM TrisHCl pH 8.3, 50mM KCl)	10X μM	1X μM	5 μl
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1.5 mM	1.5 ml
dNTP	5 mM	0.125 mM	1.25 μl
Primer FW	100 μM	20 μM	0.2 μl
Primer RW	100 μM	20 μM	0.2 μl
Taq Polymerase	5 U/μl	1 U/μl	0.25 μl
DNA	100 ng		2 μl
H <sub>2</sub> O			40.6 μl

Le sequenze dei primers che identificano i polimorfismi in studio sono riportati in tabella:

GENE	rs	Forward sequence	Reverse sequence
GRM3	2228595		
GRM3	6465084		
GRM3	1989796		
GRM3	274622		
GRM3	1468412		
DRD2	1799732		
DRD2	6277		

Il processo d'amplificazione è reso automatico mediante l'uso di un termociclatore la cui temperatura e i tempi possono essere variati secondo le caratteristiche degli ampliconi specifici.

In una prima fase il DNA è incubato a 95 °C per 3 minuti, in modo da causare la denaturazione dei due filamenti, così da rendere disponibili i siti d'ibridazione per i primers.

Nella seconda fase si ha l'annealing o ibridazione dei primers alla sequenza target, portando la miscela di reazione ad una temperatura inferiore rispetto a quella di denaturazione, detta T<sub>m</sub> (Temperatura di melting), che dipende dalla composizione in basi dell'oligonucleotide.

La T<sub>m</sub> si calcola con la seguente formula:  $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$  dove

(A+T) = somma del numero di adenine e timine presenti nella sequenza del primer;

(G+C) = somma del numero di guanina e citosina presenti nella sequenza del primer. Tale temperatura può influenzare la specificità della reazione, nel senso che temperature di annealing basse favoriscono la formazione di aspecifici, mentre temperature molto alte rendono selettiva la reazione di ibridazione primer-stampo.

La terza fase è quella di elongazione, che avviene nel nostro caso a 72° per 1 minuto, in cui si ha la replicazione del frammento in presenza dei deossinucleotiditri-fosfato (dNTP) e della DNA polimerasi che determina l'allungamento dei primers in direzione 5'→3'. Il prodotto che si ottiene dopo il primo ciclo è di lunghezza indeterminata ed è definito long product. Nei cicli successivi i prodotti che si accumulano derivano dall'amplificazione di frammenti a loro volta amplificati nei cicli precedenti e non dalla sequenza stampo. Tali prodotti sono frammenti di DNA che terminano con le sequenze specifiche dei primers utilizzati e sono definiti short-product. Nella fase d'allungamento è utilizzata una Taq polimerasi, che funziona ad una temperatura ottimale intorno a 70-75°C ed è termostabile; questo gli permette di resistere alle alte temperature imposte dalla denaturazione con il vantaggio di non doverla aggiungere ad ogni ciclo. Inoltre, tale enzima conserva un'attività esonucleasica 5'→3' mentre manca di quella 3'→5'.

Il prodotto amplificato è stato sottoposto ad analisi elettroforetica su gel di agarosio al 2%, e visualizzato mediante l'utilizzo di un intercalante a fluorescenza del DNA (etidio bromuro) e di un transilluminatore a raggi UV.

#### ✓ Sequenziamento diretto per la caratterizzazione molecolare dei polimorfismi

La procedura di sequenziamento è costituita da 4 step:

1. Prima purificazione: costituito dall'eliminazione dei reagenti utilizzati nella reazione di PCR e non consumati;
2. Marcatura: ibridazione del DNA con ddNTP fluorescenti;
3. Seconda purificazione: rimozione degli eccessi di basi non fluorescenti non consumati;
4. Corsa elettroforetica capillare.

## 1. Prima purificazione

I prodotti di PCR sono sottoposti ad un processo di purificazione mediante l'utilizzo di una piastra Millipore (Montage), composta da 96 pozzetti. La piastra presenta sul fondo dei pozzetti una membrana in gel di silice in grado di trattenere il DNA e di far passare gli altri contaminanti di dimensioni ridotte. L'apparato di purificazione è composto da una pompa da vuoto, da una valvola di controllo della pressione, dal supporto per le piastre, dai tubi di collegamento e da una beuta di raccolta delle impurità. Per la prima purificazione si procede con le seguenti fasi:

- 1) Portare il volume di PCR a 100  $\mu$ l con TE 1X (oppure con H<sub>2</sub>O milliQ);
- 2) Pipettare il campione all'interno del pozzetto della piastra;
- 3) Aspirare il volume applicando una depressione di 20 atm fino a completa disidratazione (~8') per permettere il passaggio attraverso le maglie del gel di primers, basi, sali, buffer e dimeri di primers mentre il prodotto di PCR pulito resta nel pozzetto;
- 4) Far adsorbire su carta la condensa creatasi sulla base della piastra;
- 5) Aggiungere 25  $\mu$ l di TE 1X (oppure H<sub>2</sub>O milliQ) all'interno del pozzetto;
- 6) Mettere la piastra ad agitare per 10' a 250 Revs/min sull'apposito Orbital shaker;
- 7) Recuperare il prodotto purificato e quantizzare mediante corsa elettroforetica utilizzando un marcatore a PM e concentrazione nota.

