

# VERSO LA TERAPIA PERSONALIZZATA: APPROCCIO DIAGNOSTICO FARMACOGENETICO ALLE REAZIONI AVVERSE AL FARMACO

## Introduzione

Le reazioni avverse al farmaco (Adverse Drug Reactions, ADR) rappresentano la più importante causa di morbidità e mortalità in Europa, poiché si manifestano nel 10% dei pazienti, causando fra il 5 e il 10% dei ricoveri in ospedale e si presentano nel 10-20% dei pazienti ospedalizzati. Negli USA si stima che le reazioni avverse al farmaco causino 106.000 morti all'anno e per questo rappresentano la quinta causa di morte (Montanè et al., 2020). In questo contesto si inseriscono gli studi della farmacogenetica forense, la quale si concentra primariamente sulle variazioni genetiche degli enzimi della superfamiglia dei CYP, in particolare del CYP2D6 dal momento che esso è coinvolto nei processi metabolici di circa il 20-30% dei farmaci di suo comune (Van der Leen et al., 2021) e i suoi polimorfismi hanno un impatto su almeno il 50% di essi. Infatti, polimorfismi genetici dei CYP possono causare un aumento o una diminuzione marcata delle concentrazioni plasmatiche del farmaco alterando la velocità metabolica e possono quindi influenzare i risultati terapeutici individuali. A seconda del farmaco, se in forma attiva o da attivare, i fenotipi metabolizzatori ultrarapidi possono rendere il trattamento molto meno efficace, mentre i metabolizzatori lenti e intermedi rispondono in modo inadeguato ai farmaci e possono portare a un effetto tossico più elevato (Yurong et al., 2021). La genetica degli enzimi coinvolti nel metabolismo del farmaco ha un ruolo critico per conoscere le differenze nella risposta al farmaco fra gli individui e quindi prevenire le reazioni avverse. Nella stessa maniera in cui il metabolismo del farmaco è un fattore importante per la medicina personalizzata in ambito clinico, questo può avere una uguale importanza nel determinare la causa di morte o la sua modalità nelle indagini medico-legali. In particolare, nei soggetti deceduti per intossicazione o quando la morte è improvvisa e si sospetta una possibile reazione avversa al farmaco lo studio a livello genomico può essere dirimente.

## Sviluppo del progetto

### Selezione dei campioni biologici

Il DNA genomico è stato estratto da 35 campioni di sangue intero prelevato da altrettanti soggetti deceduti con positività quantitativamente determinata, mediante tecniche cromatografiche accoppiate a spettrometria di massa, a sostanze metabolizzate dal CYP2D6, fra cui antidepressivi, metadone, oppioidi e antipsicotici in poliassunzione e da 36 soggetti deceduti per morte cardiaca improvvisa quale campione di controllo.

### Analisi genomica mediante SNP-chip da 720000 varianti

L'analisi ha previsto lo studio di polimorfismi genetici mediante SNP-chip da 720000 varianti su un campione di controllo comprendente 30 individui deceduti per morte cardiaca improvvisa (campione MCI).

Sono state confrontate le frequenze genetiche del campione con le frequenze genetiche di due dataset di controllo, un dataset costituito da 737 individui italiani (ITA) [Sazzini et al. 2016] e l'altro costituito da 20 individui Toscani (TSI) del progetto 1000 Genomi (1000 Genomes Project Consortium et al. 2015) e 10 Bergamaschi (BERG) del progetto Human Diversity Genome Project (Bergström et al. 2020). In entrambi i casi, a seguito dell'esecuzione dei controlli di qualità su tutti i dataset, è stato effettuato il test del  $\chi^2$  per verificare se le frequenze genetiche di MCI si discostavano significativamente da quelle dei controlli. Sono state anche rilevate varianti presenti in 11 geni CYP 450, che sono coinvolti nel metabolismo dei farmaci, metabolismo del colesterolo e lipidico, e metabolismo ormonale. Tali geni sono: *CYP4B1*, *CYP2S1*, *CYP39A1*, *CYP7B1*, *CYP11B1*, *CYP11B2*, *CYP4F22*, *CYP2A6*, *CYP2A7*, *CYP24A1*, e *CYP4V2*.

## Genotipizzazione mediante sonda Taqman per l'analisi del polimorfismo del gene *CYP2D6*

L'analisi è stata eseguita su 36 campioni di controllo e su 35 campioni di soggetti deceduti risultati positivi a xenobiotici in poli-assunzione.

Per analizzare il polimorfismo del gene *CYP2D6* è stato disegnato un saggio di genotipizzazione mediante sonda TaqMan eseguito tramite lo strumento della Real-Time PCR, che richiede una coppia di primer specifici per l'amplificazione del frammento di DNA target, una polimerasi con un'attività 5'-3' esonucleasica e due sonde specifiche per la regione target, ognuna delle quali legata ad un fluorocromo differente (FAM o VIC) nella terminazione 5' e un Quencer appropriato al 3'. Durante la reazione di PCR, l'attività 5' esonucleasica della polimerasi determina il distacco del fluoroforo dal Quencer solamente se è presente un match perfetto fra la sonda e il suo target sul DNA. Delle sonde che non sono correttamente appaiate al DNA nella regione target sono instabili e non vengono degradate dall'azione 5'-3' esonucleasica della Taq polimerasi per cui non rilasciano fluorescenza (Heissl et al., 2017)

Per il processo di genotipizzazione a cui sono stati sottoposti tutti i campioni, sono state selezionate le dieci varianti maggiormente rilevanti come descritte in letteratura e riportate in Tabella 1:

ALLELE	POSIZIONE SNP	SNP ID	FUNZIONALITÀ
<b>*3</b>	2549 del A	rs35742686	Nessuna funzione
<b>*4</b>	1846 G>A	rs3892097	Nessuna funzione
<b>*6</b>	1707 del T	rs5030655	Nessuna funzione
<b>*9</b>	2615 del AGA	rs5030656	Funzione diminuita
<b>*10</b>	100 C>T	rs1065852	Funzione diminuita
<b>*17</b>	1023 C>T	rs28371706	Funzione diminuita
<b>*59</b>	2850C>T	rs16947	Funzione diminuita
<b>*59</b>	4180G>C	rs1135840	Funzione diminuita
<b>*41</b>	2988 G>A	rs28371725	Funzione diminuita
<b>*59-FT</b>	2939 G>A	rs79292917	Funzione diminuita

Tabella 1: 10 posizioni SNPs testate in saggio TaqMan. Da sx: nome dell'allele, la posizione della variante all'interno del gene *CYP2D6* basata sulla nomenclatura NG\_008376.4, la mutazione SNP così come indicato in PharmVar, il codice identificativo dello SNP e la funzione risultante.

Per l'analisi dei dati grezzi di genotipizzazione e l'interpretazione dei risultati è stato utilizzato il software ThermoFisher Cloud Genotype Application Analysis che consente di creare un progetto con lo scopo di raccogliere insieme i dati grezzi dei diversi esperimenti. Il software mediante un algoritmo è in grado di attribuire il genotipo ai campioni. I risultati sono restituiti sottoforma di uno scatter plot (Allelic discrimination plot) rappresentando graficamente ogni campione come un punto singolo.

Tutti i campioni inoltre sono stati poi sottoposti ad un saggio di TaqMan Copy Number Variations (CNV) con qPCR per indagare e misurare le variazioni del numero di copie del gene. Al termine del saggio i risultati vengono esportati ed analizzati con il software CopyCaller (Applied Biosystems™) che utilizza il metodo comparativo del  $\Delta\Delta C_t$  per calcolare la differenza fra il ciclo soglia del saggio sul target e quello dello standard di riferimento. In seguito, il software effettua una comparazione del valore del  $\Delta C_t$  del campione da testare con un campione che funge da calibratore che contiene un numero di copie della sequenza target.

L'inferenza della fase gametica tramite software Phase v. 2.1 applica il metodo statistico Bayesiano per ricostruire l'aplotipo a partire da dati genetici della popolazione e viene utilizzato per lo studio di SNPs, microsatelliti e anche altri loci multi-allelici, in diverse combinazioni, tenendo conto anche di

eventuali dati mancanti. L'algoritmo parte dividendo i dati di loci consecutivi in segmenti, successivamente calcola una lista di possibili aplotipi all'interno di ciascun segmento, e successivamente combina i singoli segmenti per ottenere una lista di possibili aplotipi e l'ipotesi migliore per ogni coppia di aplotipi attraverso l'intera regione. La divisione in segmenti è causale. Il programma, in seguito, produce diversi file output con i risultati dell'analisi. Uno fra questi, riporta la frequenza stimata di ogni aplotipo e si compone di 4 colonne, di cui la prima contiene un numero associato ad ogni aplotipo, segue una colonna indicante gli aplotipi calcolati, mentre le successive due colonne riportano rispettivamente la frequenza stimata per ogni aplotipo e la rispettiva deviazione standard. Un ulteriore file riporta invece una lista dei più probabili aplotipi per ciascun individuo, accompagnati da un valore numerico indicante la probabilità.