## 2. Marcatura e principio della reazione di Sanger

Consiste nell'ibridazione del DNA con dideoossinucleotidi (ddNTP) marcati mediante fluorofori, ognuno diverso per ciascuna base. Questa tecnica prevede l'uso di uno stampo di DNA a singola elica, un solo primer (Forward e Reverse), una DNA polimerasi, deossi (dNTP) e dideoossinucleotidi trifosfati. La doppia elica di DNA è denaturata per consentire al primer di ibridarsi alla regione da sequenziare. La polimerasi utilizzando il primer come innesco della reazione incorpora i dNTP o i ddNTP complementari, secondo un principio di competizione. Ogni qualvolta l'enzima inserisce il ddNTP, essendo questo privo del gruppo 3'OH, provoca uno

stop della reazione di polimerizzazione. Il rapporto di concentrazione di ddNTP e dNTP è tale che l'enzima al termine della reazione produce una serie di frammenti che differiscono, uno dall'altro, di un solo nucleotide in 3' e tutti contengono il primer all'estremità 5'. I ddNTP sono marcati mediante un fluoroforo, la rodamina, molecola che produce uno spettro d'emissione caratteristico per ogni ddNTP a cui è legato e che ha la caratteristica di produrre un segnale omogeneo con bassissimo rumore di fondo.

La DNA polimerasi usata nella reazione di sequenziamento è la T7 DNA polimerasi, caratterizzata da:

- elevata processività, che riduce il distacco precoce della polimerasi dal filamento stampo;
- attività esonucleasica 3'→5' bassa o nulla, necessaria per ridurre la capacità di discriminazione tra il dNTP e i suoi analoghi ddNTP;
- attività esonucleasica 5'→3' bassa o nulla, che evita l'inserimento di nucleotidi all'estremità 5' che deve restare invariata.

### 3. Seconda purificazione

Al termine di questa reazione il prodotto ottenuto è sottoposto ad un'ulteriore purificazione per eliminare i dNTP e ddNTP fluorescenti che non sono stati consumati nel processo di marcatura. Per questa seconda purificazione si usano piastre Millipore, simili a quelle della prima, che contengono all'interno dei pozzetti un diverso tipo di resina, la cui composizione è tutelata da brevetto aziendale, specifica per trattenere il prodotto della marcatura. Il protocollo di seconda purificazione prevede di:

- 1) Aggiungere 20 µl di injection solution alla reazione di marcatura e trasferire nei pozzetti della piastra;
- 2) Applicare una depressione di 25 atm fino a completa disidratazione del campione (circa 3' - 4');
- 3) Far adsorbire su carta la condensa creatasi sulla base della piastra;
- 4) Ripetere dal punto 1) al punto 3);



- 5) Aggiungere altri 20  $\mu$ l di injection solution e mettere la piastra ad agitare per 3'-4' a 180 Revs/min sull'apposito Orbital shaker;
- 6) Recuperare i campioni risospesi e trasferirli all'interno dei pozzetti delle piastre per sequenza.

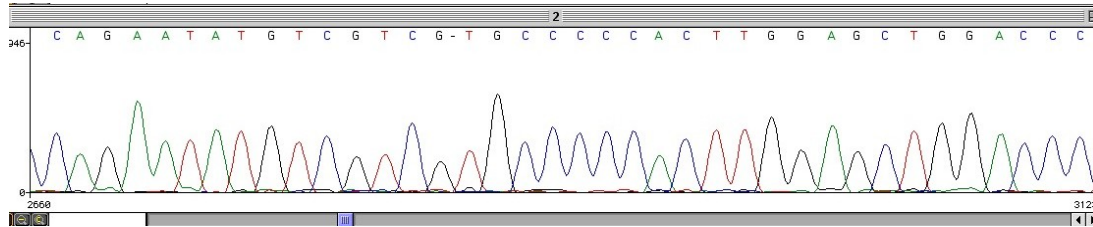
#### 4. Corsa elettroforetica capillare

La metodica del sequenziamento diretto dei campioni è stata eseguita mediante l'uso del sequenziatore automatico ABI 3130 Genetic Analyzer. Con questa metodica di sequenziamento si analizzano 4 campioni di DNA marcati con fluorescenza contemporaneamente. Il secondo purificato ottenuto è caricato all'interno delle piastre da 96 pozzetti per il sequenziatore, previa denaturazione a 95°C per 1 minuto. Il campione (4  $\mu$ l), nel rapporto di 1:4, è risospeso in 12  $\mu$ l di formammide che ha una funzione parzialmente denaturante, evita la formazione di legami o strutture secondarie tra i frammenti da separare mediante l'elettroforesi capillare, lasciando così i frammenti a singolo filamento. La piastra così preparata è collocata nel sequenziatore automatico. I capillari sono riempiti con il gel di poliacrilammide che ha la funzione di separare i frammenti durante la corsa elettroforetica.

Applicando una piccola differenza di potenziale, una quantità di campione sufficiente per l'analisi è automaticamente aspirata all'interno dei capillari. I capillari si immergono quindi all'interno della vaschetta contenente il buffer di corsa 1X ottenuto dalla diluizione della soluzione madre 10X contenente acido etilendiamminotetracetico (EDTA). Questo permette la chiusura del circuito e la creazione di una differenza di potenziale pari a 15kV necessaria per la separazione elettroforetica dei campioni. Il capillare usato ha una lunghezza di 36 cm e permette la lettura in modo attendibile di circa 800 bp. Il capillare di silice è rivestito lungo tutta la sua lunghezza da una guaina. A livello della finestra di lettura è presente un'interruzione della guaina che consente il passaggio di una luce laser a ioni di Argon. Il prodotto di marcatura, a livello della finestra di lettura, è colpito dalla luce laser che eccita il fluoroforo. La fluorescenza emessa è trasformata in un segnale

elettronico da una CCD camera, analizzato ed interpretato da un apposito software e trasformato in un diagramma a picchi o elettroferogramma (Fig.4).

**Fig. 4 Esempio di elettroferogramma.**



L'identificazione di una mutazione è ritenuta affidabile quando l'elettroferogramma è composto da picchi alti e risolti con un rumore di fondo basso. Le sequenze ottenute sono analizzate mediante il software Navigator che permette l'allineamento multiplo delle sequenze aumentando sensibilmente la velocità di analisi e consentendo un confronto diretto tra le sequenze dei diversi campioni in esame.