### **Assegnazione del diplotipo, punteggio di Activity Score e relativo fenotipo del gene *CYP2D6***

I risultati dei test genetici forniscono una coppia di aplotipi che insieme formano il diplotipo (un allele materno e uno paterno). L'aplotipo è caratterizzato dalla presenza di una specifica combinazione di SNPs o altre alterazioni di sequenza all'interno del locus del gene *CYP2D6*. In questo studio, l'attribuzione del diplotipo è avvenuta tramite il sito PHARMVAR <https://www.pharmvar.org/gene/CYP2D6>. La combinazione di questi alleli determina il profilo metabolico del soggetto che viene dedotto dal modello dell'Activity Score (AS) introdotto da Gaedigk et al. nel 2008. Attraverso questo sistema, un allele riceve un valore che approssima la sua funzione e la somma dei valori assegnati ad ogni allele va a determinare il valore finale di AS (Gaedigk, 2013). Questo sistema di punteggio facilita la traduzione dei dati altamente complessi del diplotipo del *CYP2D6* nel fenotipo del paziente per guidare la terapia farmacologica ed è al centro di tutte le linee guida del Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC). Quindi, una volta attribuito il valore di AS, le informazioni del genotipo/diplotipo vengono rapidamente tradotte nei 4 fenotipi metabolici convenzionali, ovvero Poor (PM), Intermediate (IM), Extensive (EM) (ad esso ci si riferisce ora come NM) e Ultrarapid (UM) metabolizers (Vedi Tabella 2).

In questo studio, il punteggio relativo all'AS e il conseguente fenotipo è stata effettuata sulla base delle tabelle riportate nel sito PHARMGKB, che segue le raccomandazioni del Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC).

Nella valutazione del punteggio di AS in soggetti in politerapia, bisogna tenere in considerazione che l'assunzione combinata di più farmaci, soprattutto se inibitori dell'enzima, può essere causa di fenomeni di *fenocconversione*. Di conseguenza il punteggio di AS dovrà essere ricalcolato tenendo in considerazione questi fattori. Uno dei metodi più rapidi è quello di effettuare una moltiplicazione del valore di AS per 0 o 0.5 se ci si trova in presenza di un inibitore forte o moderato/debole rispettivamente. Il valore risultante di AS potrà indicare il nuovo fenotipo e mettere così in evidenza una *fenocconversione*. Secondo le raccomandazioni CPIC in presenza di un forte inibitore il valore di AS del *CYP2D6* è convertito a 0, mentre in presenza di un inibitore moderato-debole, l'AS verrà moltiplicato per 0.5, e questo determinerà una modificazione del fenotipo predetto (Cicali et al., 2021) (Tab.2).

Activity Score CYP2D6	Genetic Phenotype	Weak Inhibitor and Moderate Inhibitor	Strong Inhibitor
0	PM	Activity score $\times$ 0.5 = PM	Activity score $\times$ 0 = PM
> 0 < 1.25	IM	Activity score $\times$ 0.5 = IM	Activity score $\times$ 0 = PM
> 1.25 < 2.25	NM	Activity score $\times$ 0.5 = IM	Activity score $\times$ 0 = PM
>2.25	UM	Activity score $\times$ 0.5 = NM	Activity score $\times$ 0 = PM

**Tabella 2:** tabella di conversione del fenotipo del CYP2D6 in presenza di inibitori forti o moderati-deboli.

## RISULTATI

### Analisi del genoma

Sulla casistica dei 30 soggetti deceduti per morte cardiaca improvvisa, in base ad una ricerca effettuata nella Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (<https://www.genome.jp/kegg/>, Kanehisa & Goto 2000) sono stati esaminati 415 geni coinvolti in vari pathways, in cui i pathway metabolici sono quelli col maggior numero di geni (Tabella 3). In particolare, sono stati individuati i pathways arricchiti di questi geni afferenti al funzionamento e a patologie del sistema cardiocircolatorio, al metabolismo dei farmaci e alla dipendenza da droghe.

**Tabella 3**

Pathway	Genes
Metabolic pathways	RDH12, CYP2C9, CYP2E1, CYP2J2, DBH, DPYD, ALDH3A1, FMO3, HAAO, GBE1, ABO, GSTA4, CYP2S1, AOX1, LPC, MGST1, MGST3, NDUFS6, RDH11, PIP4K2A, PTGS1, XYLT1, ALDH8A1, SHMT1, ST3GAL4, MPPE1, SULT1E1, TBXAS1, TYMS, TYR, ALDH5A1, CAT, MGAM
Pathways in cancer	FZD2, GSTA4, APC, IL2RA, IL4, MGST1, MGST3, MLH1, PPARG, PTGER1, PTGER3, RARB, BDKRB2, RXRB, NCOA3, RUNX1T1, NCOA1, FGF18, KEAP1
Pathways of neurodegeneration - multiple disease	AGER, FUS, FZD2, GRIN2A, APC, MAPT, NDUFS6, DCTN4, BDNF, SNCA, CACNA1C, CAT, EIF2AK3
Cell adhesion molecules	CDH4, CDH5, NTNG1, ICOSLG, HLA-B, HLA-C, HLA-DMB, HLA-DOB, HLA-E, HLA-G, ITGA4, SELL, SELP
Herpes simplex virus 1 infection	HLA-B, HLA-C, HLA-DMB, HLA-DOB, HLA-E, HLA-G, ZFP57, ZNF772, SRSF4, ZNF184, EIF2AK3
Calcium signaling pathway	ADRA1B, TPCN2, GNAL, GRIN2A, KDR, MYLK, PTGER1, PTGER3, BDKRB2, CACNA1C, FGF18
Neuroactive ligand-receptor interaction	INSL5, ADRA1B, F2RL1, GRIN2A, S1PR5, PARD3, PTGER1, PTGER3, BDKRB2, THRB
Alzheimer disease	AGER, FZD2, GRIN2A, APC, MAPT, NDUFS6, SNCA, CACNA1C, EIF2AK3

<b>ABC transporters</b>	ABCC4, ABCC2, ABCA1, ABCA4, ABCB5, ABCB4, ABCC8, ABCB11, ABCC3
<b>Human papillomavirus infection</b>	COL1A2, FZD2, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-G, APC, ITGA4, PARD3
<b>Lipid and atherosclerosis</b>	CYP2C9, CYP2J2, AGER, ABCA1, ABCG1, PPARG, RXRB, SELP, EIF2AK3
<b>Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450</b>	CYP2C9, CYP2E1, ALDH3A1, GSTA4, CYP2S1, MGST1, MGST3, SULT2A1
<b>Bile secretion</b>	ABCC4, ABCC2, SLCO1B3, ABCB4, SLCO1A2, SULT2A1, ABCB11, ABCC3
<b>PI3K-Akt signaling pathway</b>	COL1A2, ATF6B, IL2RA, IL4, ITGA4, KDR, BDNF, FGF18
<b>Human cytomegalovirus infection</b>	AKAP13, ATF6B, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-G, PTGER1, PTGER3
<b>Phagosome</b>	HLA-B, HLA-C, HLA-DMB, HLA-DOB, HLA-E, HLA-G, MRC1, MSR1
<b>Regulation of actin cytoskeleton</b>	ABI2, CYFIP1, APC, ITGA4, MYLK, PIP4K2A, BDKRB2, FGF18
<b>Chemical carcinogenesis - receptor activation</b>	ATF6B, GSTA4, ARRB1, MGST1, MGST3, RXRB, CACNA1C, FGF18
<b>Drug metabolism - cytochrome P450</b>	CYP2C9, CYP2E1, ALDH3A1, FMO3, GSTA4, AOX1, MGST1, MGST3
<b>Human T-cell leukemia virus 1 infection</b>	ATF6B, HLA-B, HLA-C, HLA-DMB, HLA-DOB, HLA-E, HLA-G, IL2RA
<b>Serotonergic synapse</b>	CYP2C9, CYP2J2, HTR3C, HTR3D, KCND2, PTGS1, CACNA1C
<b>Allograft rejection</b>	HLA-B, HLA-C, HLA-DMB, HLA-DOB, HLA-E, HLA-G, IL4
<b>Autoimmune thyroid disease</b>	HLA-B, HLA-C, HLA-DMB, HLA-DOB, HLA-E, HLA-G, IL4
<b>Endocytosis</b>	HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-G, IL2RA, ARRB1, PARD3
<b>Chemical carcinogenesis - reactive oxygen species</b>	CYP2E1, GSTA4, MGST1, MGST3, NDUFS6, CAT, KEAP1
<b>Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection</b>	MICA, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-G, MICB
<b>Type I diabetes mellitus</b>	HLA-B, HLA-C, HLA-DMB, HLA-DOB, HLA-E, HLA-G
<b>Viral carcinogenesis</b>	ATF6B, GTF2H1, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-G
<b>Natural killer cell mediated cytotoxicity</b>	MICA, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-G, MICB
<b>Gastric cancer</b>	FZD2, APC, MLH1, RARB, RXRB, FGF18
<b>Chemical carcinogenesis - DNA adducts</b>	CYP2C9, CYP2E1, GSTA4, MGST1, MGST3, SULT2A1
<b>Parkinson disease</b>	GNAL, MAPT, NDUFS6, SNCA, EIF2AK3, KEAP1
<b>Amyotrophic lateral sclerosis</b>	FUS, GRIN2A, NDUFS6, DCTN4, CAT, EIF2AK3