### ***Analisi statistica***

L'elaborazione dei dati è avvenuta mediante analisi statistica con software Stastical Package For Social Science (SPSS 10.0 Macintosh), attraverso il test di Mann-Whitney e il test del  $\chi^2$  (per variabili continue e discrete), così da valutare l'eventuale associazione tra componente genetica e risposta al farmaco e dosaggio plasmatico del farmaco e risposta allo stesso. Per tutti i test è stato utilizzato un limite di significatività del 5%.

## RISULTATI

---

### *Caratteristiche del campione*

Il campione consta di 84 pazienti affetti da schizofrenia con un'età media di anni 42 ed una percentuale del genere femminile nella misura del 41.66% (Tab.1). Nel corso dello studio gli 84 pazienti arruolati hanno tutti effettuato le rivalutazioni psicometriche ai tempi T1 e T2. Nel campione non si sono verificate riospedalizzazioni dovute a riacutizzazione sintomatica

Il 84.52 % dei pazienti è single e il 21.43% dei pazienti ha figli mentre il 78.5% risulta non averli.

Il 72,61% dei pazienti non ha un impiego lavorativo, il 14% percepisce una pensione e il 13% ha un regolare impiego.

**Tab.1: Caratteristiche sociodemografiche del campione (N=84)**

Caratteristica	Media $\pm$ dev stand	N (%)
Età	42.16 $\pm$ 12.85	-
Sesso, donne	-	35 (41.66)
uomini	-	49 (58.33)
Stato civile, single	-	71 (84.52)
impegnati	-	13 (15.48)
Impiego, disoccupati	-	61 (72.61)
occupati	-	11 (13.09)
pensionati	-	12 (14.03)
Prole, sì	-	18 (21.43)
no	-	66 (78.57)
Ospedalizzazioni (T0-T2)	-	0 (0%)
Drop-out (T0-T2)	-	0 (0%)

Ogni paziente ha ricevuto una diagnosi anamnestica di Schizofrenia riconfermata all'arruolamento da psichiatri esperti. La media dei punteggi alla PANSS T0 era di 56,88 (morbilità lieve), la media dei punteggi alla BPRS T0 era di 39,72 (morbilità lieve) la media dei punteggi alla CGI era di 3,25 (gravità lieve). Le differenze fra medie delle tre scale psicometriche ai tempi T0- T2 sono: PANSS -7.96 , BPRS – 3.56, CGI -0.47, il che descrive un andamento stabile degli aspetti psicopatologici nel periodo di osservazione (variazioni non statisticamente significative). In tabella 2 sono altresì riportati i valori relativi alle sottoscale NEO e TCI.

Il 4.76% dei pazienti presentava in anamnesi una storia di modesto-lieve abuso di alcool mentre sono stati esclusi pazienti abusatori di altre sostanze psicotrope. Inoltre l'abuso alcoolico rilevato ha carattere lifetime e non attuale (criterio di esclusione). Il 17.85% dei pazienti presentava comorbidità mediche come diabete mellito ed ipertensione arteriosa in specifico trattamento e compenso clinico (tali da non giustificare l'esclusione dallo studio).

**Tab. 2: Caratteristiche clinico - psicometriche del campione all'arruolamento (N=84)**

Caratteristica	Media ± dev stand	N (%)
Diagnosi, Schizofrenia	-	84 (100)
PANSS- punteggio Totale (T0)	56.88±25.93	-
BPRS- punteggio Totale (T0)	39.72±13.71	-
CGI- punteggio Totale (T0)	3.25±1.01	-
PANSS- punteggio Totale (T1)	50.57±19.53	-
BPRS- punteggio Totale (T1)	36.89±13.53	-
CGI- punteggio Totale (T1)	2.86±0.84	-
PANSS- punteggio Totale (T2)	48.92±20.09	-
BPRS- punteggio Totale (T2)	36.16±13.66	-
CGI- punteggio Totale (T2)	2.78±0.86	-
TCI- SD	23.41±6.54	-
TCI- C	30.00±1.00	-
TCI-ST	24.25±5.23	-
TCI- NS	24.42±6.63	-
TCI- HA	25.92±5.02	-
TCI- RD	16.11±1.53	-
TCI- P	22.00±6.40	-
NEO- N	30.48±10.75	-
NEO- E	22.51±10.00	-
NEO- O	23.91±6.84	-
NEO- A	30.00±6.85	-
NEO- C	26.45±10.72	-



**Tabella 4: Caratteristiche farmacologiche del campione (N=84)**

<b>Caratteristica</b>	<b>Media <math>\pm</math> dev stand</b>	<b>N (%)</b>
<b>Long Acting, Paliperidone Pal.</b>	-	48 (57.14)
<b>Risperidone RP</b>	-	16 (19.04)
<b>Aripiprazolo LAI</b>	-	13 (15.47)
<b>Olanzapina Pam.</b>	-	7 (12.96)
<b>Altri psicofarmaci (eccetto benzodiazepine)</b>	-	0 (0.00)
<b>Altre terapie mediche</b>		15 (17.85)
<b>Eff. Collaterali, sì</b>	-	33 (39.28)
<b>no</b>	-	51 (60.72)

Quanto alla tipologia di antipsicotico long-acting praticato (Tab.4), il 57.14% dei pazienti era in terapia con Paliperidone Palmitato, il 19.04% dei pazienti con Risperidone a rilascio prolungato, il 15.47% dei pazienti con Aripiprazolo a rilascio prolungato, il 12.96% con Olanzapina Pamoato. La scelta delle terapie long-acting è stata motivata da preferenze cliniche e l'arruolamento casuale secondo progressiva disponibilità dei pazienti che soddisfano i criteri. I pazienti non assumevano terapie concomitanti, eccezion fatta per benzodiazepine a scopo ansiolitico o ipnoinducente. Il 17.85% assumeva terapie mediche per le comorbidità sopra descritte con buon compenso clinico delle stesse.