<b>Antigen processing and presentation</b>	HLA-B, HLA-C, HLA-DMB, HLA-DOB, HLA-E, HLA-G
<b>Transcriptional misregulation in cancer</b>	JMJD1C, FUS, PPARG, RXRB, WT1, RUNX1T1
<b>Hepatocellular carcinoma</b>	FZD2, GSTA4, APC, MGST1, MGST3, KEAP1
<b>Viral myocarditis</b>	HLA-B, HLA-C, HLA-DMB, HLA-DOB, HLA-E, HLA-G
<b>MAPK signaling pathway</b>	KDR, ARRB1, MAPT, BDNF, CACNA1C, FGF18
<b>Fluid shear stress and atherosclerosis</b>	CDH5, GSTA4, KDR, MGST1, MGST3, KEAP1
<b>Epstein-Barr virus infection</b>	HLA-B, HLA-C, HLA-DMB, HLA-DOB, HLA-E, HLA-G
<b>Graft-versus-host disease</b>	HLA-B, HLA-C, HLA-DMB, HLA-DOB, HLA-E, HLA-G
<b>Drug metabolism - other enzymes</b>	CYP2E1, DPYD, GSTA4, MGST1, MGST3
<b>Huntington disease</b>	PPARGC1A, NDUFS6, DCTN4, PPARG, BDNF
<b>Leishmaniasis</b>	EEF1A1, HLA-DMB, HLA-DOB, IL4, ITGA4
<b>Hematopoietic cell lineage</b>	HLA-DMB, HLA-DOB, IL2RA, IL4, ITGA4
<b>Nucleocytoplasmic transport</b>	IPO8, EEF1A1, TNPO1, DDX39B, PYM1
<b>Intestinal immune network for IgA production</b>	ICOSLG, HLA-DMB, HLA-DOB, IL4, ITGA4
<b>cGMP-PKG signaling pathway</b>	ATF6B, ADRA1B, MYLK, BDKRB2, CACNA1C
<b>cAMP signaling pathway</b>	ABCC4, GRIN2A, PTGER3, BDNF, CACNA1C
<b>Arachidonic acid metabolism</b>	CYP2C9, CYP2E1, CYP2J2, PTGS1, TBXAS1
<b>Longevity regulating pathway</b>	PPARGC1A, ATF6B, PRKAG2, PPARG, CAT
<b>Breast cancer</b>	FZD2, APC, NCOA3, NCOA1, FGF18
<b>Dopaminergic synapse</b>	ATF6B, GNAL, GRIN2A, ARRB1, CACNA1C
<b>Prion disease</b>	ATF6B, GRIN2A, NDUFS6, CACNA1C, EIF2AK3
<b>Non-alcoholic fatty liver disease</b>	CYP2E1, NDUFS6, PRKAG2, PPARG, EIF2AK3
<b>Th17 cell differentiation</b>	HLA-DMB, HLA-DOB, IL2RA, IL4, RXRB
<b>Platinum drug resistance</b>	ABCC2, GSTA4, MGST1, MGST3, MLH1
<b>Antifolate resistance</b>	ABCC4, ABCC2, SHMT1, TYMS, ABCC3
<b>Retinol metabolism</b>	RDH12, CYP2C9, CYP2S1, AOX1, RDH11
<b>Pathogenic Escherichia coli infection</b>	NLRP4, CYFIP1, MYO10, RPS3
<b>Axon guidance</b>	UNC5B, NTNG1, PARD3, SEMA5A
<b>Thermogenesis</b>	PPARGC1A, NDUFS6, PRKAG2, PPARG
<b>Glutamatergic synapse</b>	SLC17A8, GRIN2A, SLC1A7, CACNA1C
<b>AMPK signaling pathway</b>	PPARGC1A, EEF2K, PRKAG2, PPARG

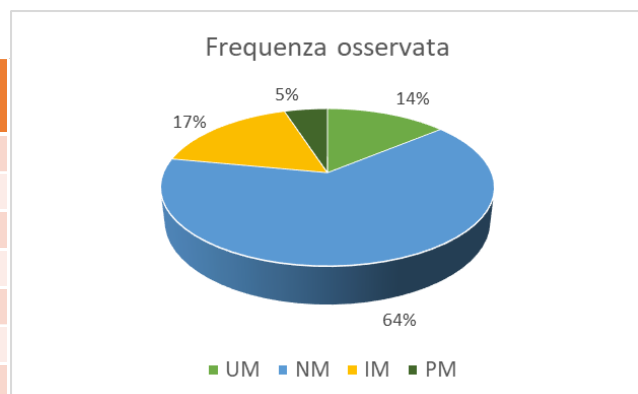
<b>Tyrosine metabolism</b>	DBH, ALDH3A1, AOX1, TYR
<b>Relaxin signaling pathway</b>	INSL5, COL1A2, ATF6B, ARRB1
<b>Oxytocin signaling pathway</b>	EEF2K, MYLK, PRKAG2, CACNA1C
<b>Tryptophan metabolism</b>	HAAO, AOX1, ALDH8A1, CAT
<b>Diabetic cardiomyopathy</b>	COL1A2, AGER, NDUFS6, REN
<b>Cholesterol metabolism</b>	ABCA1, PCSK9, LPC, ABCB11
<b>Ras signaling pathway</b>	GRIN2A, KDR, BDNF, FGF18
<b>Wnt signaling pathway</b>	FZD2, APC, TLE4, CER1
<b>Alcoholism</b>	ATF6B, SLC29A1, GRIN2A, BDNF
<b>Cushing syndrome</b>	ATF6B, FZD2, APC, CACNA1C
<b>Parathyroid hormone synthesis, secretion and action</b>	AKAP13, ATF6B, ARRB1, RXRB
<b>Thyroid hormone signaling pathway</b>	RXRB, THRB, NCOA3, NCOA1
<b>Rap1 signaling pathway</b>	GRIN2A, KDR, PARD3, FGF18
<b>Cellular senescence</b>	HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-G
<b>Th1 and Th2 cell differentiation</b>	HLA-DMB, HLA-DOB, IL2RA, IL4
<b>Biosynthesis of cofactors</b>	RDH12, HAAO, RDH11, SHMT1
<b>Spliceosome</b>	FUS, SRSF4, DDX39B, RBM17
<b>Platelet activation</b>	COL1A2, MYLK, PTGS1, TBXAS1
<b>Human immunodeficiency virus 1 infection</b>	HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-G
<b>Focal adhesion</b>	COL1A2, ITGA4, KDR, MYLK
<b>Apelin signaling pathway</b>	PPARGC1A, MYLK, PRKAG2
<b>Hypertrophic cardiomyopathy</b>	ITGA4, PRKAG2, CACNA1C
<b>Insulin resistance</b>	PPARGC1A, SLC27A3, PRKAG2
<b>Glutathione metabolism</b>	GSTA4, MGST1, MGST3
<b>Retrograde endocannabinoid signaling</b>	SLC17A8, NDUFS6, CACNA1C
<b>Insulin secretion</b>	ATF6B, ABCC8, CACNA1C
<b>Vascular smooth muscle contraction</b>	ADRA1B, MYLK, CACNA1C
<b>Inflammatory mediator regulation of TRP channels</b>	CYP2J2, F2RL1, BDKRB2
<b>PPAR signaling pathway</b>	FABP5, PPARG, RXRB
<b>Regulation of lipolysis in adipocytes</b>	PTGER3, PTGS1, CIDEC

Amphetamine addiction	ATF6B, GRIN2A, CACNA1C
Insulin signaling pathway	FLOT1, PPARGC1A, PRKAG2
Adrenergic signaling in cardiomyocytes	ATF6B, ADRA1B, CACNA1C
Cocaine addiction	ATF6B, GRIN2A, BDNF
Alcoholic liver disease	PPARGC1A, CYP2E1, PRKAG2
Complement and coagulation cascades	CPB2, BDKRB2
Rheumatoid arthritis	HLA-DMB, HLA-DOB
Dilated cardiomyopathy	ITGA4, CACNA1C
Neutrophil extracellular trap formation	AGER, SELP
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy	ITGA4, CACNA1C
TNF signaling pathway	DNM1L, ATF6B
Leukocyte transendothelial migration	CDH5, ITGA4
One carbon pool by folate	SHMT1, TYMS

### Analisi del polimorfismo del gene *CYP2D6* nei soggetti deceduti per Morte cardiaca improvvisa (n=36)

L'analisi su questo campione di controllo ha mostrato una distribuzione genotipica e fenotipica in linea con le frequenze della popolazione europea per i NM, PM e IM.

MCI	AS	Fenotipo	Frequenza osservata
5	3	UM	14%
18	2	NM	50%
4	1.5	NM	11%
1	1.25	NM	3%
5	1	IM	14%
1	0,5	IM	3%
2	0	PM	5%

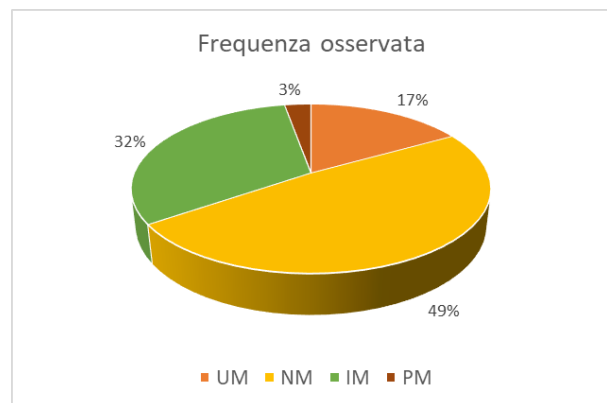




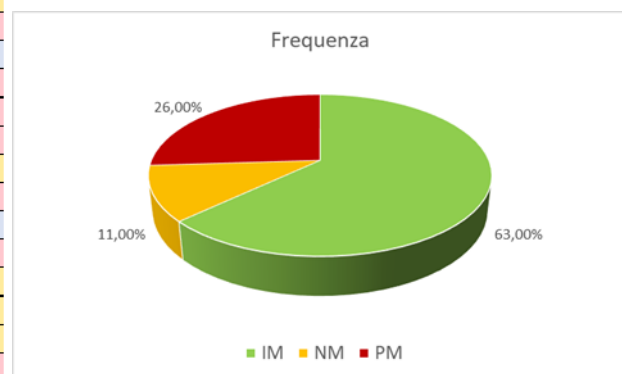
## Analisi del polimorfismo del gene *CYP2D6* nei soggetti deceduti risultati positivi a xenobiotici in poli-assunzione (CMET/PHG)

Le tabelle mostrano le frequenze dei fenotipi osservati nel campione di 35 soggetti deceduti risultati positivi a xenobiotici in poli-assunzione (CMET/PHG). A seguito di valutazione del punteggio dell'activity score dei soggetti in politerapia e per i quali si conosceva l'interazione tra xenobiotici e gene (27 campioni), sono state calcolate le frequenze dei nuovi fenotipi tenendo conto della *fenocconversione*. Come si evince dalle tabelle, la fenocconversione ha modificato la percentuale relativa ai fenotipi rilevati risultando un aumento di IM e PM. Solo l'11% dei soggetti esaminati ha mantenuto lo stato di metabolizzatore normale.

CMET+ PHG	AS	Fenotipo	Frequenza osservata
5	3	UM	14%
1	2,5	UM	3%
15	2	NM	43%
2	1.5	NM	6%
8	1	IM	23%
2	0,5	IM	6%
1	0,25	IM	3%
1	0	PM	3%



Fenotipo	AS post fenocconv	Nuovo fenotipo
NM	2x0,5=1	IM
IM	1x0,5=0,5	IM
IM	1x0,5=0,5	IM
IM	1x0,5=0,5	IM
NM	2x0,5=1	IM
NM	1,5x0,5=0,75	IM
IM	1x0,5=0,5	IM
NM	2x0,5=1	IM
IM	1x0,5=0,5	IM
NM	2x0,5=1	IM
IM	1x0,5=0,5	IM
NM	2x0,5=1	IM
UR	3x0,5=1,5	NM
NM	2x0,5=1	IM
PM	0x0,5=0	PM
UR	3x0,5=1,5	NM
NM	2x0=0	PM
UR	3x0=0	PM
NM	2x0=0	PM
NM	2x0,5=1	IM
UR	2,5 x 0=0	PM
UR	3x0,5=1,5	NM
NM	2x0=0	PM
NM	2x0,5=1	IM
IM	1x0,5=0,5	IM
IM	0,5x0,5=0,25	IM
IM	0,25x0=0	PM



## Conclusioni

Considerando l'estensione e l'impatto dei polimorfismi genetici del gene *CYP2D6*, la fenocconversione da parte della politerapia e il contributo del *CYP2D6* nel metabolismo dei farmaci, la farmacogenetica è essenziale per garantire la sicurezza e l'efficacia dei farmaci. L'utilizzo di linee guida adeguate che incorporino sia la farmacogenetica del *CYP2D6* che la fenocconversione nell'assistenza clinica aiuterà a ottimizzare la terapia farmacologica.

Occorre considerare che, ad esempio, i pazienti con disturbi psichiatrici spesso assumono cinque o più farmaci, aumentando il rischio di fenocconversione. In uno studio australiano su più di 2900 pazienti, la fenocconversione del CYP ha aumentato la frequenza di PM per *CYP2D6* (dal 5,4 al 24,7%) e *CYP2C19* (dal 2,7 al 17%), con la maggior parte dei pazienti sottoposti a test PGx per guidare la prescrizione di psicotropi.

In un'analisi separata della fenocconversione del CYP in un contesto di salute mentale di persone anziane, il 75% dei pazienti dello studio era in politerapia. Questo studio ha anche dimostrato che la frequenza della fenocconversione del CYP prevista al momento del ricovero e della dimissione è aumentata rispettivamente per gli IM del *CYP2D6* dell'11,7 e del 16,1% e per gli IM del *CYP2C19* del 13,1 e dell'11,7%.

Nel nostro studio, a seguito di fenocconversione si è avuto un aumento di PM per il *CYP2D6* dal 3% al 26% mentre i NM erano solo l'11%.

Il calcolo statistico eseguito per confrontare le frequenze fenotipiche tra popolazione di controllo e popolazione di soggetti deceduti risultati positivi a xenobiotici in poliassunzione ha mostrato che la differenza non era statisticamente significativa considerando il fenotipo nativo, ma tale differenza risultava statisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ) considerando la fenocconversione dovuta alla poliassunzione di sostanze.

L'analisi genomica eseguita su una popolazione di controllo per un set di geni al fine di analizzare il loro polimorfismo, ha permesso di individuare pathway relativi al metabolismo associati a malattie cardiovascolari, avendo alcuni metaboliti un ruolo patogeno che può aumentare o talvolta ridurre il rischio di sviluppare queste patologie.

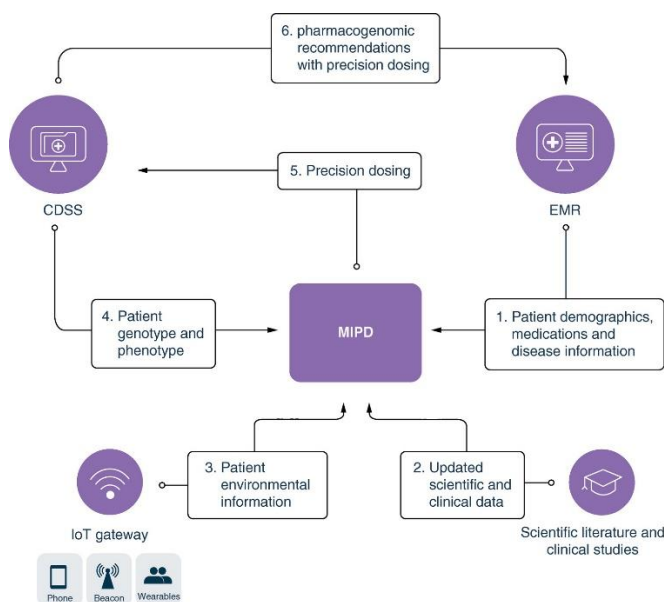
Sono state rilevate varianti negli 11 geni della famiglia CYP 450 coinvolti nel metabolismo dei farmaci, nel metabolismo del colesterolo e dei lipidi e nel metabolismo degli ormoni. Questi geni sono *CYP4B1*, *CYP2S1*, *CYP39A1*, *CYP7B1*, *CYP11B1*, *CYP11B2*, *CYP4F22*, *CYP2A6*, *CYP2A7*, *CYP24A1* e *CYP4V2*.