Il 60,8% dei pazienti non aveva riportato alcun effetto collaterale mentre il 39,8% dei pazienti riferiva effetti collaterali di lieve-media entità ( astenia, disfunzione sessuale, tremori, rallentamento psicomotorio i più frequenti).

## Analisi genotipica

La tabella 5 illustra la distribuzione delle frequenze genotipiche dei polimorfismi indagati all'interno del campione, distinte, in particolare, per tipo di gene, di polimorfismo, come da numero identificativo, e di genotipo risultante all'analisi genotipica. I pazienti presentavano frequenze genotipiche distribuite in maniera non uniforme per ogni tipologia di gene studiato.

**Tabella 5: Caratteristiche genetiche del campione (N=84)**

Caratteristica		Media $\pm$ dev stand	N (%)	
<b>Gene</b>	<b>SNP</b>	<b>Genotipo</b>		
<b>Polimorfismi recettore glutammatergico</b>				
<b>GRM3</b>				
<b>rs6465084</b>				
		A	-	52(61.90)
		AG	-	30(35.71)
		G	-	2(2.39)
<b>rs1989796</b>				
		C	-	15(17.85)
		T	-	17(20.23)
		TC	-	52(61.92)
<b>rs274622</b>				
		CT	-	40(47.61)
		C	-	10(11.90)
		T	-	34(40.49)
<b>rs1468412</b>				
		A	-	48(57.14)
		AT	-	29(34.52)
		T	-	7(8.34)
<b>Polimorfismi recettore dopaminergico</b>				
<b>DRD2</b>	<b>rs1799732</b>			
		Inserimento C in OMO		80(95.23)
		Inserimento C in ETERO		4(4.77)
<b>rs6277</b>				
		C	-	15(17.85)
		CT	-	45(53.57)
		T	-	24(28.58)

### *Dosaggio dei livelli plasmatici*

La tabella 6 illustra i livelli plasmatici medi degli antipsicotici, distinti per tipologia. I dosaggi presentano una significativa variabilità interna, a dimostrarlo la numerosità delle deviazioni standard.

**Tabella 6: Livelli plasmatici degli antipsicotici long-acting dei pazienti (N=84)**

	Media ± dev stand	
<b>Livelli plasmatici (ng/ml)</b>		
<b>Paliperidone</b>	50.49± 59.61	-
<b>Risperidone</b>	45.07±48.58	-
<b>Olanzapina</b>	48.40±52.09	-
<b>Aripiprazolo</b>	64.15±73.19	-

Abbiamo quindi studiato, tramite un modello di regressione lineare, l'associazione fra punteggi ottenuti dai pazienti alle scale psicometriche e livelli plasmatici di Paliperidone palmitato (Tab 7).

Non sono emerse associazioni statisticamente significative fra livelli plasmatici delle molecole attive e i punteggi alla PANSS, BPRS, CGI ai tempi T0-T1-T2.

**Tabella 7: Regressione lineare fra livelli plasmatici e scale psicometriche (N=84)**

	Livelli Ematici <i>p-value</i>
PANSS T0	0.241
BPRS T0	0.475
CGI T0	0.896
PANSS T1	0.133
BPRS T1	0.472
CGI T1	0.717
PANSS T2	0.174
BPRS T2	0.452
CGI T2	0.501



### *Distribuzione dei parametri clinici, metabolici e genetici per farmaco utilizzato*

Lo studio, tramite test Anova, dei parametri clinici, metabolici e genetici, in relazione alle diverse classi di antipsicotici long-acting (Tab.8), ha permesso di evidenziare delle correlazioni significative fra punteggi alla PANSS, BPRS, CGI e tipologia di farmaco assunto dai pazienti. In particolare, i pazienti in terapia con Risperidone a rilascio prolungato, presentavano punteggi significativamente più elevati alle scale PANSS, BPRS e CGI nei tre tempi, ciò a testimoniare verosimilmente la scelta da parte del clinico di questa tipologia di antipsicotico per pazienti che riportano maggiori livelli di psicopatologia.

Per quanto attiene i parametri metabolici, è significativa l'associazione fra terapia con Paliperidone e maggiori valori di Circonferenza Vita e BMI. I valori di prolattinemia invece sono più elevati fra i pazienti in terapia con Risperidone, come atteso secondo i dati di esperienza clinica e di letteratura.

Non emergevano invece associazioni statisticamente significative fra gli altri parametri cardiometabolici e tipologia di antipsicotico long-acting praticato. Abbiamo infine osservato una disomogeneità di distribuzione delle frequenze genotipiche dei polimorfismi studiati fra le classi farmacologiche: ciò è ovviamente giustificato dal fatto che la scelta del farmaco è avvenuta secondo criteri clinici e l'acquisizione del profilo genetico è avvenuta secondariamente.