Questi polimorfismi potranno essere analizzati nelle casistiche di reazioni avverse ai farmaci e nelle morti per stato tossico in cui si sospetti la reazione avversa di origine genetica.

In sintesi, l'analisi dei polimorfismi così condotta ha permesso di individuare geni polimorfici il cui ruolo nelle reazioni avverse dovrà essere valutato e ha confermato il ruolo della farmacogenetica per un modello di terapia personalizzata specie quando è necessaria una politerapia con possibili effetti di fenocconversione.

Ancora più interessante sarà l'utilizzo di questi dati per la valutazione dei trials clinici che, ad oggi, non tengono conto dello stato fenotipico di metabolizzatore.

Come recentemente richiamato dalla letteratura, il nostro studio si colloca nella prospettiva di promuovere lo sviluppo di un sistema di supporto alle decisioni cliniche, secondo lo schema che di seguito si riporta:



Foundational architecture of a clinical decision support system powered by model-informed precision dosing for delivery of pharmacogenomic information into an electronic medical record (Mostafa S, Polasek TM, Bousman CA, Müller DJ, Sheffield LJ, Rembach J, Kirkpatrick CM. *Pharmacogenomics in psychiatry - the challenge of cytochrome P450 enzyme phenoconversion and solutions to assist precision dosing*. *Pharmacogenomics*. 2022 Oct;23(15):857-867. doi: 10.2217/pgs-2022-0104. Epub 2022 Sep 28. PMID: 36169629)

I risultati ottenuti saranno pubblicati a livello internazionale prevedendo tre pubblicazioni: la prima, già sottoposta a revisione, è una review condotta fin dall'inizio del progetto, incentrata sul ruolo di polimorfismi genetici, emersi dai pathways individuati, nello sviluppo di patologie cardiovascolari. La seconda sui risultati dell'analisi del polimorfismo del gene *CYP2D6* e della fenocconversione negli individui deceduti per intossicazione da sostanze. La terza sul ruolo di altri polimorfismi genetici implicati nella metabolizzazione degli xenobiotici emersi ampliando lo studio sulla variabilità di tutti i 415 geni studiati.

# TOWARDS PERSONALIZED THERAPY: A PHARMACOGENETIC DIAGNOSTIC APPROACH TO ADVERSE DRUG REACTIONS

## Introduction

Adverse drug reactions (ADRs) represent the most important cause of morbidity and mortality in Europe, occurring in 10% of patients, causing between 5 and 10% of hospital admissions, and occurring in 10 -20% of hospitalized patients. In USA it is estimated that adverse drug reactions cause 106,000 deaths per year and for this reason they represent the fifth cause of death (Montanè et al., 2020). The studies of forensic pharmacogenetics fit into this context, which focuses primarily on the genetic variations of the enzymes of the CYP superfamily, in particular of CYP2D6 gene since it is involved in the metabolic processes of about 20-30% of the drugs of its kind. common (Van der Leen et al., 2021) and its polymorphisms impact at least 50% of them. In fact, genetic polymorphisms of the CYPs can cause a marked increase or decrease in the plasma concentrations of the drug by altering the metabolic rate and can therefore influence individual therapeutic results. Depending on the drug, whether in active form or to be activated, ultra-rapid metabolizer phenotypes can make treatment much less effective, while slow and intermediate metabolizers respond inadequately to drugs and can lead to a higher toxic effect (Yurong et al., 2021). The genetics of enzymes involved in drug metabolism may play a critical role in understanding differences in drug response among individuals and thereby determining where ADRs may explain the cause of death. In the same way that drug metabolism is an important factor for personalized medicine in the clinical setting, it can have equal importance in determining the cause of death or its manner in medicolegal investigations. In particular, in subjects who died for intoxication or when death is sudden and a possible adverse reaction to the drug is suspected, the study at the genomic level can be decisive.

## Selection of biological samples for the genomic analysis

Genomic DNA was extracted from 35 whole blood samples taken from deceased subjects with positivity, quantitatively evaluated by chromatographic techniques coupled to mass spectrometry, to substances metabolised by CYP2D6 gene, including antidepressants, methadone, opioids and antipsychotics and from 30 subjects who died of sudden cardiac death as control sample.

## Genomic analysis using SNP -chip for 720000 variants

The analysis was performed to study the genetic polymorphism by SNP-chip for 720000 variants on a control sample of 30 individuals who died of sudden cardiac death (MCI) The genetic frequencies of the sample were compared with the genetic frequencies of two control datasets, a dataset consisting of 737 Italian (ITA) individuals [Sazzini et al. 2016] and the other consisting of 20 Tuscan individuals (TSI) from the 1000 Genomes project (1000 Genomes Project Consortium et al. 2015) and 10 Bergamaschi (BERG) from the Human Diversity Genome Project (Bergström et al. 2020). In both cases, following the execution of quality controls on all datasets, the  $\chi^2$  test was performed to verify if the genetic frequencies of MCI differed significantly from those of the controls.

Variants were also found in 11 CYP 450 genes, which are involved in drug metabolism, cholesterol and lipid metabolism, and hormone metabolism. These genes are *CYP4B1*, *CYP2S1*, *CYP39A1*, *CYP7B1*, *CYP11B1*, *CYP11B2*, *CYP4F22*, *CYP2A6*, *CYP2A7*, *CYP24A1* and *CYP4V2*.

## Genotyping by Taqman probe for the analysis of *CYP2D6* gene polymorphism

The analysis was performed on 36 control samples and 35 samples of dead subjects with positive results for poly-assumption xenobiotics. For the analysis of *CYP2D6* gene polymorphism a TaqMan qPCR assay was designed. It requires a pair of specific primers for the amplification of the target DNA fragment, a polymerase with a 5'-3' exonuclease activity and two specific probes for the target region, each of which is bound to a different dye (FAM or VIC) at the 5' end and an appropriate Quencher at the 3'. During the PCR reaction, the 5' exonuclease activity of the polymerase causes the fluorophore to be removed from the quencher only if there is a perfect match between the probe and its DNA target. Probes that are not correctly matched to the DNA in the target region are unstable and are not degraded by the 5'-3' exonuclease action of Taq polymerase and therefore do not release fluorescence (Heissl et al., 2017)

All samples were genotyped for the ten most relevant variants for *CYP2D6* gene, as reported in Table 1:

ALLELE	SNP POSITION	SNP ID	FUNCTION
*3	2549 del A	rs35742686	null
*4	1846 G>A	rs3892097	null
*6	1707 del T	rs5030655	null
*9	2615 del AGA	rs5030656	decreased
*10	100 C>T	rs1065852	decreased
*17	1023 C>T	rs28371706	decreased
*59	2850C>T	rs16947	decreased
*59	4180G>C	rs1135840	decreased
*41	2988 G>A	rs28371725	decreased
*59-FT	2939 G>A	rs79292917	

Table 1: 10 SNPs positions tested in the TaqMan qPCR assay. From left: name of the allele, the position of the variant within the *CYP2D6* gene based on the nomenclature NG\_008376.4, the mutation SNP as indicated on PharmVar, the identification code of the SNP and the resulting function.

For the raw data analysis of and the interpretation of the results, the ThermoFisher Cloud Genotype Application Analysis software was used, which allows to create a project with the aim of collecting together the raw data of different experiments. Using an algorithm, the software is able to attribute the genotype to the samples. The results are plotted (Allelic discrimination plot) and each sample is graphically represented as a single coloured point.

All samples were then subjected to a TaqMan Copy Number Variations (CNV) assay with qPCR to investigate and measure gene copy number variations. At the end of the assay, the results are exported and analyzed with the CopyCaller software (Applied Biosystems™) which uses the comparative method of  $\Delta\Delta C_t$  to calculate the difference between the threshold cycle of the assay on the target and that of the reference standard. Next, the software makes a comparison of the  $\Delta C_t$  value of the test sample with a sample acting as a calibrator that contains a copy number of the target sequence.

Gametic phase inference using Phase v. 2.1 applies the Bayesian statistical method to reconstruct the haplotype starting from genetic data of the population and is used for the study of SNPs, microsatellites and also other multi-allelic loci, in different combinations, also taking into account any missing data. The algorithm starts by dividing the data from consecutive loci into segments, then calculates a list of possible haplotypes within each segment, and then combines the individual

segments to obtain a list of possible haplotypes and the best for each pair of haplotypes. across the entire region. The division into segments is causal. The program then produces several output files with the results of the analysis. One of these reports the estimated frequency of each haplotype and consists of 4 columns, the first of which contains a number associated with each haplotype, followed by a column indicating the calculated haplotypes, while the next two columns respectively report the estimated frequency for each haplotype and its standard deviation. A further file contains a list of the most probable haplotypes for each individual, accompanied by a numerical value indicating the probability.