**Tabella 8: Distribuzione parametri per classe di farmaco**

Caratteristica	Paliperidone (n=48)	Risperidone (n=16)	Olanzapina (N=7)	Aripiprazolo (n=13)	p-value
Età	43.02±14.06	43.68±1.17	38.42±10.40	39.15±11.60	0.635
Sesso (M)	30	11	3	5	0.277
PANSS 0	53.75±17.60	76.50±42.35*	43.42 ±16.96	51.53±18.99	<b>0.0048</b>
BPRS 0	38.50±11.21	48.68±18.11*	30.14±7.44	38.38±14.20	<b>0.010</b>
CGI 0	3.10±0.92	3.75±1.29	3.14±0.90	3.23±0.92	0.176
PANSS 1	48.06±13.65	67.68±29.48*	36.42±12.55	46.38±13.84	<b>0.0003</b>
BPRS 1	35.75±9.88	46.31±20.17	26.28±7.76	35.23±12.39	<b>0.0042</b>
CGI 1	2.70±0.74	3.31±1.13*	2.57±0.53	3.07±0.76	<b>0.048</b>
PANSS 2	45.77±13.32	66.25±32.05*	35.71±12.12	46.38±13.84	<b>0.0005</b>
BPRS 2	34.62±9.26	45.87±21.50*	26.28±7.76	35.23±12.39	<b>0.0045</b>
CGI 2	2.62±0.78	3.18±1.10*	2.42±0.53	3.07±0.76	<b>0.047</b>
Peso corporeo (kg)	84.91±16.57	83.12±22.82	69.57±18.83	74.61±10.77	0.071

QTcB (msec)	410.13±28.53	419.06±30.46	423.28±19.13	411.53±18.29	0.511
Circonferenza Vita (cm)	105.66±15.15*	101.62±19.08	91.00±17.02	94.62±10.45	<b>0.034</b>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	29.67±6.05*	28.66±6.99	23.91±4.24	25.33±2.89	<b>0.021</b>
Prolattina (ng/ml)	48.76±40.10	52.75±37.51*	28.44±31.31	19.18±14.50	<b>0.033</b>
Colesterolo totale (mg/dl)	191.66±35.81	180.62±30.97	218.85±23.36	187.23±45.92	0.136
HDL(mg/dl)	47.54±12.66	46.50±11.81	51.28±18.98	50.15±9.22	0.769
LDL (mg/dl)	123.72±34.87	117.50±26.01	143.28±29.56	118.23±41.14	0.372
Trigliceridi (mg/dl)	152.51±76.11	132.43±62.44	166.71±128.93	130.52±93.12	0.647
TSH (ng/dl)	2.49±1.86	2.10±1.35	1.84±1.05	2.43±1.94	0.741
Emoglobina Glicata (%)	5.93±0.84	5.67±0.72	5.75±0.56	5.80±0.79	0.688
<b>Polimorfismi Glutammato</b>					
<b>GRM3</b>					
<b>rs6465084 (1)</b>					
A	29	10	5	8	0.930
AG	18	5	2	5	
G	1	1	0	0	
<b>rs1989796 (2)</b>					
C	10	2	2	1	0.256
T	13	1	0	3	
TC	25	13	5	9	
<b>rs274622 (3)</b>					
CT	22	10	3	5	0.556
C	8	1	0	1	
T	18	15	4	7	
<b>rs1468412 (4)</b>					
A	26	8	7	7	0.417
AT	18	6	0	5	
T	4	2	0	1	
<b>Polimorfismi Dopamina</b>					
<b>DRD2 rs1799732</b>					
C in OMO	46	15	7	12	0.870
C in ETERO	2	1	0	1	
<b>rs6277</b>					
C	12	0	0	3	0.108
CT	23	9	4	9	
T	13	7	3	1	

In tabella 9 vengono riportati i risultati delle analisi bivariante condotte fra i punteggi ottenuti alle scale nei tre tempi, le caratteristiche personologiche e i polimorfismi studiati. Il polimorfismo rs274622 del recettore glutammatergico è associato significativamente alla riduzione nei tre tempi dei punteggi PANSS (-7.96) e BPRS (-3.56), quindi sembra predire un lieve miglioramento dei sintomi nel tempo. Inoltre correla significativamente con i tratti di auto-direzionalità descritti al TCI. Il polimorfismo rs1468412 del GRM3 è associato a tratti di amicalità (NEO) come anche il polimorfismo rs6277 del recettore DRD2 predice una apertura personologica all'esperienza.

**Tab.9: Correlazioni scale psicometriche e polimorfismi (p-values)**

	PANSS (T 0,1,2)	BPRS (T 0,1,2)	CGI (T 0,1,2)	TCI	NEO
<b>Polimorfismi Glutammato</b>					
<b>GRM3</b>					
rs6465084	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
rs1989796	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
rs274622	PANSS 1: 0.045 PANSS2: 0.035	BPRS1: 0.030 BPRS2:0.023	n.s.	TCI SD: 0.0370	n.s.
rs1468412	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	NEO A: 0.0228
<b>Polimorfismi Dopamina</b>					
<b>DRD2</b>					
rs1799732	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
rs6277	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	NEO O: 0.0086

In tabella 10 si può notare come il polimorfismo rs1468412 del GRM3 è associato con livelli più elevati di circonferenza vita e grassi nel sangue che contribuiscono a loro volta ad accrescere il grasso viscerale responsabile dell'aumento circonferenza vita.

**Tab. 10: Correlazioni fra polimorfismi recettoriali e variabili cliniche**

polimorfismo	GRM3				DRD2	
	rs6465084	rs1989796	rs274622	rs1468412	rs1799732	rs6277
Sesso	0.4122	0.206	0.526	0.736	0.729	0.847
Livelli plasmatici di farmaco	0.546	0.657	0.558	0.985	0.662	0.467
Peso corporeo (kg)	0.430	0.677	0.554	0.117	0.379	0.583
QTcB (msec)	0.348	<b>0.028</b>	0.106	0.253	0.954	0.780
Circonferenza Vita (cm)	0.446	0.196	0.139	<b>0.044</b>	0.136	0.136
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	0.795	0.946	0.294	0.309	0.259	0.177
Prolattina (ng/ml)	0.060	0.640	0.129	0.333	0.542	0.624
Emoglobina glicata (%)	0.428	0.840	0.786	0.304	0.272	0.708
Colesterolo totale (mg/dl)	0.244	0.185	0.605	<b>0.022</b>	0.631	0.957
Trigliceridi (mg/dl)	0.754	0.256	0.736	<b>0.0693</b>	0.349	0.834

Infine dalle analisi delle relazioni fra livelli plasmatici e caratteristiche metaboliche del campione si apprende, come atteso dalla letteratura, che i livelli di prolattinemia risentono significativamente dell'accrescersi dei dosaggi plasmatici del farmaco praticato, essendo l'iperprolattinemia un effetto collaterale dose-dipendente.

**Tab. 11 Regressione semplice fra caratteristiche metaboliche e livelli plasmatici dei farmaci**

Caratteristica metabolica	Livelli plasmatici farmaco (p-values)
Peso corporeo (kg)	0.204
QTcB (msec)	0.568
Circonferenza Vita (cm)	0.436
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	0.245
Prolattina (ng/ml)	<b>0.040</b>
Emoglobina glicata (%)	0.688
Colesterolo totale (mg/dl)	0.498
HDL(mg/dl)	0.904
LDL (mg/dl)	0.416
Trigliceridi (mg/dl)	0.404
TSH (ng/dl)	0.973

## DISCUSSIONE

---

Le analisi condotte su un numero ancora ristretto di pazienti evidenziano una correlazione fra il polimorfismo glutammatergico rs274622 e miglioramento clinico (seppur modesto nell'ambito di un decorso stabile di malattia) misurato ai tre tempi T0-T1-T2 con le scale PANSS e BPRS, e, quindi, verosimilmente con la frequenza genotipica CT (frequenza allelica prevalente nel campione per questo polimorfismo). Anche i dati presenti in letteratura e sovraesposti, inerenti il polimorfismo del recettore glutammatergico rs274622, descrivono un'associazione di tale polimorfismo con miglioramento della sintomatologia negativa, in pazienti trattati prevalentemente con Risperidone ed Olanzapina per un periodo di sei settimane [32]. Lo stesso polimorfismo sembra correlare con aspetti personologici di auto direzionalità sebbene non sia disponibile in letteratura tale dato. I polimorfismi glutammatergico rs 1468412 e rs6277 della dopamina correlano invece con aspetti personologici di amicalità e apertura all'esperienza. Tali dati possono suggerire un coinvolgimento del sistema glutammatergico e dopaminergico in aspetti che riguardano la predisposizione alla auto- etero direzionalità come pure alla estroversione [56][57].

I pazienti con punteggi più elevati e che, pertanto, presentavano condizioni cliniche peggiori, erano i pazienti in terapia con Risperidone a rilascio prolungato, a seguire coloro che erano in terapia con Paliperidone Palmitato, Aripiprazolo a rilascio prolungato ed Olanzapina Pamoato. Questo risultato potrebbe descrivere una tendenza del clinico alla scelta del Risperidone a rilascio prolungato per tipologie di pazienti maggiormente sintomatici sul piano clinico.

Per quanto attiene i dati che riguardano la tollerabilità metabolica, è sicuramente atteso il dato che correla i livelli di prolattina ai livelli crescenti di livelli plasmatici del farmaco, essendo l'iperprolattinemia un effetto jatrogeno dose- dipendente. Meritevole di conferme è il dato interessante che correla il polimorfismo GRM3 rs

1468412 con livelli maggiori di grassi nel torrente ematico e di grasso viscerale comportante un aumento della circonferenza vita.

## **LIMITI DELLO STUDIO**

---

Elemento di debolezza del presente studio è sicuramente rappresentato dalla grandezza del campione attuale (n=84). In questo caso la possibilità di generalizzare quindi i dati statistici riscontrati è risultata ridotta a causa del numero ancora esiguo di partecipanti allo studio e della ulteriore suddivisione, esistente nel campione, per tipologia di antipsicotico long-acting. Altro limite evidenziato, è rappresentato dalla durata dell'osservazione (sei mesi). Inoltre sarebbe utile implementare l'analisi genotipica considerando i target farmacodinamici del sistema serotoninergico, avendo le terapie antipsicotiche di ultima generazione una azione combinata sui recettori della dopamina e della serotonina.

## CONCLUSIONI

---

Il nostro studio, pur tenendo conto della esiguità dei dati attualmente disponibili e delle difficoltà metodologiche sopra esposte, ha evidenziato delle iniziali significatività che permettono di correlare la risposta alle terapie antipsicotiche long-acting alla variabilità genetica individuale. Questi dati preliminari sembrerebbero confermare, inoltre, il coinvolgimento del sistema glutammatergico nella risposta farmacologica individuale come da recenti ipotesi formulate in ambito neuroscientifico.