### **Diplotype assignment, Activity Score and related phenotype of *CYP2D6* gene polymorphism**

Genetic test results provide a pair of haplotypes that together constitute the diplotype (one maternal and one paternal allele). The haplotype is characterized by the presence of a specific combination of SNPs or other sequence alterations within the *CYP2D6* gene locus. In this study, the attribution of the diplotype took place via the PHARMVAR website <https://www.pharmvar.org/gene/CYP2D6>. The combination of these alleles determines the metabolic profile of the subject which is deduced from the Activity Score (AS) model introduced by Gaedigk et al. in 2008. Through this system, an allele receives a value that approximates its function and the sum of the values assigned to each allele determines the final value of AS (Gaedigk, 2013). This scoring system facilitates the translation of highly complex *CYP2D6* diplotype data into patient phenotype to guide drug therapy and is at the heart of all Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guidelines. Then, once the AS value is assigned, the genotype/diplotype information is rapidly translated into the 4 conventional metabolic phenotypes, i.e. Poor (PM), Intermediate (IM), Extensive (EM) (now referred to as NM) and Ultrarapid (UM) metabolizers (see Table 2).

In this study, the AS score and the resulting phenotype was performed on the basis of the tables reported on the PHARMGKB website, which follows the recommendations of the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC).

In evaluating the AS score in subjects undergoing polytherapy, the combined intake of several drugs should however be taken into consideration as, especially if they are inhibitors enzyme, can cause phenoconversion phenomena. Consequently, the AS score will have to be recalculated taking these factors into consideration. One of the quickest methods is to multiply the AS value by 0 or 0.5 if you are in the presence of a strong or moderate/weak inhibitor respectively. The resulting value of AS will indicate the new phenotype and thus highlight a Phenoconversion. The CPIC recommendations refer to this system, whereby in the presence of a strong inhibitor the AS value of *CYP2D6* is converted to 0, while in the presence of a moderate-weak inhibitor, the AS will be multiplied by 0.5, and this will determine possibly a modification of the predicted phenotype (Cicali et al., 2021) (Table.2).

Activity Score <i>CYP2D6</i>	Genetic Phenotype	Weak Inhibitor and Moderate Inhibitor	Strong Inhibitor
0	PM	Activity score $\times$ 0.5 = PM	Activity score $\times$ 0 = PM
> 0 < 1.25	IM	Activity score $\times$ 0.5 = IM	Activity score $\times$ 0 = PM
> 1.25 < 2.25	NM	Activity score $\times$ 0.5 = IM	Activity score $\times$ 0 = PM
>2.25	UM	Activity score $\times$ 0.5 = NM	Activity score $\times$ 0 = PM

Table 2. Table of genetic phenotype conversion for *CYP2D6* gene in the presence of strong inhibitor, moderate and weak inhibitors

## RESULTS

### Genome analysis

On the case studies of subjects who died of sudden cardiac death, on the basis of research carried out in the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (<https://www.genome.jp/kegg/>, Kanehisa & Goto 2000) 415 examined genes involved in various Pathways were examined, in which metabolic pathways are those with the greatest number of genes (Table 3). In particular, there are Pathways enriched with these genes related to the functioning and pathologies of the cardiovascular system, the metabolism of drugs and drug addiction.

**Table 3.**

Pathway	Genes
Metabolic pathways	RDH12, CYP2C9, CYP2E1, CYP2J2, DBH, DPYD, ALDH3A1, FMO3, HAAO, GBE1, ABO, GSTA4, CYP2S1, AOX1, LPC, MGST1, MGST3, NDUFS6, RDH11, PIP4K2A, PTGS1, XYLT1, ALDH8A1, SHMT1, ST3GAL4, MPPE1, SULT1E1, TBXAS1, TYMS, TYR, ALDH5A1, CAT, MGAM
Pathways in cancer	FZD2, GSTA4, APC, IL2RA, IL4, MGST1, MGST3, MLH1, PPARG, PTGER1, PTGER3, RARB, BDKRB2, RXRB, NCOA3, RUNX1T1, NCOA1, FGF18, KEAP1
Pathways of neurodegeneration - multiple disease	AGER, FUS, FZD2, GRIN2A, APC, MAPT, NDUFS6, DCTN4, BDNF, SNCA, CACNA1C, CAT, EIF2AK3
Cell adhesion molecules	CDH4, CDH5, NTNG1, ICOSLG, HLA-B, HLA-C, HLA-DMB, HLA-DOB, HLA-E, HLA-G, ITGA4, SELL, SELP
Herpes simplex virus 1 infection	HLA-B, HLA-C, HLA-DMB, HLA-DOB, HLA-E, HLA-G, ZFP57, ZNF772, SRSF4, ZNF184, EIF2AK3
Calcium signaling pathway	ADRA1B, TPCN2, GNAL, GRIN2A, KDR, MYLK, PTGER1, PTGER3, BDKRB2, CACNA1C, FGF18
Neuroactive ligand-receptor interaction	INSL5, ADRA1B, F2RL1, GRIN2A, S1PR5, PARD3, PTGER1, PTGER3, BDKRB2, THRB
Alzheimer disease	AGER, FZD2, GRIN2A, APC, MAPT, NDUFS6, SNCA, CACNA1C, EIF2AK3
ABC transporters	ABCC4, ABCC2, ABCA1, ABCA4, ABCB5, ABCB4, ABCC8, ABCB11, ABCC3
Human papillomavirus infection	COL1A2, FZD2, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-G, APC, ITGA4, PARD3
Lipid and atherosclerosis	CYP2C9, CYP2J2, AGER, ABCA1, ABCG1, PPARG, RXRB, SELP, EIF2AK3
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	CYP2C9, CYP2E1, ALDH3A1, GSTA4, CYP2S1, MGST1, MGST3, SULT2A1

<b>Bile secretion</b>	ABCC4, ABCC2, SLCO1B3, ABCB4, SLCO1A2, SULT2A1, ABCB11, ABCC3
<b>PI3K-Akt signaling pathway</b>	COL1A2, ATF6B, IL2RA, IL4, ITGA4, KDR, BDNF, FGF18
<b>Human cytomegalovirus infection</b>	AKAP13, ATF6B, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-G, PTGER1, PTGER3
<b>Phagosome</b>	HLA-B, HLA-C, HLA-DMB, HLA-DOB, HLA-E, HLA-G, MRC1, MSR1
<b>Regulation of actin cytoskeleton</b>	ABI2, CYFIP1, APC, ITGA4, MYLK, PIP4K2A, BDKRB2, FGF18
<b>Chemical carcinogenesis - receptor activation</b>	ATF6B, GSTA4, ARRB1, MGST1, MGST3, RXRB, CACNA1C, FGF18
<b>Drug metabolism - cytochrome P450</b>	CYP2C9, CYP2E1, ALDH3A1, FMO3, GSTA4, AOX1, MGST1, MGST3
<b>Human T-cell leukemia virus 1 infection</b>	ATF6B, HLA-B, HLA-C, HLA-DMB, HLA-DOB, HLA-E, HLA-G, IL2RA
<b>Serotonergic synapse</b>	CYP2C9, CYP2J2, HTR3C, HTR3D, KCND2, PTGS1, CACNA1C
<b>Allograft rejection</b>	HLA-B, HLA-C, HLA-DMB, HLA-DOB, HLA-E, HLA-G, IL4
<b>Autoimmune thyroid disease</b>	HLA-B, HLA-C, HLA-DMB, HLA-DOB, HLA-E, HLA-G, IL4
<b>Endocytosis</b>	HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-G, IL2RA, ARRB1, PARD3
<b>Chemical carcinogenesis - reactive oxygen species</b>	CYP2E1, GSTA4, MGST1, MGST3, NDUFS6, CAT, KEAP1
<b>Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection</b>	MICA, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-G, MICB
<b>Type I diabetes mellitus</b>	HLA-B, HLA-C, HLA-DMB, HLA-DOB, HLA-E, HLA-G
<b>Viral carcinogenesis</b>	ATF6B, GTF2H1, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-G
<b>Natural killer cell mediated cytotoxicity</b>	MICA, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-G, MICB
<b>Gastric cancer</b>	FZD2, APC, MLH1, RARB, RXRB, FGF18
<b>Chemical carcinogenesis - DNA adducts</b>	CYP2C9, CYP2E1, GSTA4, MGST1, MGST3, SULT2A1
<b>Parkinson disease</b>	GNAL, MAPT, NDUFS6, SNCA, EIF2AK3, KEAP1
<b>Amyotrophic lateral sclerosis</b>	FUS, GRIN2A, NDUFS6, DCTN4, CAT, EIF2AK3
<b>Antigen processing and presentation</b>	HLA-B, HLA-C, HLA-DMB, HLA-DOB, HLA-E, HLA-G
<b>Transcriptional misregulation in cancer</b>	JMJD1C, FUS, PPARG, RXRB, WT1, RUNX1T1
<b>Hepatocellular carcinoma</b>	FZD2, GSTA4, APC, MGST1, MGST3, KEAP1
<b>Viral myocarditis</b>	HLA-B, HLA-C, HLA-DMB, HLA-DOB, HLA-E, HLA-G
<b>MAPK signaling pathway</b>	KDR, ARRB1, MAPT, BDNF, CACNA1C, FGF18
<b>Fluid shear stress and atherosclerosis</b>	CDH5, GSTA4, KDR, MGST1, MGST3, KEAP1