## *Bibliografia*

1. Goodman & Gilman: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11th edition, 2006.
2. Youssef H, Lyster G, Youssef F, Familial psychosis and vulnerability to tardive dyskinesia, *Int Clin Psychopharmacol* 1989, 4:323–328.
3. Gebhardt S, Theisen FM, Haberhausen M, Heinzl-Gutenbrunner M, Wehmeier PM, Krieg JC et al, Body weight gain induced by atypical antipsychotics: an extension of the monozygotic twin and sib pair study, *J Clin Pharm Ther* 2010 35:207–211.
4. Jennie G. Pouget and Daniel J. Müller Pharmacogenetics of Antipsychotic Treatment in Schizophrenia Qing Yan (ed.), *Pharmacogenomics in Drug Discovery and Development, Methods in Molecular Biology*, vol. 1175, DOI 10.1007/978-1-4939-0956-8\_14, © Springer Science+Business Media New York 2014.
5. Malhotra AK, Murphy GM Jr, Kennedy JL, Pharmacogenetics of psychotropic drug response, *Am J Psychiatry* 2004;161(5):780–96.
6. Bishop JR, Ellingrod VL. Neuropsychiatric pharmacogenetics: moving toward a comprehensive understanding of predicting risks and response, *Pharmacogenomics* 2004;5(5):463–77.
7. Meltzer HY. The role of serotonin in antipsychotic drug action. *Neuropsychopharmacology* 1999;21(Suppl 2):106–15,
8. Foster et al, Pharmacogenetics and Schizophrenia, *Clin Lab Med* 30 (2010) 975–993 doi:10.1016/j.cll.2010.07.010.
9. Itokawa M, Toru M, Ito K, et al, Sequestration of the short and long isoforms of dopamine D2 receptors expressed in Chinese hamster ovary cells, *Mol Pharmacol* 1996;49(3):560–6.
10. Ikeda M, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, et al, Variants of dopamine and serotonin candidate genes as predictors of response to risperidone treatment in first-episode schizophrenia, *Pharmacogenomics* 2008 Oct; 9 (10): 1437-43.
11. Kwon JS, Kim E, Kang DH, et al, Taq1A polymorphism in the dopamine D2 receptor gene as a predictor of clinical response to aripiprazole, *Eur Neuropsychopharmacol* 2008 Dec; 18 (12): 897-907.
12. Shen YC, Chen SF, Chen CH, et al, Effects of DRD2/ANKK1 gene variations and clinical factors on aripiprazole efficacy in schizophrenic patients, *J Psychiatr Res* 2009 Mar; 43 (6): 600-6.
13. Chen SF, Shen YC, Chen CH, Effects of the DRD3 Ser9Gly polymorphism on aripiprazole efficacy in schizophrenic patients as modified by clinical factors, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2009 Apr 30; 33 (3): 470-4.
14. Reynolds GP, Yao Z, Zhang X, et al, Pharmacogenetics of treatment in first episode schizophrenia: D3 and 5-HT2C receptor polymorphisms separately associate with positive and negative symptom response, *Eur Neuropsychopharmacol* 2005;15(2):143–51. 23.



15. Schafer M, Rujescu D, Giegling I, et al, Association of short-term response to haloperidol treatment with a polymorphism in the dopamine D(2) receptor gene. *Am J Psychiatry* 2001;158(5):802–4.
16. Dubertret C, Gouya L, Hanoun N, et al. The 30 region of the DRD2 gene is involved in genetic susceptibility to schizophrenia. *Schizophr Res* 2004;67(1):75–85.
17. Suzuki A, Kondo T, Mihara K, et al, The -141C Ins/Del polymorphism in the dopamine D2 receptor gene promoter region is associated with anxiolytic and antidepressive effects during treatment with dopamine antagonists in schizophrenic patients, *Pharmacogenetics* 2001 Aug;11 (6):545-50.
18. Dahmen N, Muller MJ, Germeyer S, et al, Genetic polymorphisms of the dopamine D2 and D3 receptor and neuroleptic drug effects in schizophrenic patients, *Schizophr Res* 2001 Apr 15; 49 (1-2): 223-5.
19. Itokawa M, Toru M, Ito K, et al, Sequestration of the short and long isoforms of dopamine D2 receptors expressed in Chinese hamster ovary cells, *Mol Pharmacol* 1996;49(3):560–6.
20. Ikeda M, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, et al, Variants of dopamine and serotonin candidate genes as predictors of response to risperidone treatment in first-episode schizophrenia, *Pharmacogenomics* 2008 Oct; 9 (10): 1437-43.
21. Xing Q, Qian X, Li H, et al, The relationship between the therapeutic response to risperidone and the dopamine D2 receptor polymorphism in Chinese schizophrenia patients, *Int J Neuropsychopharmacol* 2007 Oct; 10 (5): 631-7.
22. Lencz T, Robinson D, Xu K, et al, DRD2 promoter region as a predictor of sustained response to antipsychotic medication in first episode schizophrenia patients, *Am J Psychiatry* 2006;163(3):529–31.
23. Kay SR, Fiszbein A, Opler LA. The positive and negative syndrome scale (PANSS) for schizophrenia, *Schizophr Bull* 1987;13(2):261–76.
24. Parsons M, Mata I, Beperet M, et al, Association of a D2 receptor gene polymorphism with schizophrenia and treatment response in the Basque and Spanish populations, *Am J Med Genet* 2004;130:164.
25. Yamanouchi Y, Iwata N, Suzuki T, et al, Effect of DRD2, 5-HT2A, and COMT genes on antipsychotic response to risperidone. *Pharmacogenomics J* 2003; 3(6):356–61.
26. Lane HY, Lee CC, Chang YC, et al, Effects of dopamine D2 receptor Ser311Cys polymorphism and clinical factors on risperidone efficacy for positive and negative symptoms and social function. *Int J Neuropsychopharmacol* 2004;7(4): 461–70.
27. Itokawa M, Arinami T, Toru M, Advanced research on dopamine signaling to develop drugs for the treatment of mental disorders: Ser311Cys polymorphisms of the dopamine D2-receptor gene and schizophrenia, *J Pharmacol Sci* 2010 Sep 16; 114 (1): 1-5.
28. Meltzer HY. The role of serotonin in antipsychotic drug action. *Neuropsychopharmacology* 1999;21(Suppl 2):106–15.