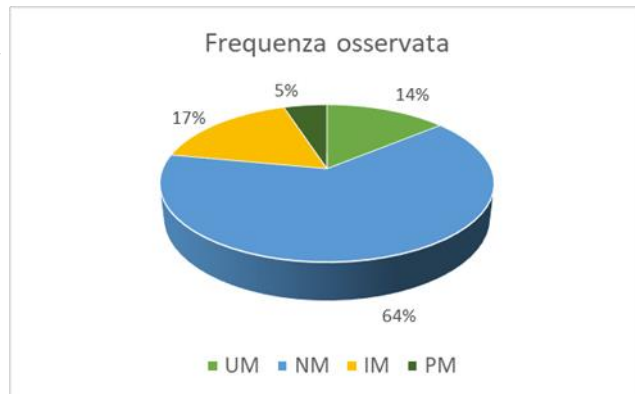
<b>Epstein-Barr virus infection</b>	HLA-B, HLA-C, HLA-DMB, HLA-DOB, HLA-E, HLA-G
<b>Graft-versus-host disease</b>	HLA-B, HLA-C, HLA-DMB, HLA-DOB, HLA-E, HLA-G
<b>Drug metabolism - other enzymes</b>	CYP2E1, DPYD, GSTA4, MGST1, MGST3
<b>Huntington disease</b>	PPARGC1A, NDUFS6, DCTN4, PPARG, BDNF
<b>Leishmaniasis</b>	EEF1A1, HLA-DMB, HLA-DOB, IL4, ITGA4
<b>Hematopoietic cell lineage</b>	HLA-DMB, HLA-DOB, IL2RA, IL4, ITGA4
<b>Nucleocytoplasmic transport</b>	IPO8, EEF1A1, TNPO1, DDX39B, PYM1
<b>Intestinal immune network for IgA production</b>	ICOSLG, HLA-DMB, HLA-DOB, IL4, ITGA4
<b>cGMP-PKG signaling pathway</b>	ATF6B, ADRA1B, MYLK, BDKRB2, CACNA1C
<b>cAMP signaling pathway</b>	ABCC4, GRIN2A, PTGER3, BDNF, CACNA1C
<b>Arachidonic acid metabolism</b>	CYP2C9, CYP2E1, CYP2J2, PTGS1, TBXAS1
<b>Longevity regulating pathway</b>	PPARGC1A, ATF6B, PRKAG2, PPARG, CAT
<b>Breast cancer</b>	FZD2, APC, NCOA3, NCOA1, FGF18
<b>Dopaminergic synapse</b>	ATF6B, GNAL, GRIN2A, ARRB1, CACNA1C
<b>Prion disease</b>	ATF6B, GRIN2A, NDUFS6, CACNA1C, EIF2AK3
<b>Non-alcoholic fatty liver disease</b>	CYP2E1, NDUFS6, PRKAG2, PPARG, EIF2AK3
<b>Th17 cell differentiation</b>	HLA-DMB, HLA-DOB, IL2RA, IL4, RXRB
<b>Platinum drug resistance</b>	ABCC2, GSTA4, MGST1, MGST3, MLH1
<b>Antifolate resistance</b>	ABCC4, ABCC2, SHMT1, TYMS, ABCC3
<b>Retinol metabolism</b>	RDH12, CYP2C9, CYP2S1, AOX1, RDH11
<b>Pathogenic Escherichia coli infection</b>	NLRP4, CYFIP1, MYO10, RPS3
<b>Axon guidance</b>	UNC5B, NTNG1, PARD3, SEMA5A
<b>Thermogenesis</b>	PPARGC1A, NDUFS6, PRKAG2, PPARG
<b>Glutamatergic synapse</b>	SLC17A8, GRIN2A, SLC1A7, CACNA1C
<b>AMPK signaling pathway</b>	PPARGC1A, EEF2K, PRKAG2, PPARG
<b>Tyrosine metabolism</b>	DBH, ALDH3A1, AOX1, TYR
<b>Relaxin signaling pathway</b>	INSL5, COL1A2, ATF6B, ARRB1
<b>Oxytocin signaling pathway</b>	EEF2K, MYLK, PRKAG2, CACNA1C
<b>Tryptophan metabolism</b>	HAAO, AOX1, ALDH8A1, CAT
<b>Diabetic cardiomyopathy</b>	COL1A2, AGER, NDUFS6, REN
<b>Cholesterol metabolism</b>	ABCA1, PCSK9, LIPC, ABCB11
<b>Ras signaling pathway</b>	GRIN2A, KDR, BDNF, FGF18
<b>Wnt signaling pathway</b>	FZD2, APC, TLE4, CER1

<b>Alcoholism</b>	ATF6B, SLC29A1, GRIN2A, BDNF
<b>Cushing syndrome</b>	ATF6B, FZD2, APC, CACNA1C
<b>Parathyroid hormone synthesis, secretion and action</b>	AKAP13, ATF6B, ARRB1, RXRB
<b>Thyroid hormone signaling pathway</b>	RXRB, THRB, NCOA3, NCOA1
<b>Rap1 signaling pathway</b>	GRIN2A, KDR, PARD3, FGF18
<b>Cellular senescence</b>	HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-G
<b>Th1 and Th2 cell differentiation</b>	HLA-DMB, HLA-DOB, IL2RA, IL4
<b>Biosynthesis of cofactors</b>	RDH12, HAAO, RDH11, SHMT1
<b>Spliceosome</b>	FUS, SRSF4, DDX39B, RBM17
<b>Platelet activation</b>	COL1A2, MYLK, PTGS1, TBXAS1
<b>Human immunodeficiency virus 1 infection</b>	HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-G
<b>Focal adhesion</b>	COL1A2, ITGA4, KDR, MYLK
<b>Apelin signaling pathway</b>	PPARGC1A, MYLK, PRKAG2
<b>Hypertrophic cardiomyopathy</b>	ITGA4, PRKAG2, CACNA1C
<b>Insulin resistance</b>	PPARGC1A, SLC27A3, PRKAG2
<b>Glutathione metabolism</b>	GSTA4, MGST1, MGST3
<b>Retrograde endocannabinoid signaling</b>	SLC17A8, NDUFS6, CACNA1C
<b>Insulin secretion</b>	ATF6B, ABCC8, CACNA1C
<b>Vascular smooth muscle contraction</b>	ADRA1B, MYLK, CACNA1C
<b>Inflammatory mediator regulation of TRP channels</b>	CYP2J2, F2RL1, BDKRB2
<b>PPAR signaling pathway</b>	FABP5, PPARG, RXRB
<b>Regulation of lipolysis in adipocytes</b>	PTGER3, PTGS1, CIDEC
<b>Amphetamine addiction</b>	ATF6B, GRIN2A, CACNA1C
<b>Insulin signaling pathway</b>	FLOT1, PPARGC1A, PRKAG2
<b>Adrenergic signaling in cardiomyocytes</b>	ATF6B, ADRA1B, CACNA1C
<b>Cocaine addiction</b>	ATF6B, GRIN2A, BDNF
<b>Alcoholic liver disease</b>	PPARGC1A, CYP2E1, PRKAG2
<b>Complement and coagulation cascades</b>	CPB2, BDKRB2
<b>Rheumatoid arthritis</b>	HLA-DMB, HLA-DOB

Dilated cardiomyopathy	ITGA4, CACNA1C
Neutrophil extracellular trap formation	AGER, SELP
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy	ITGA4, CACNA1C
TNF signaling pathway	DNM1L, ATF6B
Leukocyte transendothelial migration	CDH5, ITGA4
One carbon pool by folate	SHMT1, TYMS

### Analysis of the *CYP2D6* gene polymorphism in subjects who died of sudden cardiac death (28)

MCI	AS	Fenotipo	Frequenza osservata
5	3	UM	14%
18	2	NM	50%
4	1.5	NM	11%
1	1.25	NM	3%
5	1	IM	14%
1	0,5	IM	3%
2	0	PM	5%

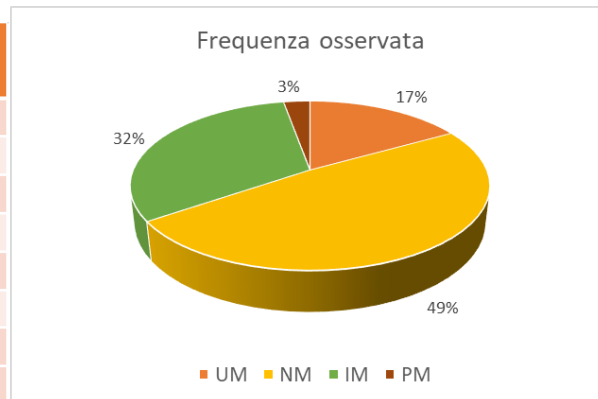


## Analysis of the polymorphism of the *CYP2D6* gene in the deceased subjects positive for poly-assumption xenobiotics (CMET/PHG)

The tables show the frequencies of the phenotypes observed in the sample of 35 dead subjects with positive results for poly-assumption xenobiotics (CMET/PHG).