29. Lencz T, Robinson D, Xu K, et al, DRD2 promoter region as a predictor of sustained response to antipsychotic medication in first episode schizophrenia patients, *Am J Psychiatry* 2006;163(3):529–31.
30. Staddon S, Arranz MJ, Mancama D, et al, Clinical applications of pharmacogenetics in psychiatry, *Psychopharmacology (Berl)* 2002 Jun; 162 (1): 18-23.
31. Adams DH, Close S, Farnen M, et al, Dopamine receptor D3 genotype association with greater acute positive symptom remission with olanzapine therapy in predominately caucasian patients with chronic schizophrenia or schizoaffective disorder, *Hum. Psychopharmacol.* 2008 Mar 4; 23 (4): 267-74.
32. Thomas P, Srivastava V, Singh A, et al, Correlates of response to olanzapine in a North Indian schizophrenia sample, *Psychiatry Res* 2008 Dec 15; 161 (3): 275-83.
33. Bishop JR, Ellingrod VL, Moline J, Miller D., Association between the polymorphic GRM3 gene and negative symptom improvement during olanzapine treatment, *Schizophr Res* 2005; 77: 253–260.
34. Lane HY, Hsu SK, Liu YC, et al, Dopamine D3 receptor Ser9Gly polymorphism and risperidone response, *J Clin Psychopharmacol* 2005 Feb; 25 (1): 6-11.
35. Kapur S, Seeman P, Does fast dissociation from the dopamine d(2) receptor explain the action of atypical antipsychotics? A new hypothesis. *Am J Psychiatry* 2001;158(3):360.
36. Jafari S, Fernandez-Enright F, Huang XF , Structural contributions of antipsychotic drugs to their therapeutic profiles and metabolic side effects. *J Neurochem* 2012, 120:371–384.
37. Lane HY, Guo SC, Hwang TJ, et al. Effects of olanzapine 9-hydroxyrisperidone after administration of the long-acting plasma concentrations on depressive symptoms in schizophrenia injectable form of risperidone: a pilot study. *J Clin Psychopharmacol* 2002; 22: 530-2.
38. Arranz MJ, de Leon J, Pharmacogenetics and pharmacogenomics of schizophrenia: a review of last decade of research, *Mol Psychiatry* 2007 Jun 5; 12 (8): 707-47.
39. Hamdani N, Bonniere M, Ades J, et al, Negative symptoms of schizophrenia could explain discrepant data on the association between the 5-HT2A receptor gene and response to antipsychotics, *Neurosci Lett* 2005 Mar 22; 377 (1): 69-74.
40. Benmessaoud D, Hamdani N, Boni C, et al, Excess of transmission of the G allele of the -1438A/G polymorphism of the 5-HT2A receptor gene in patients with schizophrenia responsive to antipsychotics, *BMC Psychiatry* 2008; 8: 40.
41. Ellingrod VL, Lund BC, Miller D, et al, 5-HT2A receptor promoter polymorphism, -1438G/A and negative symptom response to olanzapine in schizophrenia, *Psychopharmacol Bull* 2003;37(2):109–12.
42. Wang L, Fang C, Zhang A, et al, The –1019 C/G polymorphism of the 5-HT(1)A receptor gene is associated with negative symptom response to risperidone treatment in schizophrenia patients, *J Psychopharmacol* 2008 Nov; 22 (8): 904-9.

43. Fijal BA, Candidate gene association analysis of response to risperidone in African American and white patients with Schizophrenia, *Pharmacogenomics J*. 2009.
44. Rossi F. et al, *Farmacologia: principi di base e applicazioni terapeutiche*, 2° edizione, 2011.
45. Davies MA, Setola V, Strachan RT, et al, Pharmacologic analysis of nonsynonymous coding h5-HT2A SNPs reveals alterations in atypical antipsychotics and agonist efficacies, *Pharmacogenomics J* 2006;6:42–51.
46. Buur-Rasmussen B, Brosen K. Cytochrome P450 and therapeutic drug monitoring with respect to clozapine, *Eur Neuropsychopharmacol* 1999; 9: 453-9.
47. Prior TI, Chue PS, Tibbo P, et al, Drug metabolism and atypical antipsychotics, *Eur Neuropsychopharmacol* 1999; 9: 301-9.
48. Massimo C. Mauri et al, Clinical Pharmacokinetics of Atypical Antipsychotics, a Critical Review of the Relationship Between Plasma Concentrations and Clinical Response *Clinical, Pharmacokinetics* May 2007, Volume 46, Issue 5, pp 359-388
49. Lopez LV, Kane JM, Plasma levels of second-generation antipsychotics and clinical response in acute psychosis: a review of the literature, *Schizophr Res*.2013 Jul;147(2-3):368-74. doi: 10.1016/j.schres.2013.04.002. Epub 2013 May 22, 2016.
50. Scordo MG, Spina E, Facciola G, Avenoso A, Johansson I, Dahl ML, Cytochrome P450 2D6 genotype and steady state plasma levels of risperidone and 9-hydroxyrisperidone, *Psychopharmacology (Berl)*. 1999 Dec;147(3):300-5.
51. Riedel M, Schwarz MJ, Strassing M, et al, Risperidone plasma levels, clinical response and side-effects, *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2005; 255: 261-8.
52. Mauri MC, Laini V, Boscati L, et al, Long term treatment of chronic schizophrenia with risperidone: a study with plasma levels, *Eur Psychiatry* 2001; 16: 57-63.
53. Mauri MC, Steinhilber CPC, Marino R, et al, Clinical outcome and olanzapine plasma levels in acute schizophrenia, *Eur Psychiatry* 2005; 20: 55-60.
54. Lane HY, Guo SC, Hwang TJ, et al. Effects of olanzapine 9-hydroxyrisperidone after administration of the long-acting plasma concentrations on depressive symptoms in schizophrenia injectable form of risperidone: a pilot study. *J Clin Psychopharmacol* 2002; 22: 530-2.
55. Perry PJ, Sanger T, Beasley C, Olanzapine plasma concentrations and clinical response in acutely ill schizophrenic patients, receptor occupancy of different doses of quetiapine in schizo-*J Clin Psychopharmacol* 1997; 17: 472-7.
56. Smillie LD, Wacker J. Dopaminergic foundations of personalità and individual differences. *Frontiers Human Neuroscience*, 2014; 8:874.
57. Grimm S, Schubert F, Jaedke M, Gallinat J, Bajbouj M. Prefrontal cortex glutamate and extraversion. *Soc Cogn Affect Neurosci*, 2012; 7(7): 811-818.