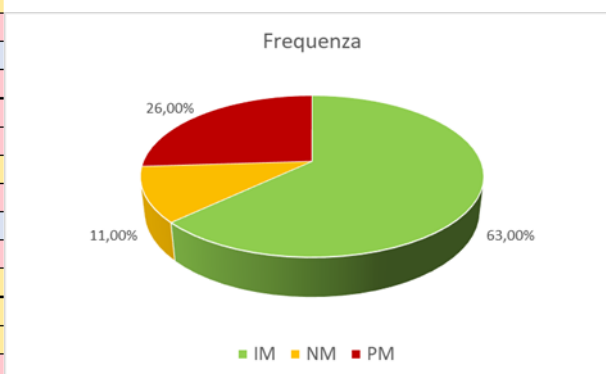
Following evaluation of the activity score of the subjects in polytherapy and for whom the interaction between xenobiotics and gene was known (27 samples), the frequencies of the new phenotypes were calculated considering the phenoconversion. As can be seen from the tables, phenoconversion changed the percentage of the detected phenotypes resulting in an increase in MI and PM. Only 11% of subjects tested maintained normal metabolizer status.

CMET+ PHG	AS	Fenotipo	Frequenza osservata
5	3	UM	14%
1	2,5	UM	3%
15	2	NM	43%
2	1.5	NM	6%
8	1	IM	23%
2	0,5	IM	6%
1	0,25	IM	3%
1	0	PM	3%



Results of *CYP2D6* genotyping in 35 subjects who tested positive for xenobiotics in poly-drug use

Fenotipo	AS post fenoconv	Nuovo fenotipo
NM	2x0,5=1	IM
IM	1x0,5=0,5	IM
IM	1x0,5=0,5	IM
IM	1x0,5=0,5	IM
NM	2x0,5=1	IM
NM	1,5x0,5=0,75	IM
IM	1x0,5=0,5	IM
NM	2x0,5=1	IM
IM	1x0,5=0,5	IM
NM	2x0,5=1	IM
IM	1x0,5=0,5	IM
NM	2x0,5=1	IM
UR	3x0,5=1,5	NM
NM	2x0,5=1	IM
PM	0x0,5=0	PM
UR	3x0,5=1,5	NM
NM	2x0=0	PM
UR	3x0=0	PM
NM	2x0=0	PM
NM	2x0,5=1	IM
UR	2,5 x 0=0	PM
UR	3x0,5=1,5	NM
NM	2x0=0	PM
NM	2x0,5=1	IM
IM	1x0,5=0,5	IM
IM	0,5x0,5=0,25	IM
IM	0,25x0=0	PM



Results of *CYP2D6* genotyping in 27 subjects who tested positive for xenobiotics in polytherapy after phenoconversion evaluation

## Conclusion

Considering the extent and impact of genetic polymorphisms of *CYP2D6*, phenoconversion by the comedications, and contribution of *CYP2D6* in drug metabolism, *CYP2D6* pharmacogenetics is essential to ensure drug safety and efficacy. Utilization of proper guidelines incorporating both *CYP2D6* pharmacogenetics and phenoconversion in clinical care assists in optimizing drug therapy. Patients with psychiatric disorders often take five or more medications (polypharmacy), increasing their risk of CYP phenoconversion. In an Australian study of more than 2900 patients, predicted CYP phenoconversion increased the frequency of PMs for *CYP2D6* (from 5.4 to 24.7%) and *CYP2C19* (from 2.7 to 17%), with the majority of patients having PGx testing to guide the prescribing of psychotropics.

In a separate analysis of CYP phenoconversion in an acute, aged persons mental health setting [11], 75% of study patients were on polypharmacy. This study also demonstrated that the frequency of predicted CYP phenoconversion at admission and discharge increased for *CYP2D6* IMs by 11.7 and 16.1% and for *CYP2C19* IMs by 13.1 and 11.7%, respectively.

In our study phenoconversion increased the frequency of PMs for *CYP2D6* from 3% to 26% and NMs were only 11%.

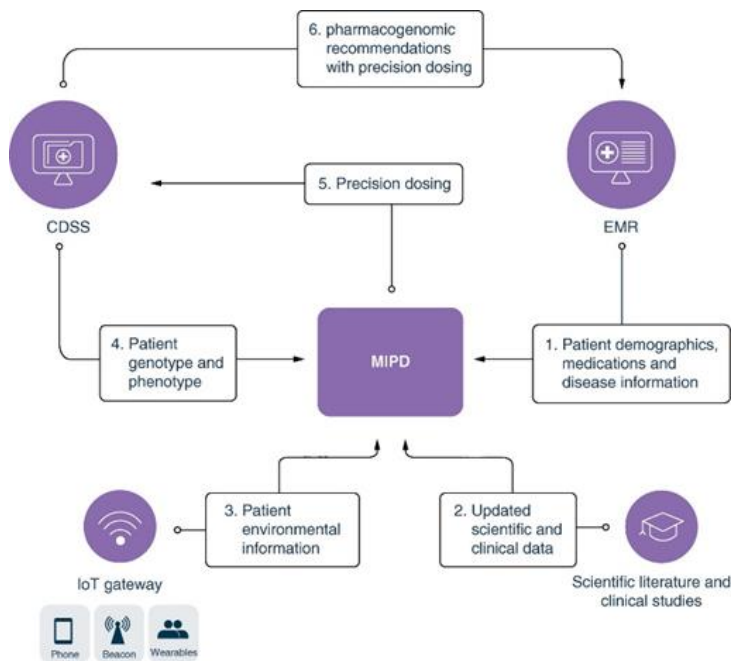
The statistical calculation performed to compare the phenotypic frequencies between the control population and the population of deceased subjects who tested positive for xenobiotics in polydrug assumption showed that the difference was not statistically significant considering the native phenotype, but this difference was statistically significant ( $p < 0.0001$ ) considering the phenoconversion due to the polydrug use of substances.

The genomic study performed to verify a possible association of polymorphisms for genes involved in the pharmacokinetics on sudden cardiac death, showed that there are metabolisms that have been associated with cardiovascular diseases, having some metabolites a pathogenic role which can increase or sometimes reduce the risk to develop these pathologies.

Variants were also found in 11 CYP 450 genes, which are involved in drug metabolism, cholesterol and lipids metabolism, and hormone metabolism. These genes are *CYP4B1*, *CYP2S1*, *CYP39A1*, *CYP7B1*, *CYP11B1*, *CYP11B2*, *CYP4F22*, *CYP2A6*, *CYP2A7*, *CYP24A1*, and *CYP4V2*. These polymorphisms can be analysed in case studies of adverse reactions to drugs and in deaths due to a toxic state in which the adverse reaction of genetic origin is suspected.

In summary, the analysis of polymorphisms thus conducted confirmed the role of pharmacogenetics for a model of personalized therapy especially when polytherapy with possible phenoconversion effects is necessary.

Our study promotes the development of a clinical decision support system, as follows:



Foundational architecture of a clinical decision support system powered by model-informed precision dosing for delivery of pharmacogenomic information into an electronic medical record (Mostafa S, Polasek TM, Bousman CA, Müller DJ, Sheffield LJ, Rembach J, Kirkpatrick CM. Pharmacogenomics in psychiatry - the challenge of cytochrome P450 enzyme phenoconversion and solutions to assist precision dosing. *Pharmacogenomics*. 2022 Oct;23(15):857-867. doi: 10.2217/pgs-2022-0104. Epub 2022 Sep 28. PMID: 36169629)

The results obtained will be published internationally in three publications: the first is a review conducted since the beginning of the project on the role of genetic polymorphisms in the development of cardiovascular diseases. The second on the results of the analysis of *CYP2D6* gene polymorphism and phenoconversion in individuals who died for substance intoxication. The third on the role of other genetic polymorphisms that emerged by expanding the study on the variability of all 415 genes studied in the population sample.